



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΣΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C**

**ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ Α. ΓΙΑΝΝΗΜΑΡΑΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΗΠΑΤΙΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΣΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑ
ΤΗΣ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C**

ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ Α. ΓΙΑΝΝΗΜΑΡΑΣ

A.M.: 61305

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΝΤΙΑ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια, Εργαστήριο
Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια
Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

E. Λιανίδου, Καθηγήτρια
Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

A. Μαμαλάκη, Ερευνήτρια Α'
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας ΕΙΠ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 14/10/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ηπατιδίνη (HAMP) είναι μία πεπτιδική ορμόνη 25 αμινοξέων, υπεύθυνη για την ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου στον οργανισμό, μέσω αποικοδόμησης του μοναδικού γνωστού κυτταρικού εξαγωγέα σιδήρου, της φερροπορτίνης. Η παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζει τις προσπάθειες να παραχθεί ανασυνδυασμένη ηπατιδίνη σε μονομερή μορφή και να διερευνηθεί η πιθανή ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της ηπατιδίνης από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), κατά την HCV μόλυνση του ήπατος. Η διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη.

Στο πρώτο μέρος έγινε παραγωγή του ανασυνδυασμένου μορίου Her25-His, το οποίο φέρει ετικέτα έξι ιστιδινών (6His-tag), σε διαλυτή μορφή στο ευκαρυωτικό σύστημα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η Her25-His χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ηπατιδίνης σε καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων. Παράλληλα, διερευνήθηκε ο ρόλος της λυοφιλοποίησης στην παρατηρούμενη δημιουργία συσσωματωμάτων κατά την απομόνωσή του. Κατά την προσπάθεια απομόνωσης της ανασυνδυασμένης μορφής Her25 με τη βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, προέκυψαν δυσκολίες στην απομόνωση της μονομερούς μορφής με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Γι'αυτό διερευνήθηκε ο όγκος έκλουσης των άλλων ενώσεων του δείγματος, ελέγχθηκε η στήλη με πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών και δοκιμάστηκε η απομόνωση της Her25 με κινητή φάση υψηλής αλατότητας.

Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου της ηπατιδίνης σε ηπατικά κύτταρα HepG2 παρουσία της ιικής καψιδιακής πρωτεΐνης (HCV core), η οποία είναι μία πλειοτροπική πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού. Σε ηπατικά κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου *hamp*, καθώς και τα επίπεδα της εκκρινόμενης ηπατιδίνης, με RT-qPCR και ανταγωνιστική ELISA, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της μεταγραφής της ηπατιδίνης παρουσία της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού HCV. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η έκφραση σημαντικών σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών με ανάλυση κατά Western. Παρατηρήθηκε αύξηση της αποθήκης του σιδήρου φερριτίνης και μείωση της έκφρασης της φερροπορτίνης (Fpn), της ματριπτάσης-2 (TMPRSS6) και του υποδοχέα της τρανσφερίνης τύπου 1 (TfR1). Με χρήση ειδικών αναστολέων, η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου *hamp* από την καψιδιακή πρωτεΐνη

έδειξε ότι ενεργοποιούνται τα σηματοδοτικά μονοπάτια BMP/SMAD και STAT3. Στην ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών συμμετέχει η κινάση CK2.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανοσολογία, Ιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ανασυνδυασμένη ηπατιδίνη, γονίδιο *hamp*, καψιδιακή πρωτεΐνη, ηπατίτιδα C, κινάση CK2

ABSTRACT

Hepcidin (HAMP) is a 25-aa peptide hormone that regulates iron homeostasis through degradation of the only known cellular iron exporter ferroportin. The present thesis presents our efforts to produce recombinant hepcidin in its monomeric form and to investigate the putative regulation of hepcidin gene expression by the Hepatitis C virus (HCV), during HCV infection of the liver. Thus, the results are divided in two parts.

Firstly, we purified the soluble form of the recombinant peptide Hep25-His, which carries a 6His-tag, from the yeast *P. pastoris*. Hep25-His was used for the quantitation of secreted hepcidin in hepatic cell cultures. We investigated the contribution of lyophilization to aggregate formation during hepcidin purification. We also tried to purify the recombinant peptide Hep25 using specific monoclonal antibodies, but the isolation of its monomer through size exclusive chromatography was not successful. In order to solve this problem, we measured the elution volume of other compounds that were present in the eluate, tested the separating efficiency of the column and changed the elution buffer with a higher concentration salt solution.

In the second part, we investigated the HCV core protein-mediated regulation of hepcidin gene expression in HepG2 hepatic cells. HCV core is a multifunctional structural protein that plays important roles in HCV life cycle. We measured the *hamp* gene expression and protein levels in core-expressing HepG2 cells with qRT-PCR and competitive ELISA, respectively. Results demonstrate that HCV core up-regulates hepcidin expression in a transcriptional manner. Western blot analysis revealed differential modulation of other important components of iron homeostasis, such as up-regulation of the iron storage protein ferritin and down-regulation of TfR1, matriptase and ferroportin. Using specific inhibitors, we demonstrated that HCV core increased hepcidin gene expression via a complex signaling network that requires the involvement of BMP/SMAD and STAT3 signaling pathways, as well as HCV core-mediated activation of CK2 kinase.

SUBJECT AREA: Immunology, Virology

KEYWORDS: recombinant hepcidin, *hamp* gene, core protein, Hepatitis C, CK2 kinase

Αφιέρωση

Στους γονείς μου, που η απεριόριστη στήριξη και υπομονή τους τόσα χρόνια με βοήθησε να εκπληρώσω τις σπουδές μου και μου έδωσε τη δυνατότητα να ακολουθήσω τα όνειρά μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	19
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 Μορφή και έκφραση της ηπατιδίνης στον άνθρωπο.....	21
1.2 Έκφραση ηπατιδίνης σε άλλα είδη κα ο ρόλος της.....	22
1.3 Δομή της ηπατιδίνης.....	23
1.4 Λειτουργία της ηπατιδίνης.....	26
1.5 Ο σιδηρορυθμιστικός ρόλος της ηπατιδίνης.....	27
1.6 Ρύθμιση της ηπατιδίνης.....	29
1.6.1 Ρύθμιση της ηπατιδίνης από τη συγκέντρωση σιδήρου – Το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP/SMAD.....	30
1.6.2 Ρύθμιση της ηπατιδίνης σε κατάσταση φλεγμονής.....	34
1.6.3 Ρύθμιση της ηπατιδίνης κατά την ερυθροποίηση.....	35
1.6.4 Ρύθμιση της ηπατιδίνης σε συνθήκες υποξίας.....	36
1.6.5 Διαταραχές του μεταβολισμού του σιδήρου στον άνθρωπο στις οποίες εμπλέκεται η ηπατιδίνη.....	37
Πρωτογενείς διαταραχές.....	37
Δευτερογενείς διαταραχές.....	38
1.6.6 Ρύθμιση της ηπατιδίνης από τον ιό της ηπατίτιδας C.....	40
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	45
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	46
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	46
3.1.1 Εργαστηριακά όργανα.....	46
3.1.2 Αντισώματα.....	47
3.1.3 Kit αντιδραστηρίων.....	48
3.1.4 Διαλύματα.....	48

3.1.5	Στελέχη ζυμομύκητα <i>P. pastoris</i> , πλασμίδια, κυτταρικές σειρές, εκκινητές.....	56
3.2	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	59
3.2.1	SDS–PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών μορίων.....	59
3.2.2	Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	61
3.2.3	Τεχνική ανοσοαποτύπωσης τύπου Western.....	62
3.2.4	Ομοιοπολική πρόσδεση μονοκλωνικού αντισώματος σε σφαιρίδια (πρωτεΐνης G-σεφαρόζης).....	63
3.2.5	Έκφραση, συλλογή και καθαρισμός του ανασυνδυσμένου μορίου Hep25 από <i>P. pastoris</i>	64
3.2.6	Ανοσοαποτύπωση σε κηλίδες υπό κενό (dot blot).....	68
3.2.7	Καθαρισμός του ανασυνδυσμένου μορίου της ηπατιδίνης (Hep25) με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας σε στήλη σφαιριδίων πρωτεΐνης G-σεφαρόζης που φέρουν ομοιοπολικά προσδεδεμένο μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων.....	70
3.2.8	Καθαρισμός του ανασυνδυσμένου μορίου της ηπατιδίνης (Hep25-His) με χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας σε στήλη ρητίνης αγαρόζης-νικελίου (Ni-NTA).....	71
3.2.9	Απομόνωση των ανασυνδυσμένων μορίων ηπατιδίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη μοριακού αποκλεισμού (SEC).....	73
3.2.10	Ποσοτικοποίηση πεπτιδίων μέσω φθορισμομετρίας.....	74
3.2.11	Ανοσοενzymική δοκιμασία ELISA.....	74
	Ανάπτυξη δοκιμασίας ELISA για τον έλεγχο και ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου της ηπατιδίνης.....	74
	Ανάπτυξη ανταγωνιστικής δοκιμασίας ELISA για την ποσοτικοποίηση του μορίου της ηπατιδίνης σε καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων.....	76
3.2.12	Καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων.....	77
	Διαδικασία απόψυξης κυττάρων.....	77
	Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς.....	78

Ψύξη κυττάρων.....	78
Υποκυτταρική κλασμάτωση πρωτεϊνών.....	79
3.2.13 Απομόνωση RNA.....	80
3.2.14 Αντίστροφη μεταγραφή.....	82
3.2.15 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR).....	83
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	87
4.1 Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων μορίων ηπατιδίνης Hep25-His και Hep25 στο ζυμομύκητα <i>Pichia pastoris</i>	87
4.1.1 Παραγωγή και καθαρισμός της Hep25-His.....	87
4.1.1.1 Χαρακτηρισμός της Hep25-His.....	92
4.1.1.2 Διερεύνηση του ρόλου της λυοφιλοποίησης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων ηπατιδίνης.....	93
4.1.2 Παραγωγή και καθαρισμός της Hep25.....	97
4.1.2.1 Προσδιορισμός του όγκου έκλουσης των άλλων ενώσεων του δείγματος.....	101
4.1.2.2 Έλεγχος της πεπτιδικής στήλης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης με πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών.....	103
4.1.2.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για την απομόνωση της Hep25 με κινητή φάση υψηλής αλατότητας.....	106
4.2 Μελέτη της επίδρασης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) στον σιδηρορυθμιστικό ρόλο της ηπατιδίνης.....	108
4.2.1 Η καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV επάγει την έκφραση της ηπατιδίνης.....	108
4.2.2 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια BMP/SMAD και STAT3 εμπλέκονται στην ρύθμιση της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV.....	112
4.2.3 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου <i>hamp</i> από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV προκύπτει από την ενεργοποίηση των μονοπατιών STAT3 και BMP/SMAD από την CK2 κινάση.....	118
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	122

6.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	130
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	132

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.1: Αμινοξική αλληλουχία της ηπατιδίνης.
- Σχήμα 1.2: Αλληλουχίες της ηπατιδίνης25 στα σπονδυλωτά.
- Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ηπατιδίνης.
- Σχήμα 1.4: Δομή ηπατιδίνης κατά Jordan et al. 2010.
- Σχήμα 1.5: Η ηπατιδίνη κατέχει κύριο ρόλο στην ομοιόσταση του σιδήρου.
- Σχήμα 1.6: Μοντέλο ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης της φερροπορτίνης.
- Σχήμα 1.7: Θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές της ηπατιδίνης.
- Σχήμα 1.8: Μοντέλο του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης της ηπατιδίνης από τον κυκλοφορούντα σίδηρο
- Σχήμα 1.9: Ο ιός της ηπατίτιδας C. Διακρίνονται το ιικό καψίδιο και ο φάκελος.
- Σχήμα 1.10: Ο κύκλος ζωής του HCV, ο οποίος πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα.
- Σχήμα 1.11: Γενετική οργάνωση και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης του HCV.
- Σχήμα 2.1: Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pPICZα
- Σχήμα 4.1: Χρωματογράφημα μεταλλικής συγγένειας Ni²⁺-NTA για την απομόνωση της Hep25-His.
- Σχήμα 4.2: Πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% με τα κλάσματα καθαρισμού Hep25-His από τη στήλη μεταλλικής συγγένειας Ni²⁺-NTA.
- Σχήμα 4.3: Χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης (SEC) καθαρισμού του ανασυνδυασμένου μορίου Hep25-His με στήλη Superdex™ Peptide 10/300 GL,
- Σχήμα 4.4: Πηκτή ηλεκτροφόρησης μη αποδιατακτικών συνθηκών των κλασμάτων που απομονώθηκαν ύστερα από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης των κλασμάτων της Hep25-His.
- Σχήμα 4.5: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της Hep25-His με την μέθοδο της ELISA.
- Σχήμα 4.6: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% κλασμάτων που περιείχαν συσσωματώματα ηπατιδίνης σε αποδιατακτικές συνθήκες (+) και μη (-).
- Σχήμα 4.7: Χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης καθαρισμού της Hep25-His.

- Σχήμα 4.8: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% κλασμάτων χρωματογραφίας μοριακής διήθησης καθαρισμού Hep25-His, στο οποίο δεν έγινε λυοφιλοποίηση (a), ή έγινε λυοφιλοποίηση (b),
- Σχήμα 4.9: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 στα κλάσματα των συσσωματωμάτων Hep25-His, όπου έγινε προηγουμένως λυοφιλοποίηση (a), ή χωρίς λυοφιλοποίηση (b)
- Σχήμα 4.10: Dot-Blot σε διάφορους κλώνους *P. Pastoris*
- Σχήμα 4.11: Χρωματογράφημα ανοσοσυγγένειας καθαρισμού της Hep25
- Σχήμα 4.12: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης στήλης superdex καθαρισμού του πεπτιδίου Hep25
- Σχήμα 4.13: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 έναντι της Hep25.
- Σχήμα 4.14: Τρεις διαδοχικές ενέσεις 500μL στην στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Οι δύο πρώτες κορυφές προέκυψαν από 200mM Tris και η τρίτη κορυφή από 0,1M γλυκίνη και 50mM Tris.
- Σχήμα 4.15: Χρωματογραφήματα πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα δείγματα.
- Σχήμα 4.16: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης καθαρισμού της Hep25, όπου ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 20mM και χλωριούχου νατρίου 150mM.
- Σχήμα 4.17: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* με qPCR
- Σχήμα 4.18: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA.
- Σχήμα 4.19: Ανάλυση κατά Western από εκχύλισμα κυττάρων pTRE και C2-3 με αντισώματα έναντι διάφορων πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου.
- Σχήμα 4.20: Ανάλυση κατά Western του κυτταροπλασματικού και πυρηνικού κλάσματος, καθώς και του συνολικού εκχυλίσματος των κυττάρων pTRE και C2-3 με anti-SMAD4 πολυκλωνικό αντίσωμα.
- Σχήμα 4.21: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία και του αναστολέα dorsomorphin με qPCR.
- Σχήμα 4.22: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA. a: Τιμές συγκέντρωσης ηπατιδίνης παρουσία του αναστολέα dorsomorphin, b: Σύγκριση στην αύξηση των επιπέδων ηπατιδίνης από την core πρωτεΐνη του HCV παρουσία του αναστολέα dorsomorphin.

- Σχήμα 4.23: Ανάλυση κατά Western blot σε εκχύλισμα κυττάρων pTRE και C2-3 με anti-total (t) και anti-phospho (p) STAT3 αντίσωμα.
- Σχήμα 4.24: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (S) με qPCR.
- Σχήμα 4.25: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (+S).
- Σχήμα 4.26: Ανάλυση κατά Western a: στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, στο πυρηνικό κλάσμα και σε συνολικό εκχύλισμα κυττάρων παρουσία αναστολέα quinalizarin (Q) με anti-SMAD4 αντίσωμα, b: σε εκχύλισμα κυττάρων παρουσία αναστολέα quinalizarin (Q) με anti-total (t) και anti-phospho (p) STAT3 αντίσωμα .
- Σχήμα 4.27: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία του αναστολέα της CK2 quinalizarin (Q) με qPCR
- Σχήμα 4.28: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA παρουσία του αναστολέα quinalizarin (Q).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα 2013-2016, στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ με ειδίκευση στη Βιοχημεία, στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Δρ. Α. Μαμαλάκη) και σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ινστιτούτου (Δρ. Ο. Γεωργοπούλου). Υπεύθυνη Καθηγήτρια στο Τμήμα Χημείας ήταν η Δρ. Ν. Γαλανοπούλου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου:

Στα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,

Στην επιβλέπουσα Καθηγήτρια της παρούσας εργασίας, Δρ. Ντία Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, η οποία μου έδωσε την κινητήρια δύναμη να ολοκληρώσω το Μεταπτυχιακό, αλλά και το Προπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του Τμήματος Χημείας διδάσκοντας μου, εκτός από την επιστήμη της Χημείας, την αγάπη για την επιστήμη και την πραγματική σημασία της.

Στην Δρ. Αυγή Μαμαλάκη, Ερευνήτρια Α' του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγησή της και την αμέριστη στήριξη και βοήθειά της για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Στην Δρ. Εύη Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας - Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ, για την παλαιότερη καθοδήγησή της σε προπτυχιακό επίπεδο και την συνεισφορά της στην επιλογή του τομέα ειδίκευσης, καθώς και για το προσωπικό ενδιαφέρον που επέδειξε για την παρούσα εργασία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ουρανία Γεωργοπούλου, Ερευνήτρια Β' του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την καθοδήγησή της και την άφογη συνεργασία, καθώς και για την βοήθειά της στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πέτρο Ηλιάδη, καθώς και τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Δρ. Πελαγία Φωκά και Αλέξη Δημητριάδη για την καθοδήγησή τους, το ενδιαφέρον τους και την εκπαίδευση στις απαραίτητες τεχνικές, καθώς και για τις αμέτρητες ώρες που μοιρασθήκαμε στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Αντριάνα, Λένα, Δήμητρα, Αλκέτα, Ράνια, Κατερίνα, Δάνα, Μαργαρίτα, Γεωργία και Αλεξία, καθώς και τους συμφοιτητές μου Μαρία, Γεωργία, Μάριο και Σπύρο για την συνεργασία μας και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

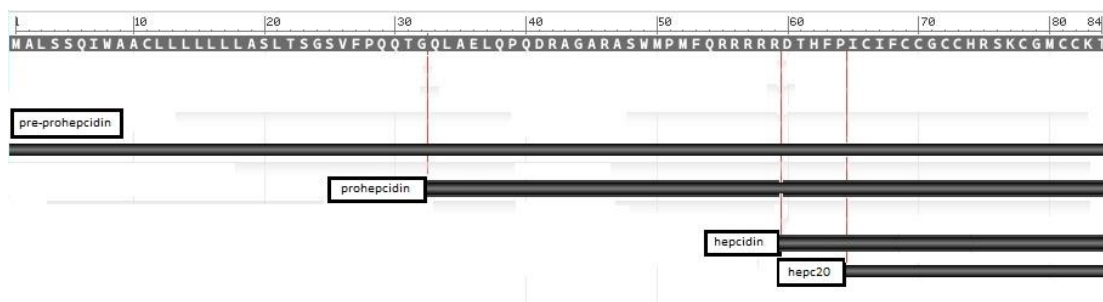
ΗΠΑΤΙΔΙΝΗ

Η ανακάλυψη του μορίου της ηπατιδίνης έγινε το 2001, όταν δύο ανεξάρτητα εργαστήρια κατάφεραν να απομονώσουν ένα πεπτίδιο με αντιμικροβιακή δράση από υπερδιηθημένο αίμα¹ και από ούρα,² αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αυτό το μικρό πεπτίδιο των 25 αμινοξέων, το οποίο παράγεται στα ηπατοκύτταρα κατά κύριο λόγο, αποδείχτηκε ότι είναι η ορμόνη-ρυθμιστής του σιδήρου, λειτουργία άγνωστη έως τότε.³ Ονομάστηκε ηπατιδίνη (hepcidin) από την ηπατική της προέλευση (hepc-/ηπατ-) και την βακτηριοκτόνο δράση της *in vitro* (-idin/-ιδίνη), ενώ αρχικά είχε γίνει γνωστή με βάση την αντιμικροβιακή της ιδιότητα ως LEAP (Liver-Expressed Antimicrobial Protein). Σήμερα, αναγνωρίζεται ως η ορμόνη που κατά κύριο λόγο συντονίζει την ομοιόσταση του σιδήρου στον οργανισμό.

1.1 Μορφή και έκφραση της ηπατιδίνης στον άνθρωπο

Η ηπατιδίνη εκφράζεται κύρια στο ήπαρ.^{1,2} Έχει όμως αναφερθεί έκφραση της και σε άλλα κύτταρα και ιστούς, όπως τα μακροφάγα,⁴ ο σπλήνας,⁵ το πάγκρεας,⁶ η καρδιά,⁷ ο νεφρός⁸ καθώς και ο αμφιβληστροειδής χιτώνας.⁹ Η ανθρώπινη ηπατιδίνη είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 25 αμινοξέα και αρχικά εντοπίστηκε στα ούρα και στο πλάσμα. Εκτός από την μορφή των 25 αμινοξέων, τα ούρα περιέχουν μικρές ποσότητες δύο άλλων μορφών με 20 και 22 αμινοξικά κατάλοιπα, αντίστοιχα, περικομμένα στο αμινοτελικό τους άκρο. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η ισομορφή των 20 αμινοξέων ανιχνεύεται και στον ορό, όχι όμως και αυτή των 22 αμινοξέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τελευταία αποτελεί πιθανόν προϊόν αποικοδόμησης.¹⁰ Ο ρόλος της ισομορφής των 20 αμινοξέων δεν είναι ακόμα γνωστός. Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατιδίνης *hamp* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 (19q13.1) και περιέχει τρία εξώνια που κωδικοποιούν ένα πρόδρομο μόριο 84 αμινοξέων (σχήμα 1.1). Το πρόδρομο αυτό μόριο ονομάζεται προ-προηπατιδίνη και

μέσω ενζυμικής δράσης μετατρέπεται στην προηπατιδίνη που αποτελείται από 64 αμινοξέα. Ακολούθως, αφαιρούνται μετα-μεταφραστικά 39 αμινοξέα από το αμινοτελικό τμήμα της και προκύπτει το ώριμο πεπτιδίδιο με τα 25 αμινοξικά κατάλοιπα, το οποίο και εκκρίνεται στο πλάσμα.¹¹



Σχήμα 1.1: Αμινοξική αλληλουχία της ηπατιδίνης. Παρουσιάζεται το προ-προπεπτιδίδιο της ηπατιδίνης και οι θέσεις της ενζυμικής διάσπασης που οδηγούν στην ώριμη μορφή.

1.2 Έκφραση της ηπατιδίνης σε άλλα είδη και ο ρόλος της

Πεπτιδία ομόλογα της ηπατιδίνης έχουν βρεθεί και σε άλλα είδη θηλαστικών όπως ο ποντικός, ο αρουραίος, ο σκύλος και ο χοίρος,² αλλά και σε αρκετά είδη ιχθύων (**σχήμα 1.2**). Ειδικά για τους ιχθύες, έχει διαπιστωθεί η αντιμικροβιακή δραστηριότητα αυτών των πεπτιδίων *in vitro*, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει εξακριβωθεί ο σιδηρορυθμιστικός τους ρόλος.¹² Επίσης στη Δροσόφιλα, υπάρχει ένα πεπτιδίδιο παρόμοιο με την ηπατιδίνη, η δροσομυκίνη, η οποία μοιάζει δομικά στις ντεφενσίνες, πεπτιδία του ανοσοποιητικού συστήματος πλούσια σε κυστεΐνες. Συντίθεται στο λιπαρό σώμα (ανάλογο του ανθρώπινου ήπατος) σε απόκριση στη φλεγμονή και περιέχει τέσσερεις δισουλφιδικούς δεσμούς.¹³

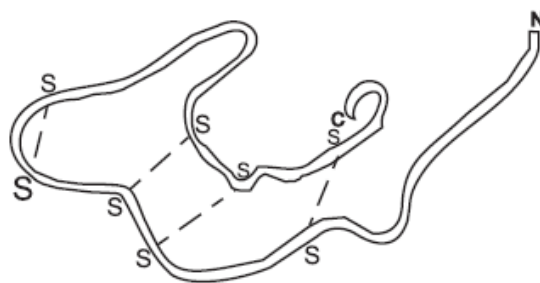
hHEP	DTHTPPICTFCCGCCCHRSK-CGMCCCT
pHEP*	DTHTPPICTFCCGCCCKAI-CGMCCCT
rHEP*	DTNFPICLPCKCKCKNSS-CGLCCIT
mHEP*	DTNFPICLPCKCKCKNSSQ-CGICCKT
bHEP	GCRFCNCCPNMSGCGVCCRF
fHEP*	ISHISLCRWCCNCKANKGCGFCKT
gHEP*	GIK---CKFCGCGCTPGV-CGVCCR

Σχήμα 1.2: Αλληλουχίες της ηπατιδίνης₂₅ στα σπονδυλωτά. Τα είδη των θηλαστικών είναι: άνθρωπος (hHEP), χοίρος (pHEP), αρουραίος (rHEP) και ποντίκι (mHEP). Η ηπατιδίνη τριών ειδών ιχθύος, του hybrid striped bass (bHEP), του flounder (fHEP) και του *Gillichthys mirabilis* (gHEP) παρουσιάζεται ως αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των πολλών ηπατιδινών που έχουν περιγραφεί στους ιχθύες. Στο σχήμα σημειώνονται οι συντηρημένες κυστεΐνες.²

1.3 Δομή της ηπατιδίνης

Η ηπατιδίνη είναι ένα μικρό μόριο 25 αμινοξέων, από τα οποία τα 8 είναι κυστεΐνες που σχηματίζουν μεταξύ τους τέσσερις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς του σχήματος 1.3. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Ωστόσο, σε μόρια με πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς η τριτοταγής δομή μπορεί αρκετές φορές να μην είναι σταθερή. Η ηπατιδίνη περιέχει πολλά βασικά αμινοξέα όπως λυσίνη, αργινίνη και ιστιδίνη, με αποτέλεσμα το μόριο να εμφανίζεται θετικά φορτισμένο με τάση για αμφιπαθή δευτεροταγή δομή.¹⁴ Επιπλέον, όπως και σε άλλα αντιμικροβιακά πεπτίδια, παρατηρείται ένας χωρικός διαχωρισμός των υδρόφιλων και υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων. Αυτός ο διαχωρισμός είναι χαρακτηριστικός για πεπτίδια που διασπούν βακτηριακές μεμβράνες. Ωστόσο, η ηπατιδίνη δεν έχει καμία ομοιότητα στην αλληλουχία με τα γνωστά αντιμικροβιακά πεπτίδια, μοιάζει όμως δομικά με τα μόρια της οικογένειας των ντεφενσινών (ομάδα πεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση).² Οι Hunter et al. ήταν οι πρώτοι που πρότειναν την τριτοταγή δομή της ηπατιδίνης με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR. Σύμφωνα με τις μελέτες τους, η ηπατιδίνη έχει απλή δομή φουρκέτας και σχηματίζει δύο αρμούς που ενώνονται με τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες.¹⁴ Η δομική ανάλυση αποκάλυψε ότι σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στις οκτώ κυστεΐνες που υπάρχουν στο ώριμο

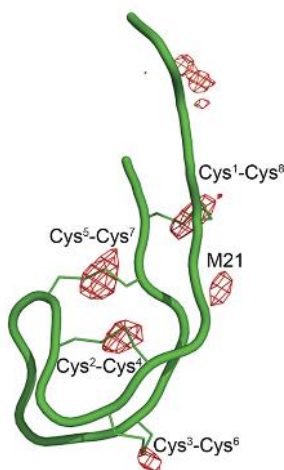
μόριο της ηπατιδίνης. Ο βρόγχος φουρκέτας έχει μία δυσδιάκριτη δομή β-φύλλου που σταθεροποιείται από τους τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα στις δύο αντιπαράλληλες πλευρές της (**σχήμα 1.3**). Οι ερευνητές αυτοί έχουν προτείνει οι κυστεΐνες που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς να είναι οι Cys1–Cys8, Cys2–Cys7, Cys3–Cys6, καθώς και οι γειτονικές Cys4–Cys5, που εντοπίζονται στη στροφή της φουρκέτας. Συνθετικό πεπτίδιο με τη δομή αυτή (human Hep25) κυκλοφορεί στο εμπόριο από την εταιρεία BACHEM.



Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ηπατιδίνης που απεικονίζει τους 4 δισουλφιδικούς δεσμούς (Cys1–Cys8, Cys2–Cys7, Cys3–Cys6 και Cys4–Cys5).¹⁴

Το 2009 οι Jordan et al. παρουσίασαν ένα νέο – διαφοροποιημένο πρότυπο δισουλφιδικών δεσμών κάνοντας χρήση χημικών και φασματοσκοπικών τεχνικών, καθώς και ανάλυση με ακτίνες X συγκρυστάλλων ηπατιδίνης και ενός ειδικού Fab τμήματος αντισώματος. Ο προσδιορισμός δομής με τις τεχνικές που χρησιμοποίησαν οι συγκεκριμένοι ερευνητές οδήγησε στους εξής δεσμούς ανάμεσα στις κυστεΐνες: Cys1–Cys8, Cys3–Cys6, Cys2–Cys4 και Cys5–Cys7 (**σχήμα 1.4**). Ωστόσο, αυτοί οι δεσμοί δημιουργήθηκαν σε πειραματικές συνθήκες και σε ακραίες θερμοκρασίες. Σε φυσιολογικές θερμοκρασίες το μόριο της ηπατιδίνης εμφάνιζε τάση αλληλομετατροπής ανάμεσα σε δύο διαφορετικές μορφές της στερεοδομής του μορίου, οι οποίες μπορούν ξεχωριστά να εντοπιστούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες.¹⁵ Με αυτή

τη δομή κυκλοφορεί στο εμπόριο από την εταιρεία Peptides International το συνθετικό πεπτίδιο Leap-1.



Σχήμα 1.4: Δομή ηπατιδίνης κατά Jordan et al.¹⁵

Πρόσφατα, μία ομάδα ερευνητών περιέγραψε λεπτομερώς και επιβεβαίωσε μερικά από τα προβλήματα που παρουσιάζονται σε σχέση με τη σταθερότητα του μορίου της ηπατιδίνης. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές αυτοί αναφέρουν ότι η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας (5-37°C) και οι διαφορετικές τιμές pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται η ηπατιδίνη 25 μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στο μόριο, καθώς μπορεί να αλλοιωθεί η αντιγονική του δομή, να σχηματιστούν διάφορα συσσωματώματα πιθανόν και από τη δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών, ενώ συχνά το μόριο εμφανίζει την τάση να προσκολλάται σε πλαστικές επιφάνειες.¹⁶ Παλαιότερες μελέτες είχαν προτείνει ότι η ηπατιδίνη θα μπορούσε να προσδένει μέταλλα, όπως ο Cu^{2+} και το Ni^{2+} , λόγω της παρουσίας του μοτίβου ATCUN στο αμινοτελικό της άκρο,¹⁷ και ότι η πρόσδεση του μετάλλου μπορεί να σταθεροποιήσει την δομή του μορίου αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Μελέτη με ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – mass spectrometry) έδειξε, χρησιμοποιώντας φυσική ανθρώπινη ηπατιδίνη εκχυλισμένη από δείγματα ούρων, συναπομόνωση της ηπατιδίνης 25 με ένα τουλάχιστον άτομο σιδήρου.¹⁸ Ο λόγος για τον οποίο η ηπατιδίνη μπορεί να

προσδένει σίδηρο δεν είναι γνωστός, εικάζεται, όμως, ότι μπορεί είτε να παίζει κάποιο λειτουργικό ρόλο στην ωρίμανση της είτε να αποτελεί τον συνδετικό κρίκο κατά την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα της.¹⁹

1.4 Λειτουργία της ηπατιδίνης

Αντιμικροβιακή δραστηριότητα – Έμφυτη ανοσία

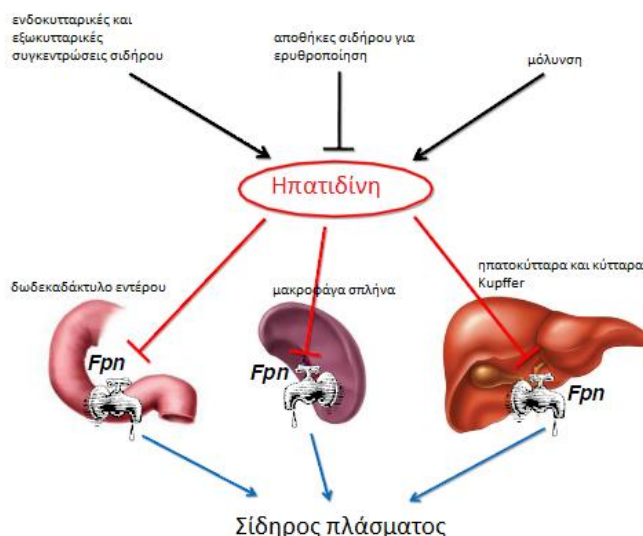
Είναι γνωστό ότι ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη βακτηρίων και ότι μικρή αύξηση των επιπέδων του καθιστά τον οργανισμό ευάλωτο σε μολύνσεις.²⁰ Τα βακτηριακά κύτταρα τείνουν να αναπτύσσουν διάφορους μηχανισμούς για να προσλαμβάνουν τον απαραίτητο για αυτά σίδηρο.²¹ Η αύξηση των επιπέδων σιδήρου στο αίμα συμβάλλει στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών.^{22,23} Σε απάντηση στις βακτηριακές λοιμώξεις, ο οργανισμός του ξενιστή έχει αναπτύξει μηχανισμούς που μειώνουν τη διαθέσιμη ποσότητα σιδήρου. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την αύξηση της παραγωγής πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον σίδηρο, τη μείωση της απορρόφησης του σιδήρου από την διατροφή, την αύξηση της παραγωγής της αιμοσφαιρίνης και την απελευθέρωση απολακτοφερίνης από τα ουδετερόφιλα. Οι Ganz et al. πρότειναν ότι η ηπατιδίνη παίζει το ρόλο μεσολαβητή στην έμφυτη ανοσία. Σε δείγματα ούρων ασθενών με συστηματικές λοιμώξεις βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της ηπατιδίνης ήταν έως και 100 φορές μεγαλύτερη από τη φυσιολογική.²⁴ Ως ορμόνη που ρυθμίζει τα επίπεδα σιδήρου, είναι αναμενόμενο να κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή. Τα βακτήρια χρειάζονται το σίδηρο για να παράξουν το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου. Αυτό το ένζυμο τα προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.^{25,26} Η ηπατιδίνη δημιουργεί ένα αφιλόξενο για αυτά περιβάλλον, αφού παρεμποδίζει την έξοδο του σιδήρου από τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα, μέσω της ενδοκυττάρωσης και κατόπιν αποικοδόμησης του εξαγωγέα του σιδήρου των κυττάρων, την φερροπορτίνη. Απουσία σιδήρου, τα βακτήρια δεν έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέσουν τη δισμουτάση του υπεροξειδίου και γίνονται πλέον ευάλωτα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σε *in vitro* πειράματα ότι το μόριο της ηπατιδίνης έχει αντιμυκητιακή δράση έναντι των *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*,

Aspergillus niger και *Saccharomyces cerevisiae* και αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus carnosus*, *Neisseria cinerea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Streptococcus* της ομάδας B, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.^{1,2} Ο μηχανισμός της μικροβιοκτόνου δράσης της ηπατιδίνης ίσως είναι παρόμοιος με αυτού των ντεφενσινών, οι οποίες εισέρχονται στη μεμβράνη των εισβαλόντων μικροοργανισμών οδηγώντας τους σε κυτταρικό θάνατο.²⁴ Οι ανθρώπινες ηπατιδίνη-25 και -20 έχουν βρεθεί να διαθέτουν αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δραστηριότητα *in vitro* σε συγκεντρώσεις 10-30mM.^{1,2} Όμως, οι τυπικές συγκεντρώσεις της ηπατιδίνης στα ούρα και το πλάσμα κυμαίνονται από 3 ως 30nM (10-100ng/ml) και μπορούν να αυξηθούν ως 10 φορές περίπου κατά τη διάρκεια φλεγμονής.^{27,28} Δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής δεδομένα που να υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωση της ηπατιδίνης μπορεί να φτάσει σε τόσο υψηλά επίπεδα στον οργανισμό, ώστε να είναι δυνατόν να δράσει αντιμικροβιακά. Γι' αυτό το λόγο, δεν είναι σαφές αν η μικροβιοκτόνος δραστηριότητα που εμφανίζει το μόριο σε *in vitro* μελέτες αποτελεί σημαντική βιολογική λειτουργία του ή αν πρόκειται για ένα κατάλοιπο της εξελικτικής του προέλευσης ή, ακόμα, αν αποτελεί τυχαία συνέπεια της στερεοχημικής του διαμόρφωσης, η οποία υπαγορεύεται από τη δράση του ως σιδηρορυθμιστικής ορμόνης.

1.5 Ο σιδηρορυθμιστικός ρόλος της ηπατιδίνης

Ο σίδηρος απορροφάται από το επιθήλιο του εντέρου κατά τη διατροφή και εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω του μεταφορέα μετάλλων DMT1.^{29,30} Στο εντερικό επιθήλιο ανάγεται από Fe^{3+} σε Fe^{2+} μέσω μιας οξειδοαναγωγής, του κυτοχρώματος B του δωδεκαδακτύλου (DcytB). Μόλις αναχθεί, μπορεί να αποθηκευτεί στη φερριτίνη ή να κινηθεί προς τη βασεοπλευρική (basolateral) επιφάνεια του κυττάρου, από όπου θα εξαχθεί μέσω της φερροπορτίνης. Κατά την έξοδό του επαναοξειδώνεται σε Fe^{3+} μέσω μιας οξειδάσης, της ηφαιστίνης, και έτσι διευκολύνεται η ενσωμάτωση του στην τρανσφερρίνη, η οποία τον κατανέμει στους διάφορους ιστούς.³¹ Τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα και ο σίδηρος που περιείχαν εξέρχεται από αυτά μέσω της φερροπορτίνης με την

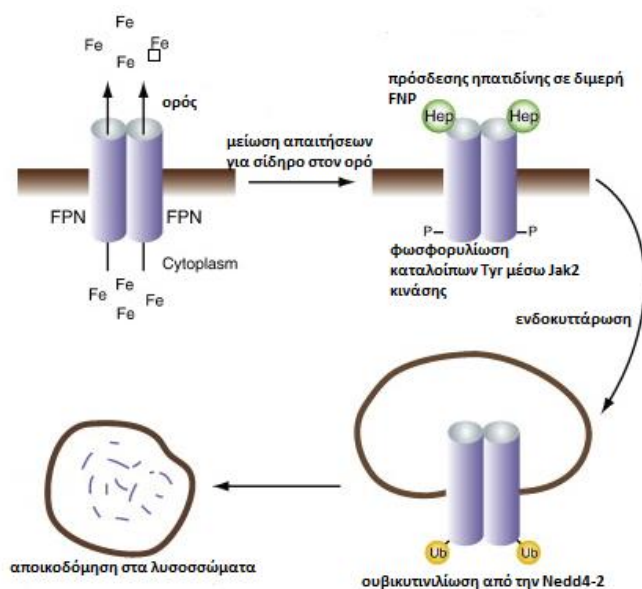
οξειδωσή τους από την σερουλοπλασμίνη του πλάσματος. Επιπλέον, τα μακροφάγα προσλαμβάνουν τον σίδηρο από την τρανσφερρίνη, μέσω του μεταφορέα DMT1, και τον ενσωματώνουν σε διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και της φερριτίνης. Τα επίπεδα σιδήρου στον οργανισμό διατηρούνται σταθερά είτε μέσω της ανακύκλωσης του από τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα, είτε από άλλες πηγές (π.χ. διατροφή). Για να διατηρηθεί η ισορροπία και να αποφευχθεί η υπερβολική απορρόφηση σιδήρου από το εντερικό επιθήλιο, αλλά και για να ρυθμιστεί η ταχύτητα απελευθέρωσης του σιδήρου από τα μακροφάγα, εμπλέκονται διάφοροι σημαντικοί μηχανισμοί ομοιόστασης του σιδήρου,³² όπως φαίνεται στο **σχήμα 1.5**.



Σχήμα 1.5: Η ηπατιδίνη κατέχει κύριο ρόλο στην ομοιόσταση του σιδήρου. Η σύνθεση της ελέγχεται σε μεταγραφικό επίπεδο από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι αναλύονται στο κείμενο. Η ηπατιδίνη ελέγχει τα επίπεδα σιδήρου του πλάσματος συνδεόμενη με τη φερροπορτίνη των κυττάρων που εξαγουν σίδηρο στην κυκλοφορία, όπως τα ηπατοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα εντεροκύτταρα (προσαρμοσμένο από την παραπομπή 32).

Η ηπατιδίνη δρα ως γενικός ρυθμιστής του σιδήρου καθώς ελέγχει τη μεταφορά του από τα κύτταρα προς τη κυκλοφορία.³³ Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με την πρόσδεση της ηπατιδίνης στον υποδοχέα της

(φερροπορτίνη), την φωσφορυλίωση της και την ακόλουθη ενδοκυττάρωση και αποικοδόμησή της στα λυσοσώματα (**σχήμα 1.6**). Η ηπατιδίνη, έτσι, αναστέλλει την απορρόφηση του σιδήρου από το εντερικό επιθήλιο,^{2,34} την απελευθέρωση του από τα μακροφάγα^{35,36} καθώς και το πέρασμα του σιδήρου μέσω του πλακούντα.³⁴

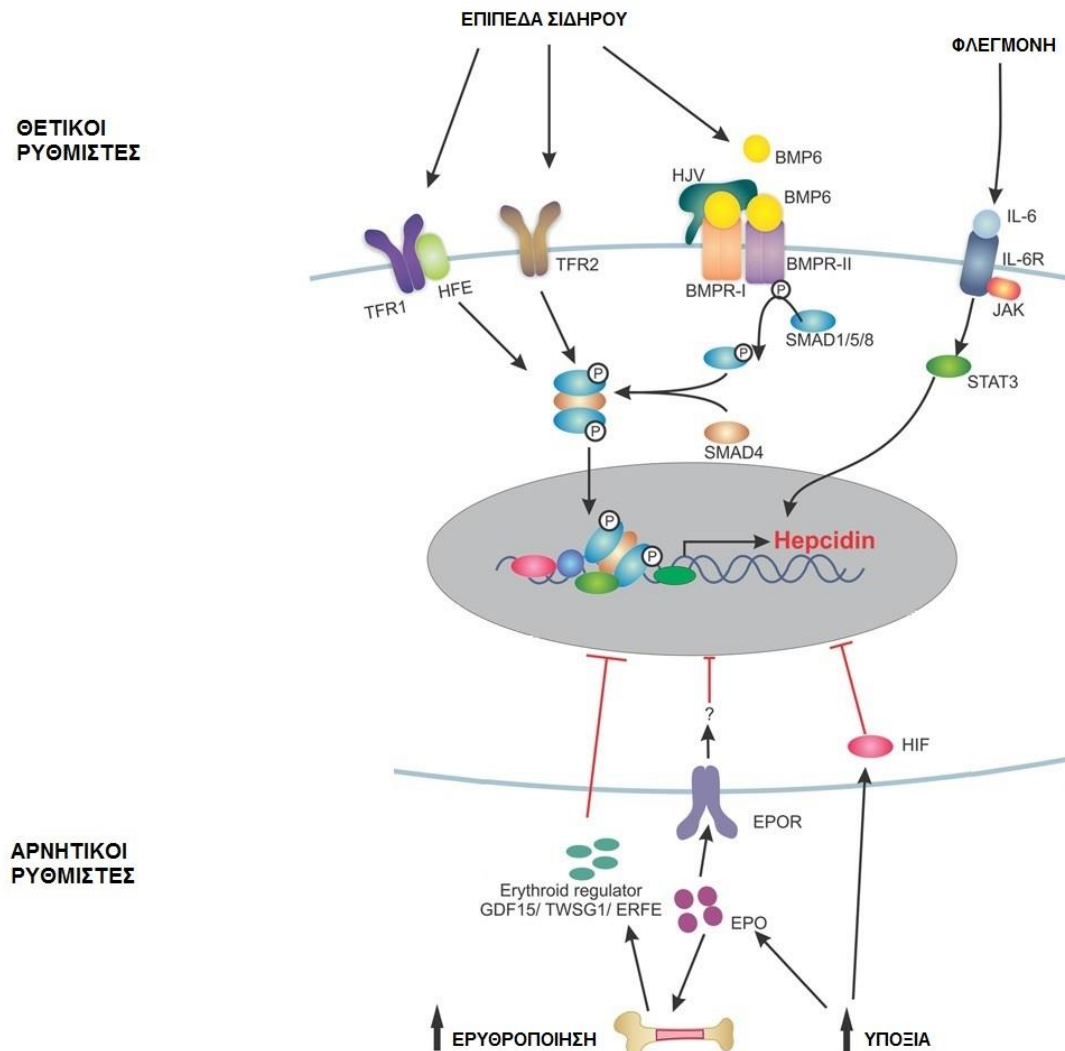


Σχήμα 1.6: Μοντέλο ενδοκυττάρωσης και αποικοδόμησης της φερροπορτίνης. Η ηπατιδίνη προσδένεται στη φερροπορτίνη της κυτταρικής μεμβράνης και οδηγεί στη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης. Μόλις η φερροπορτίνη ενδοκυτταρωθεί, οι φωσφορικές ομάδες απομακρύνονται και η φερροπορτίνη ουβικυτινιλιώνεται, γεγονός το οποίο την οδηγεί προς αποικοδόμηση στα λυσοσώματα (προσαρμοσμένο από την παραπομπή 34).

1.6 Ρύθμιση σύνθεσης της ηπατιδίνης

Η ηπατιδίνη, όπως κάθε ορμόνη η οποία είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση έκφρασης άλλων πρωτεϊνών στον οργανισμό, επιδέχεται ρύθμιση της έκφρασής της από άλλους παράγοντες. Η ρύθμιση της έκφρασης της ηπατιδίνης γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την μεταγραφή της ηπατιδίνης είναι η συγκέντρωση του σιδήρου στο πλάσμα και στο ήπαρ, η

ανάγκη για σίδηρο κατά την ερυθροποίηση, η κατάσταση φλεγμονής και οι συνθήκες υποξίας.³⁷



Σχήμα 1.7: Θετικοί και αρνητικοί ρυθμιστές της ηπατιδίνης (προσαρμοσμένο από την παραπομπή 126).

1.6.1 Ρύθμιση της ηπατιδίνης από την συγκέντρωση σιδήρου – Το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP/SMAD

Η ρύθμιση της ηπατιδίνης από τη συγκέντρωση του σιδήρου στο αίμα γίνεται μέσω ανάδρασης, δηλαδή η ύπαρξη μεγάλων συγκεντρώσεων σιδήρου οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της ηπατιδίνης. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί με

πειράματα σε ποντίκια ότι τα επίπεδα mRNA της ηπατιδίνης αυξάνονται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σιδήρου, ενώ μειώνονται σε κατάσταση αναιμίας.³⁸ Η αυξημένη έκφραση της ηπατιδίνης στα ηπατοκύτταρα και οι μελέτες της ρύθμισής της καθιστούν το ήπαρ ως το κέντρο ελέγχου της συστημικής ρύθμισης της ομοιοστασίας του σιδήρου.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η ρύθμιση της έκφρασης της ηπατιδίνης από τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις του εξωκυττάριου σιδήρου εμπλέκει τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (bone morphogenetic proteins - BMP).³⁹ Οι BMP ανήκουν στην υπεροικογένεια των κυτταροκινών TGF- β , με σημαντική δράση σε διάφορες βιολογικές διεργασίες όπως την ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση. Οι BMP δρουν μέσω πρόσδεσης στους ειδικούς υποδοχείς τους, τύπου I και II, η οποία οδηγεί σε φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών R-SMAD στο κυτταρόπλασμα.⁴⁰ Αυτές αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SMAD4, η οποία με τη σειρά της μετατοπίζεται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Διακοπή του γονιδίου *smad4* σε ηπατοκύτταρα ποντικών οδήγησε σε υπερσυσσώρευση σιδήρου και μειωμένα επίπεδα mRNA της ηπατιδίνης,⁴¹ γεγονός που υποδεικνύει ότι η Smad4 εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *hamp*. Μελέτες *in vitro* σε ηπατικές κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι από όλες τις BMP, μόνο οι BMP2, 4, 5, 6, 7 και 9 έχουν την δυνατότητα να αυξάνουν την έκφραση της ηπατιδίνης. Πειραματικά δεδομένα *in vivo* υπάρχουν για την BMP2, η οποία μετά από ένεση της σε ποντίκια οδήγησε σε αύξηση του mRNA της ηπατιδίνης και μείωση της συγκέντρωσης του σιδήρου στον ορό.⁴² Πειράματα σε ποντίκια null *Bmp6* παρουσιάζουν μειωμένη μεταγραφή του γονιδίου της ηπατιδίνης, υποδεικνύοντας ότι η BMP6 αποτελεί τον κύριο προσδέτη του υποδοχέα BMP.⁴³ Επιπλέον, η χορήγηση εξωγενούς BMP6 στα ποντίκια αυτά οδηγεί σε δοσοεξαρτώμενη μείωση του σιδήρου και του κορεσμού της τρανσφερρίνης στον ορό, με ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης της ηπατικής ηπατιδίνης, γεγονός που ενισχύει τις προηγούμενες ενδείξεις, ότι η BMP6 είναι αναγκαία για τη σωστή ρύθμιση του γονιδίου *hamp*.⁴² Τα διάφορα μέλη της οικογένειας των BMP αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τους υποδοχείς τύπου I και

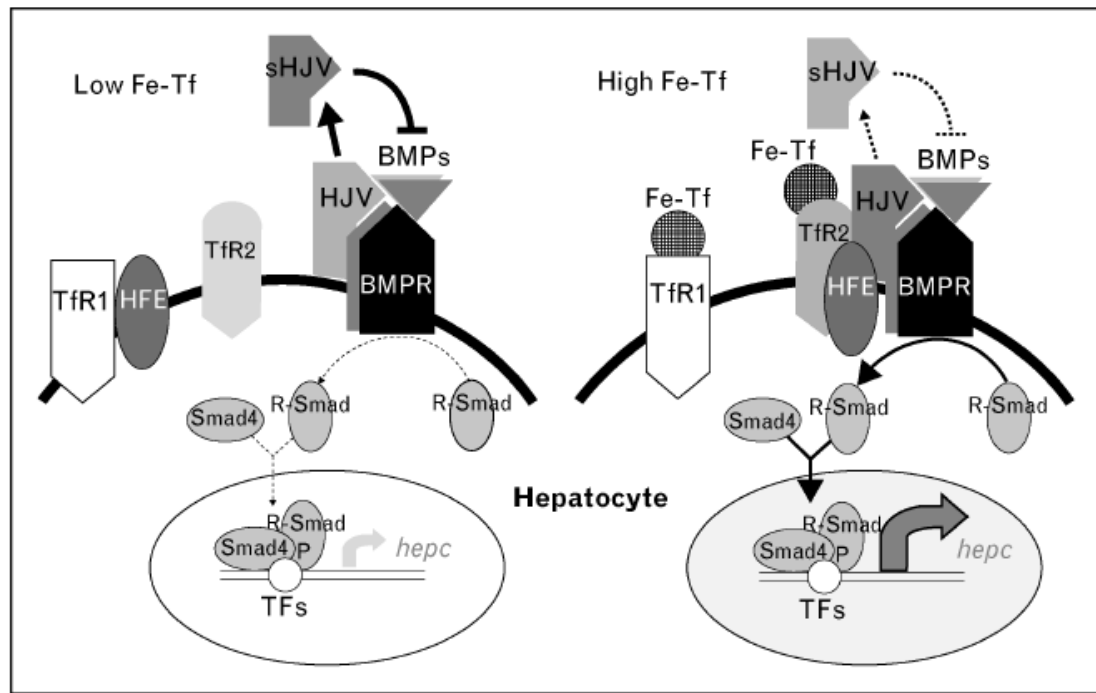
II, καθιστώντας έτσι το ρυθμιστικό αυτό μονοπάτι έκφρασης της ηπατιδίνης αρκετά περίπλοκο.

Στο μονοπάτι BMP/SMAD εμπλέκονται και άλλες πρωτεΐνες, όπως ο υποδοχέας τρανσφερρίνης τύπου 2 (TfR2) και η αιμοτζουβελίνη (hemojuvelin, HJV), η οποία είναι συν-υποδοχέας BMP.⁴⁴ Μετάλλαξη των γονιδίων τους οδηγεί σε μειωμένη έκφραση ηπατιδίνης και σε αυξημένες συγκεντρώσεις σιδήρου.⁴⁴ Στον οργανισμό υπάρχουν δύο μορφές της HJV, οι οποίες δρουν ανταγωνιστικά η μία προς την άλλη. Η μία μορφή της είναι προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλης (GPI) και επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMP και άρα και την έκφραση της ηπατιδίνης.⁴⁵ Η άλλη βρίσκεται σε διαλυτή μορφή, προέρχεται από πρωτεολυτική διάσπαση της ώριμης πρωτεΐνης⁴⁶ και δρα ανταγωνιστικά των BMP.^{45,47} Πειραματικά δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαλυτή αυτή μορφή της HJV εμπλέκεται στη μετάδοση ενός σήματος που έχει σχέση με τα αποθέματα σιδήρου στον οργανισμό.^{45,47} Είναι πιθανόν η διαλυτή HJV, μέσω πρόσδεσης στους υποδοχείς των BMP, να αποτρέπει τον σχηματισμό συμπλόκου τους με την προσδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη HJV ή μπορεί να προσδένει απευθείας τις BMP, απομακρύνοντας τον συνδέτη και να παρεμποδίζει με αυτόν τον τρόπο τη μετάδοση του σήματος. Επίσης, έχει την ιδιότητα να δημιουργεί σύμπλοκο με τη νεογενίνη (neogenin),^{47,48} το οποίο αναστέλλει την απελευθέρωση της HJV σε απόκριση στον σίδηρο.⁴⁹

Μία άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *hamp* είναι η ματριπτάση (TMPRSS6), η οποία δρα ανοδικά στο μονοπάτι BMP/SMAD ως αρνητικός ρυθμιστής της ηπατιδίνης. Ασθενείς με μεταλλαγές στο γονίδιο TMPRSS6 αναπτύσσουν IRIDA (iron refractory iron deficiency anemia), ασθένεια κατά την οποία παρατηρείται υπερέκφραση της ηπατιδίνης και αναιμία. Η ματριπτάση είναι πρωτεάση και δρα πρωτεολυτικά υδρολύοντας την HJV και κατά συνέπεια καταστέλλει το μονοπάτι BMP/SMAD. Έτσι μειώνει και τη μεταγραφή του γονιδίου *hamp*.⁵⁰⁻⁵²

Τέλος, στον έλεγχο της έκφρασης του γονιδίου *hamp* ενέχονται μόρια στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων, τα οποία ανιχνεύουν τα επίπεδα του σιδήρου στην κυκλοφορία, δηλαδή το σύμπλεγμα σιδήρου – τρανσφερρίνης (Fe-Tf) και ενεργοποιούν μεταφραστικά μονοπάτια. Τέτοια αισθητήρια μόρια του

σιδήρου είναι οι σχετιζόμενες με την αιμοχρωμάτωση (ΗΗ) πρωτεΐνες, οι HFE (High FE) και ο TfR2, καθώς και η κλασσική πρωτεΐνη TfR1.⁵³⁻⁵⁵ Μεταλλαγές στον TfR2 και στην HFE είναι υπεύθυνες για τη μείωση της έκφρασης της ηπατιδίνης και τη συνεπακόλουθη εμφάνιση κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης.^{56,57} Μελέτες έχουν δείξει ότι η HFE αλληλεπιδρά με τον TfR1, αλλά αποδεσμεύεται από αυτόν παρουσία του συμπλόκου Fe-Tf, γεγονός που σημαίνει ότι η ελεύθερη HFE είναι ανάλογη της ποσότητας του Fe-Tf.^{53,58} Επιπλέον, η έκφραση της ηπατιδίνης βρέθηκε ότι είναι ανάλογη της ποσότητας του HFE που δεν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τον TfR1 σε *in vivo* πειράματα με διαγονιδιακά ποντίκια.⁵⁹ Ως αισθητήριο μόριο του σιδήρου φαίνεται ότι δρα και ο TfR2, καθώς επίδραση με το σύμπλοκο Fe-Tf τον σταθεροποιεί.^{54,55,60} Οι πρωτεΐνες TfR2 και HFE αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, με αποτέλεσμα ο TfR2 να ανταγωνίζεται τον TfR1 για την πρόσδεση στην HFE.⁵³ Ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο δρουν τα παραπάνω αισθητήρια μόρια στον εξωκυττάριο σίδηρο είναι πιθανότατα το σηματοδοτικό μονοπάτι των HJV/BMP (σχήμα 1.8). Με βάση τον μηχανισμό αυτό, όταν η συγκέντρωση της ολοτρανσφερρίνης (Fe-Tf) είναι χαμηλή, η HFE αλληλεπιδρά με τον TfR1, η συγκέντρωση του TfR2 είναι χαμηλή και η διαλυτή HJV απελευθερώνεται από το κύτταρο και δρα ανταγωνιστικά με το μονοπάτι των BMP, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης της ηπατιδίνης. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση της ολοτρανσφερρίνης είναι υψηλή, αυτή προσδένεται στον TfR2 και στον TfR1. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του TfR2, την απομάκρυνση της HFE από τον TfR1 και την πρόσδεση της στον TfR2. Το σύμπλοκο HFE/TfR2 αλληλεπιδρά με την HJV, παράγεται λιγότερη διαλυτή HJV, και ενεργοποιείται το μονοπάτι των BMP, επάγοντας τη μεταγραφή της ηπατιδίνης.⁶¹



Σχήμα 1.8: Μοντέλο του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης της ηπατιδίνης από τον κυκλοφορούντα σίδηρο. Αυξημένη συγκέντρωση Fe-Tf οδηγεί στη δημιουργία του υπερσυμπλέγματος των HFE, TfR2, HJV, BMP και BMPR, επάγοντας το μονοπάτι των BMP και την παραγωγή της ηπατιδίνης. BMPR, υποδοχέας των BMP; TF, transcription factors, μεταγραφικοί παράγοντες (προσαρμοσμένο από την παραπομπή 61).

1.6.2 Ρύθμιση της ηπατιδίνης σε κατάσταση φλεγμονής

Σε καταστάσεις φλεγμονής, η απορρόφηση του σιδήρου από τα εντεροκύτταρα μειώνεται μέσω της αύξησης της ηπατιδίνης.³⁸ Επίσης, παρατηρείται αναιμία χρόνιας νόσου (Anemia Chronic Disease, ACD) σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής.

Η ηπατιδίνη είναι μία πρωτεΐνη οξείας φάσης II, καθώς η έκφραση της επάγεται από την ιντερλευκίνη-6 (IL-6) *in vitro* σε ηπατικές κυτταρικές σειρές,²⁸ ενώ δεν επάγεται από τις κυτταροκίνες που συμμετέχουν σε αποκρίσεις τύπου I, όπως είναι ο TNF-α και η IL1α. Ένας άλλος παράγοντας φλεγμονής που επάγει την έκφραση της ηπατιδίνης είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), πιθανόν μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα TLR-4 (Toll Like Receptor 4) των ηπατοκυττάρων.^{62,63} Απόδειξη αυτού αποτελεί το

γεγονός ότι διαγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του TLR4 δεν παρουσίασαν υπερέκφραση της ηπατιδίνης μετά από επίδραση με LPS.⁶⁴

Η IL-6 δρα μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της και έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του σηματοδοτικού μονοπατιού STAT3 (signal transduction and activator of transcription 3, μεταδότης σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3), μέσω της φωσφορυλίωσής του από τις κινάσες Ιανός (Janus Kinases, JAK). Η φωσφορυλιωμένη STAT3 μετατοπίζεται στον πυρήνα και προσδένεται στο γονίδιο *hamp* σε ένα συντηρημένο στοιχείο DNA στην περιοχή του υποκινητή, επάγωντας την έκφρασή του.⁶⁵

Παρόλο που αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει επαρκώς τη σχέση ανάμεσα στη φλεγμονή και την ηπατιδίνη, υπάρχουν ενδείξεις ότι η απόκριση της ηπατιδίνης στην ιντερλευκίνη-6 (IL-6) απαιτεί και τη συνεργιστική δράση του μονοπατιού BMP. Σε ποντίκια με αφαίρεση του γονιδίου του *Smad4* στα ηπατοκύτταρά τους, δεν ήταν δυνατή η επαγωγή της έκφρασης της ηπατιδίνης μετά από χορήγηση IL-6.⁴¹ Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η διαλυτή HJV και διάφοροι χημικοί αναστολείς των BMP στα ηπατοκύτταρα λειτουργούν σαν αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής της ηπατιδίνης σε απόκριση στην IL-6.^{41,42,66} Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο υποδοχέας BMP τύπου I, Alk3, είναι απαραίτητος για την απόκριση της ηπατιδίνης στην IL-6.⁶⁷

1.6.3 Ρύθμιση της ηπατιδίνης κατά την ερυθροποίηση

Το μεγαλύτερο ποσοστό του σιδήρου στον οργανισμό βρίσκεται στην αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων και, κατά συνέπεια, η ανάγκη σε σίδηρο συνδέεται άμεσα με τον ρυθμό της ερυθροποίησης. Έχει παρατηρηθεί ότι όταν επάγεται η ερυθροποίηση, αναστέλλεται η έκφραση της ηπατιδίνης έτσι, ώστε να αυξηθεί η πρόσληψη του σιδήρου.^{34,68} Αντίθετα, αναστολή της ερυθροποίησης είτε με ακτινοβολία είτε με μεταμεταγγιστική πολυκυταιμία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ηπατιδίνης.^{69,70} Επιπλέον, η ηπατιδίνη έχει βρεθεί *in vivo* να μειώνεται τόσο σε ασθενείς που πάσχουν από σιδηροπενική αναιμία ή από κληρονομικές μορφές αναιμίας, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική ερυθροποίηση.^{71,72} Σε περιπτώσεις

αιμορραγιών ή αιμόλυσης, όπου απαιτείται αύξηση στο ρυθμό σχηματισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η έκφραση της ηπατιδίνης μειώνεται.^{34,73} Ο μηχανισμός αυτός καταστολής της ηπατιδίνης από την ερυθροποίηση φαίνεται να υπερισχύει της επαγωγής της από αυξημένα επίπεδα σιδήρου, όπως στις περιπτώσεις μεσογειακής αναιμίας, στις οποίες γίνονται συχνά μεταγγίσεις αίματος και υπάρχει συσσώρευση σιδήρου στον οργανισμό. Παρά την αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου, η συνεχής προσπάθεια ερυθροποίησης οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ηπατιδίνης.³⁷

Ένα μόριο-κλειδί στην ερυθροποίηση είναι η ερυθροποιητίνη (EPO), η οποία παράγεται κυρίως στους νεφρούς και ρυθμίζει την ταχύτητα παραγωγής ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθώς υποβοηθά την ωρίμανση και ανάπτυξη των ερυθροβλαστών. Όταν χορηγηθεί EPO σε ανθρώπους, τα επίπεδα της διαλυτής ηπατιδίνης μειώνονται δραστικά, γεγονός που υποδεικνύει ότι η EPO ρυθμίζει την ηπατιδίνη.⁷⁴ Σε ποντίκια όπου χορηγούνται αναστολείς της ερυθροποίησης ή φαινυλο-υδραζίνη, η αύξηση της EPO δεν οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης της ηπατιδίνης.^{70,75} Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι αν και η EPO ρυθμίζει την έκφραση της ηπατιδίνης, η ρύθμιση αυτή είναι ανεξάρτητη από την απευθείας επίδραση της ερυθροποιητίνης και θα πρέπει να εμπλέκεται ένας ερυθροειδής παράγοντας. Η ανάλυση πρωτογενών ανθρώπινων ερυθροβλαστών με μικροσυστοιχίες υπέδειξε μόρια των οποίων επάγεται η έκφρασή σε ανάγκες ερυθροποίησης. Τα μόρια αυτά είναι ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 15 (GDF15),⁷⁶ η ερυθροφερόνη (ERFE)⁷⁷ και ο σηματοδοτικός παράγοντας ρύθμισης του BMP στρεβλωμένης γαστριδίωσης 1 (twisted gastrulation BMP signaling modulator 1, TWSG1).⁷⁸ Τα μόρια αυτά καταστέλλουν την έκφραση της ηπατιδίνης σε ηπατικά κύτταρα.^{76,78} Ο μηχανισμός με τον οποίο οι παραπάνω παράγοντες συμβάλλουν στην αναστολή της ηπατιδίνης είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

1.6.4 Ρύθμιση της ηπατιδίνης σε συνθήκες υποξίας

Η υποξία είναι η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου στον οργανισμό. Για την αντιμετώπιση της ο οργανισμός αυξάνει την ερυθροποίηση, ώστε να αυξηθεί

η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Όπως και στην περίπτωση της ερυθροποίησης, τα επίπεδα της ηπατιδίνης είναι μειωμένα.³⁸

Σε συνθήκες υποξίας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα (HIF) αυξάνονται. Οι υπομονάδες του HIF, HIF1α, HIF2α και HIF3α σε φυσιολογικές συνθήκες, παρουσία του οξυγόνου αλλάζουν δομή από τις προλυλο-αφυδροδρογονάσεις (PHD) και αποικοδομούνται στο πρωτεάσωμα.⁷⁹ Σε υποξικές όμως συνθήκες, οι υπομονάδες μεταφέρονται στον πυρήνα και ύστερα από τον ετεροδιμερισμό τους με τον HIF1β συνδέονται στις περιοχές HRE (Hypoxia Responsive Elements) στο DNA του γονιδίου-στόχου και ρυθμίζουν την έκφρασή τους. Αν και ο μηχανισμός ρύθμισης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, σε ποντίκια όπου το γονίδιο έκφρασης του HIF1α είχε διακοπεί, σε συνθήκες υποξίας δεν παρατηρήθηκε μείωση της ηπατιδίνης, υποδεικνύοντας την μη εμπλοκή του HIF στον μηχανισμό ρύθμισης της ηπατιδίνης.⁸⁰ Ο μηχανισμός ρύθμισης του γονιδίου *hamr* φαίνεται να μην γίνεται άμεσα από τους HIF, αλλά μέσω αλλαγών στην έκφραση άλλων πρωτεϊνών, όπως ο TfR2,⁸¹ η ματριπτάση (TMPRSS6)⁸² και η φουρίνη (furin), η οποία μέσω πρωτεόλυσης της HJV μειώνει την επαγωγική της δράση στη μεταγωγή σήματος μέσω του μονοπατιού BMP/SMAD.^{50,83}

1.6.5 Διαταραχές του μεταβολισμού του σιδήρου στον άνθρωπο στις οποίες εμπλέκεται η ηπατιδίνη

Πρωτογενείς διαταραχές

Η ηπατιδίνη έχει βρεθεί ότι συμβάλλει ενεργά στην παθογένεση πολλών διαταραχών του μεταβολισμού του σιδήρου στον άνθρωπο. Ως πρωτογενείς διαταραχές αναφέρονται εκείνες που προκύπτουν από ελλείψεις σε γονίδια που κωδικοποιούν την ηπατιδίνη, την φερροπορτίνη ή τους φυσιολογικούς τους ρυθμιστές. Οι πρωτογενείς διαταραχές μπορούν να διακριθούν σε εκείνες στις οποίες παρατηρείται έλλειψη ηπατιδίνης, αντίσταση στην ηπατιδίνη, υπερέκφραση ηπατιδίνης και υποτρανσφερριναιμία. Έλλειψη ηπατιδίνης εμφανίζεται στην κληρονομική⁸⁴ και νεανική⁸⁵ αιμοχρωμάτωση. Οι αιτίες της αιμοχρωμάτωσης αφορούν κατά κύριο λόγο κληρονομήσιμες μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά του σιδήρου και τη

ρύθμιση της ομοιόστασής του και οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την υπερβολική απορρόφηση του από τη γαστρεντερική οδό. Η αντίσταση στην ηπατιδίνη οφείλεται σε μεταλλαγές στην φερροπορτίνη που επηρεάζουν την πρόσδεση της ηπατιδίνης σε αυτή, εμποδίζοντάς την ενδοκυττάρωσή της.⁸⁶ Η πιο καλά χαρακτηρισμένη μεταλλαγή της φερροπορτίνης είναι η C326S, η οποία προκαλεί πρώιμη παρεγχυματική συσσώρευση σιδήρου με αυξημένα ή υψηλά επίπεδα ηπατιδίνης.⁸⁷ Υπερέκφραση ηπατιδίνης προκαλείται από μεταλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί την μεμβρανική πρωτεάση σερίνης ματριπτάση 2 (TMPRSS6). Η ματριπτάση 2 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της ηπατιδίνης και η διαταραχή που προκύπτει καλείται IRIDA (iron refractory iron deficiency anemia). Παρά την σοβαρή έλλειψη σιδήρου, η οποία θα αναμενόταν φυσιολογικά να αναστέλλει την παραγωγή ηπατιδίνης, οι ασθενείς με IRIDA επιδεικνύουν υψηλά φυσιολογική ή ακόμα και αυξημένη ηπατιδίνη ορού.⁸⁸ Τέλος, καταστάσεις υποτρανσφερριναϊμίας υποδεικνύουν ότι η τρανσφερρίνη εμπλέκεται άμεσα στην ρύθμιση της ηπατιδίνης. Η έλλειψη της ηπατιδίνης σε αυτή την ασθένεια προκαλείται είτε από μειωμένη διέγερση των αισθητήρων του σιδήρου που ρυθμίζουν την παραγωγή ηπατιδίνης, είτε από το κατασταλτικό αποτέλεσμα που μπορεί να έχει η διέγερση του μυελού των οστών μέσω της ερυθροποιητίνης στην παραγωγή ηπατιδίνης.⁸⁹

Δευτερογενείς διαταραχές

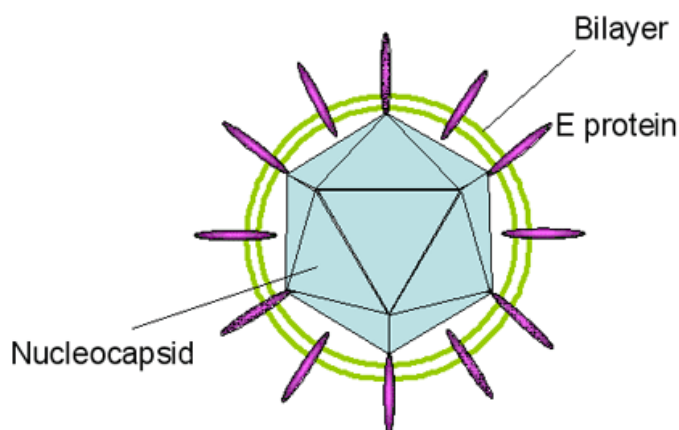
Ως δευτερογενείς διαταραχές αναφέρονται αυτές που προκαλούνται από ασθένειες οι οποίες δεν προέρχονται από τον μηχανισμό ομοιόστασης του σιδήρου, αλλά τον επηρεάζουν έμμεσα. Οι δευτερογενείς διαταραχές μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το αν παρουσιάζουν αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης της ηπατιδίνης. Σε εκείνες τις διαταραχές όπου παρατηρείται αύξηση της ηπατιδίνης συγκαταλέγονται η αναιμία της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (CKD), η φλεγμονώδης αναιμία (ή αναιμία της χρόνιας νόσου) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Όσον αφορά τους ασθενείς με CKD, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ηπατιδίνης στην κυκλοφορία του αίματος, πιθανόν λόγω της μειωμένης νεφρικής λειτουργίας και της φλεγμονώδους κατάστασης που δημιουργείται.⁹⁰ Η φλεγμονώδης αναιμία (AI) ή αναιμία της χρόνιας νόσου (ACD) αποτελεί ένα από τα πιο κοινά κλινικά σύνδρομα και

παρατηρείται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες λοιμώξεις και από φλεγμονώδη ή νεοπλασματικά νοσήματα. Συνοδεύεται από χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου και τρανσφερρίνης στον ορό παρά τις επαρκείς ποσότητες του στον μυελό των οστών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μειωμένη κινητοποίηση του σιδήρου από τις αποθήκες του.⁹¹ Στην διαταραχή αυτή εμπλέκονται αρκετοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί (κυρίως κυτοκίνες).⁹² Τέλος, η ρευματοειδής αρθρίτιδα αποτελεί μία χρόνια φλεγμονώδη νόσο των αρθρώσεων, στην οποία η έκφραση της ηπατιδίνης επάγεται μέσω της IL-6.⁹³ Μειωμένη ηπατιδίνη παρατηρείται σε αναιμίες που σχετίζονται με υπερσυσσώρευση σιδήρου, σε χρόνιες παθήσεις του ήπατος (ηπατίτιδα C), στην φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD), στην αθηροσκλήρωση και στη σιδηροπενική αναιμία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αναιμιών που σχετίζονται με υπερσυσσώρευση σιδήρου είναι η β-θαλασσαιμία, η συγγενής δυσερυθροποιητική αναιμία τύπου I και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, τα οποία χαρακτηρίζονται από αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Η συγκέντρωση ηπατιδίνης σε ασθενείς με αυτές τις διαταραχές, που δεν υποβάλλονται σε μετάγγιση, είναι πολύ χαμηλή παρά τα υψηλά επίπεδα φερριτίνης στον ορό, και βιοψίες στο ήπαρ καταδεικνύουν σοβαρή υπερσυσσώρευση σιδήρου.⁷¹ Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C συχνά παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση φερριτίνης και εναπόθεση σιδήρου στο ήπαρ.⁹⁴ Αύξηση παρατηρείται, επίσης, στη συγκέντρωση του σιδήρου στον ορό και στον κορεσμό της τρανσφερρίνης, ενώ ιδιαίτερα ενδιαφέρον εύρημα είναι η μείωση των επιπέδων του mRNA της ηπατιδίνης. Η μειωμένη ηπατιδίνη οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα φερροπορτίνης και άρα αυξημένη απορρόφηση και ανακύκλωση σιδήρου, με αποτέλεσμα τη συνεπακόλουθη συσσώρευση του στο ήπαρ.⁹⁵ Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) χαρακτηρίζεται από αλληλεπίδραση φλεγμονωδών και κυτοτοξικών μηχανισμών και παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα ηπατιδίνης ορού, υποδεικνύοντας ότι πιθανά διαδραματίζει ρόλο στην εντερική φλεγμονή. Φαίνεται ότι τα επίπεδα της ηπατιδίνης επηρεάζονται από την IL-6.⁹³ Στην αθηροσκλήρωση, μειωμένα επίπεδα ηπατιδίνης μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένο φορτίο των μακροφάγων σε σίδηρο και αυτό, με την σειρά του, σε αύξηση της πρόσληψης των λιπιδίων και διευκόλυνση σχηματισμού αθηρωματικών πλακών.⁹³ Τέλος, η σιδηροπενική αναιμία αποτελεί ένα από τα

σημαντικότερα προβλήματα υγείας παγκοσμίως. Γενικά, εμφανίζεται σε κάθε περίπτωση όπου η πρόσληψη του σιδήρου από την διατροφή δεν μπορεί να ικανοποιήσει τις ανάγκες του οργανισμού. Έχει βρεθεί, τόσο από *in vitro* πειράματα,³⁴ όσο και από μετρήσεις σε ανθρώπους,^{10,28} ότι τα επίπεδα της ηπατιδίνης είναι χαμηλά σε αυτή τη μορφή αναιμίας, όπως θα ήταν αναμενόμενο λόγω των αυξημένων αναγκών ερυθροποίησης και της χαμηλής συγκέντρωσης του σιδήρου στον οργανισμό.

1.6.6 Ρύθμιση της ηπατιδίνης από τον ιό της ηπατίτιδας C

Ο ιός της ηπατίτιδας C ανήκει στο γένος *Hepacivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*,⁹⁶ Ο HCV είναι ηπατοτρόπος ιός, ενώ εμφανίζει και εξωηπατικό πολλαπλασιασμό σε B και T λεμφοκύτταρα. Τα ιικά σωματίδια είναι σφαιρικά, διαμέτρου 50nm.

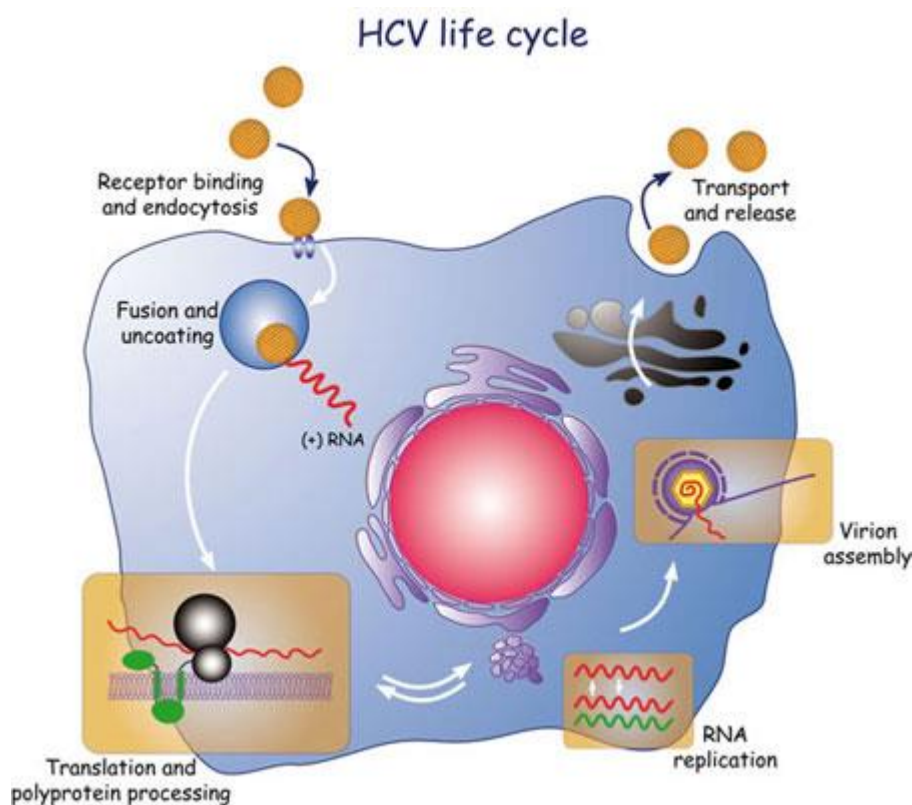


Σχήμα 1.9: Ο ιός της ηπατίτιδας C. Διακρίνονται το ιικό καψίδιο και ο φάκελος.

Ο κύκλος ζωής του HCV περιλαμβάνει τα εξής στάδια:^{97,98}

1. Αλληλεπίδραση με τον ιικό υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή
2. Ενδοκυττάρωση του ιικού σωματιδίου.
3. Σύντηξη του ιικού φακέλλου και των μεμβρανών του ενδοσώματος λόγω του όξινου pH.
4. Απελευθέρωση του ιικού RNA.

5. Μετάφραση του ιικού RNA μέσω της εσωτερικής θέσης πρόσβασης του ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης.
6. Αναπαραγωγή του ιικού RNA μέσω της σύνθεσης συμπληρωματικού κλώνου αρνητικής πολικότητας.
7. Συγκρότηση νουκλεοκαψιδίων και απόκτηση φακέλου με μετάβαση σε μεμβρανικά κυστίδια
8. Ωρίμανση και μεταφορά των ιικών σωματιδίων στην κυτταρική επιφάνεια.
9. Απελευθέρωση του ιού με εξωκυττάρωση.



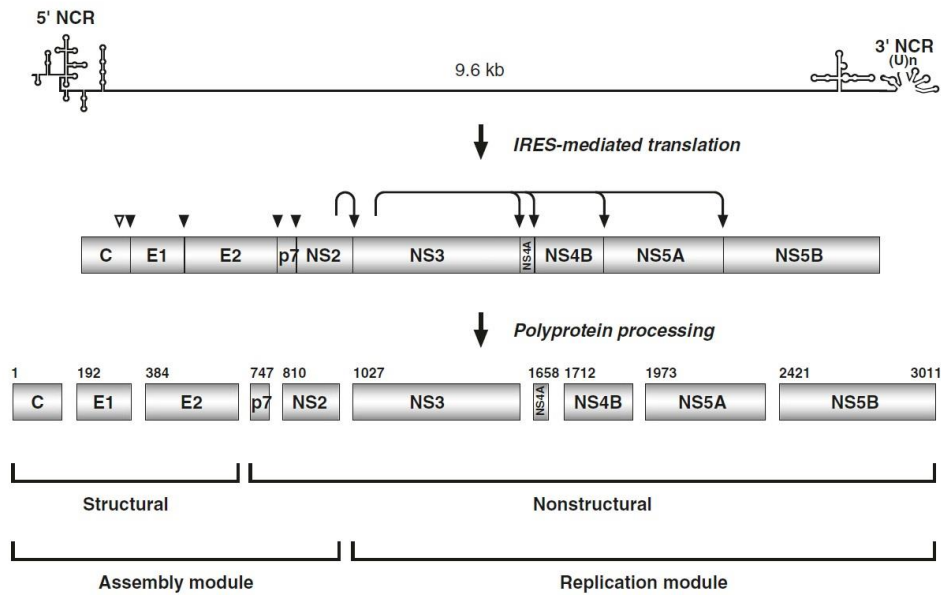
Σχήμα 1.10: Ο κύκλος ζωής του HCV, ο οποίος πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα.

Το ιικό γονιδίωμα συνίσταται σε ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, μεγέθους 9600 νουκλεοτιδίων. Το ιικό RNA περιλαμβάνει 5' και

3' μη μεταφραζόμενα άκρα και κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη μήκους 3.000 αμινοξέων.⁹⁹ Το γονιδίωμα του ιού δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου, καθώς η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος συμβαίνει εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου.

Στη συνέχεια, η πολυπρωτεΐνη πρωτεολύεται με τη βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου, σε τουλάχιστον 3 δομικά και 7 μη δομικά πεπτίδια.^{98,99} Οι δομικές πρωτεΐνες που αποκόπτονται είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη core (191 aa) και οι δύο πρωτεΐνες του ιικού φακέλου E1 (191 aa) και E2 (362 aa). Οι μη-δομικές πρωτεΐνες που αποκόπτονται είναι η NS2 (216 aa), η NS3 (630 aa), η NS4A (53 aa), η NS4B (260 aa), η φωσφοπρωτεΐνη NS5A (446 aa) και η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση NS5B (591 aa) (**σχήμα 1.11**). Οι δομικές πρωτεΐνες χωρίζονται από τις μη δομικές πρωτεΐνες στην πολυπρωτεΐνη από το μικρό πεπτίδιο p7 το οποίο εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου-ξενιστή και φαίνεται να λειτουργεί ως κανάλι ιόντων. Το p7 είναι σημαντικό για τη μολυσματικότητα του ιού. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία νέα πρωτεΐνη, η F ή ARFP ή core+1, που κωδικοποιείται από την περιοχή της καψιδιακής πρωτεΐνης αλλά σε εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης.¹⁰⁰

Οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του ιικού γονιδιώματος παρουσιάζουν εκτεταμένη δευτερογενή δομή και έχουν σημαντικό ρόλο στη μετάφραση καθώς και στον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA. Η έναρξη της μετάφρασης της πολυπρωτεΐνης γίνεται μέσω του μηχανισμού εσωτερικής πρόσδεσης των ριβοσωμάτων (IRES-Internal Ribosome Entry Site) στο 5' μη μεταφραζόμενο άκρο του ιικού γονιδιώματος.¹⁰¹



Σχήμα 1.11: Γενετική οργάνωση και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης του HCV. Στο επάνω μέρος είναι το θετικής πολικότητας RNA του ιού μήκους 9.6 kb. Η μετάφρασή του μέσω των IRES οδηγεί στην πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία με την βοήθεια της πεπτιδάσης σήματος του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum signal peptidase - οι θέσεις κοπής φαίνονται από τις ελεύθερες κεφαλές βελών) και της πεπτιδάσης πεπτιδίων σήματος (signal peptide peptidase, SPP), καθώς και των NS2 και NS3-4A πρωτεασών (οι θέσεις κοπής φαίνονται από τα βέλη) ωριμάζει στις δομικές και μη δομικές ιικές πρωτεΐνες. Φαίνεται η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών σε δομικές και μη δομικές, καθώς και η ομαδοποίησή τους ανάλογα με την λειτουργία τους σε πρωτεΐνες συγκρότησης και πρωτεΐνες αντιγραφής.

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C (CHC) συχνά παρουσιάζουν κίρρωση του ήπατος και ηπατοκυτταρικό καρκίνο με υπερσυσσώρευση σιδήρου στο ήπαρ.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Η συγκέντρωσή του είναι προγνωστικός δείκτης για την ανταπόκριση του ασθενούς στην θεραπεία.¹⁰⁵ Η μείωση της συγκέντρωσης του σιδήρου αυξάνει τις πιθανότητες ολικής εξάλειξης του ιού με αντιική θεραπεία¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ και μειώνει τις πιθανότητες ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκίνου.¹⁰⁹ Ο HCV ρυθμίζει την έκφραση της ηπατιδίνης μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Σε ποντίκια το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από τον HCV οδήγησε σε μειωμένη μεταγραφική

έκφραση της ηπατιδίνης,¹¹⁰ ενώ σε ηπατική κυτταρική σειρά Huh7 και Huh7.5 κατέστειλε την παραγωγή της ηπατιδίνης μέσω αυξημένης απο-ακετυλίωσης των ιστονών.¹¹¹ Μειωμένη ηπατιδίνη στον ορό του αίματος βρέθηκε ότι έχουν και οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C¹¹²⁻¹¹³ και πιθανώς σε αυτό οφείλεται και η συσσώρευση του σιδήρου.^{112,114}

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η πολυπρωτεΐνη του HCV ρυθμίζει την έκφραση της ηπατιδίνης μένει να διευκρινιστεί. Είναι γνωστό ότι η παραγωγή ROS επάγει την έκφραση της πυρηνικής ομόλογης πρωτεΐνης του C/EBP (CHOP). Ο C/EBPα είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος συνδέεται στον υποκινητή της ηπατιδίνης κατά την μεταγραφή του γονιδίου της. Οι CHOP που παράγονται κατά το οξειδωτικό στρες παρεμποδίζουν την πρόσδεση του C/EBPα στο γονίδιο της ηπατιδίνης καταστέλλοντας την έκφρασή της.¹¹⁰

Γνωστή είναι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του HCV με σηματοδοτικά μονοπάτια, κάποια από τα οποία σχετίζονται και με την ρύθμιση έκφρασης της ηπατιδίνης. Το σύμπλεγμα των μη δομικών πρωτεϊνών NS3-NS4A παρεμποδίζει την καταστολή του TGF-β από τον SMURF2 και συμβάλλει στην ενεργοποίηση των Smad2/3,¹¹⁵ ενώ κύτταρα που εκφράζουν την NS3 ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK/ERK1/2.¹¹⁶ Η NS4B επάγει την έκφραση και την ενεργοποίηση της STAT3 μέσω φωσφορυλίωσης και μετατόπισής της στον πυρήνα, πιθανώς μέσω της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και των JNK κινασών, και την ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης του καταστολέα SOCS3.¹¹⁷ Η NS5A ενεργοποιεί και εκείνη την STAT3 μέσω φωσφορυλίωσης από την JAK1 κινάση,¹¹⁸ ενώ αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β.¹¹⁹ Η δομική πρωτεΐνη E2 ενεργοποιεί το MAPK-ERK-ATF-2 σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω αλληλεπίδρασης με τη CD81 και τον υποδοχέα των LDL (LDLR).¹²⁰ Τέλος, η η καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV έχει δειχθεί πως ενεργοποιεί τη STAT3,¹²¹ ενώ οδηγεί τη STAT1 σε πρωτεόλυση από το πρωτεάσωμα.¹²² Επίσης ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι BMP/SMAD μέσω επαγωγής του TGF-β από το σηματοδοτικό μονοπάτι p38/MAPK¹²³ και οδηγεί στην φωσφορυλίωση των ERK1/2.¹²⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ηπατιδίνη είναι ένα πεπτίδιο 25 αμινοξέων, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου στον οργανισμό. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του μορίου της ηπατιδίνης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Η διπλωματική εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη.

Στο πρώτο μέρος γίνεται παραγωγή των ανασυνδυασμένων μορίων Hep25-His και Hep25 σε διαλυτή μορφή στο ευκαρυωτικό σύστημα του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Η Hep25-His, το οποίο φέρει ετικέτα έξι ιστιδινών (6XHis), χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ηπατιδίνης σε ηπατικά κύτταρα. Στη συνέχεια, για την καλύτερη προσέγγιση της δομής του φυσικού μορίου, γίνεται προσπάθεια απομόνωσης της ανασυνδυασμένης μορφής Hep25 με πρωτοταγή δομή αντίστοιχη της ανθρώπινης ηπατιδίνης. Η απομόνωση του μορίου γίνεται με την βοήθεια μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν τη δομή της ηπατιδίνης ειδικά και μπορούν να διαφοροποιήσουν τα διάφορων δομών ανασυνδυασμένα μόρια μεταξύ τους.

Στο δεύτερο μέρος, μελετήθηκε η έκφραση του γονιδίου της ηπατιδίνης σε ηπατικά κύτταρα HepG2 παρουσία της καψιδιακής πρωτεΐνης (core) του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C έχουν αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου και φερριτίνης στον ορό του αίματος, καθώς επίσης παρουσιάζουν μεγάλη συσσώρευση σιδήρου στο ήπαρ. Γνωρίζοντας την πλειοτροπική λειτουργία της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV και τον σημαντικό ρόλο της στα πρώτα στάδια της λοίμωξης, θα μελετήσουμε την επίδρασή της στην έκφραση της ηπατιδίνης και στην ομοιόσταση του σιδήρου και θα διερευνήσουμε μηχανισμούς οι οποίοι εμπλέκονται. Ενδεικτικά αναφέρονται οι πρωτεΐνες SMAD4 και STAT3 των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ηπατιδίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Εργαστηριακά όργανα

- Επωαστήρας για καλλιέργεια μυκήτων MRC ORBITAL SHAKER INCUBATOR
- Επωαστήρας HeraCell¹⁵⁰ 150, Thermoelectron
- Μικροφυγόκεντρος Eppendorf, Prod. # 5410
- Φυγόκεντρος Eppendorf, Prod. # 581012
- Φυγόκεντρος KUBOTA, Prod. # 7780 (κεφαλή AG-5006A)
- Υδατόλουτρο, Julabo
- Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους, Bio-Rad Smartspec plus
- Φθορισμόμετρο Qubit (original model), Invitrogen
- Σύστημα υπερδιήθησης διαλυμάτων, Ultrasette™ Lab Tangential Flow Filtration Device with 1kDa Membrane, Pall Corporation Prod. # OS001C70
- Περισταλτική αντλία, Millipore
- ELISA reader, Bio-Rad model 680
- Συσσκευή FPLC, AKTA purifier Box 900, GE Healthcare
- Συσσκευή FPLC, Amersham Biosciences
- pHμετρο, HANNA
- Αναδευτήρες, Vortex-GENIE 2
- Μαγνητικοί αναδευτήρες, Stuart, Snijders 34532 και Heidolph unimax 1010
- Συσσκευή ηλεκτροφόρησης PowerPac basic, Bio-rad
- Συσσκευές κάθετης ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, Mini Protean III, Bio-Rad
- Συσσκευές μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη, Mini-Trans-Blot, Bio-rad

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας για μέτρηση μικρών ποσοτήτων, Sartorius CP1245-OCE
- Ηλεκτρονικός ζυγός, Sartorius CP2201
- Συσκευή ανοσοαποτύπωσης υπό κενό / Bio – Dot Microfiltration Apparatus, Bio-rad, Prod. # 170-6545
- Στήλη για καθαρισμό πεπτιδικών μορίων με χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας, HisPur Ni-NTA Chromatography cartridge, Thermo Scientific, Prod. # 90098
- Στήλη για καθαρισμό πεπτιδικών μορίων, Tricorn 5/50 column, Ge Healthcare, Prod. # 18-1163-09
- Στήλη για καθαρισμό πεπτιδικών μορίων με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, Superdex™ Peptide 10/300 GL, Ge Healthcare, Prod. # 17-5176-01
- Πιπέτες Gilson 1-20 µL, 20-200 µL, 0,2-1 mL
- Συσκευή για qPCR πραγματικού χρόνου, MiniOpticon Real-time PCR System, Bio-rad Prod. # CFB3120EDU

3.1.2 Αντισώματα

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κασίκας έναντι ανοσοσφαιρίνης κουνελιού/συζευγμένο με υπεροξειδάση, Dako Prod. # P0448
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης ποντικού/συζευγμένο με υπεροξειδάση, Dako Prod. # P0161
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κασίκας έναντι ανοσοσφαιρίνης ποντικού/συζευγμένο με υπεροξειδάση, Pierce Prod. # 31439
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-Actin, clone C4, Millipore, # mAb1501
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-PARP-1/2 (H-250), Santa Cruz Biotechnology, sc-7150
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-Ferroportin 1, Thermo Scientific # Pa522993

- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού anti-Human Transferrin Receptor, Invitrogen # 13-6800
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-Matriptase 2 antibody – Cytoplasmic domain, Abcam # ab56180
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-Human Ferritin, Dako # A0133
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-SMAD4, Cell Signaling # 9515
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού IgG anti-Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7), Cell Signaling # 9145
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού IgM anti-Phospho-Stat3 (Ser727) (6E4), Cell Signaling # 9136
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-Stat3 (K-15), Santa Cruz Biotechnology, sc-483

3.1.3 Kit αντιδραστηρίων

- Φθορίζον σύστημα ποσοτικοποίησης Quant-it Qubit, Prod. # Q33212, Invitrogen
- TMB Substrate kit (Peroxide Solution / Peroxide Substrate), Pierce, Prod. # 34021
- ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific # 32106
- ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction kit, Fermentas Life Sciences # K0311

3.1.4 Διαλύματα

Αντιδραστήρια για ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10X, pH 7,4

137mM NaCl

2,7mM KCl

10mM Na₂HPO₄

2mM KH_2PO_4

Το pH του διαλύματος διορθώνεται με την χρήση διαλύματος πυκνού υδροχλωρικού οξέος.

Πηκτή διαχωρισμού (resolving) για SDS-PAGE (όγκος = 10mL)

1.5M Tris, pH 8,8: 2.5mL

10% w/v SDS 10X: 0,1mL

10% θειικό αμμώνιο: 0,1mL

TEMED (SIGMA): 0,004mL (σε πήκτωμα 8% προστίθενται 0,006mL)

Οι ποσότητες για dd- H_2O και 30% ακρυλαμίδιο (Applichem) είναι ανάλογες της επιθυμητής πυκνότητας του πηκτώματος σε ακρυλαμίδιο. Ενδεικτικά, αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα οι ποσότητες για έναν όγκο 10mL .

Τελικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου:	8%	10%	12%	15%
dd- H_2O :	4,6mL	4mL	3,3mL	2,3mL
30% ακρυλαμίδιο:	2,7mL	3,3mL	4mL	5mL.

Πηκτή συμπύκνωσης (stacking) για SDS-PAGE (όγκος = 10mL)

30% Ακρυλαμίδιο: 1,7mL

0,5M Tris, pH 6,8: 1,25mL

10% w/v SDS 10X: 0,1mL

10% θειικό αμμώνιο: 0,1mL

TEMED: 0,01mL

dd- H_2O : 6,8mL

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X, pH 8,5

25mM Tris-base, pH 8,5

200mM γλυκίνη

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης

10% διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10X

1% SDS 10X

Πηκτή διαχωρισμού για Tricine-SDS-PAGE (16%)

AB-6: 10mL

Διάλυμα πηκτής (3X): 10mL

Γλυκερόλη: 3mL

dd-H₂O: 30mL

10% θειικό αμμώνιο: 0,1mL

TEMED: 0,01mL

Ενδιάμεση πηκτή (spacer) για Tricine-SDS-PAGE (10%)

AB-6: 6mL

Διάλυμα πηκτής (3X): 10mL

dd-H₂O: 30mL

10% θειικό αμμώνιο: 0,15mL

TEMED: 0,015mL

Πηκτή συμπύκνωσης για Tricine-SDS-PAGE (4%)

AB-6: 1mL

Διάλυμα πηκτής (3X): 4mL

dd-H₂O: 12mL

10% θειικό αμμώνιο: 0,09mL

TEMED: 0,009mL

Διάλυμα ανόδου 10X, pH 8,9 για Tricine-SDS-PAGE (1L)

121,14g Tris

Το pH του διαλύματος διορθώνεται με την προσθήκη πυκνού διαλύματος HCl.

Διάλυμα καθόδου 10X, pH ~ 8,25 για Tricine-SDS-PAGE (1L)

121,14g Tris

179,17g Tricine

10g SDS

Διάλυμα πηκτής για Tricine-SDS-PAGE – Gel buffer (3X), pH 8,45 (100mL)

36,33g Tris

0,3g SDS

Το pH του διαλύματος διορθώνεται με την προσθήκη πυκνού διαλύματος υδροχλωρίου.

Διάλυμα ακρυλαμίδιου (AB-6) για Tricine-SDS-PAGE

46,5g ακρυλαμίδιο

3g δις-ακρυλαμίδιο

Τα παραπάνω διαλύονται σε 100mL dd-H₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C σε σκεύος με σκουρόχρωμες επιφάνειες καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

Διάλυμα χρωματισμού πηκτής (stain buffer)

0,1% χρωστική Coomassie R-250

40% μεθανόλη

10% οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού πηκτής (destain buffer)

45% μεθανόλη

10% οξικό οξύ

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων για SDS-PAGE (sample buffer)

45mM Tris, pH 6,8

10% γλυκερόλη

1% SDS 10X

0,01% χρωστική Coomassie R-250

5% μερκαπτοαιθανόλη

Το παραπάνω διάλυμα αφορά σε αποδιατακτικές συνθήκες. Σε περίπτωση που τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, η μερκαπτοαιθανόλη αντικαθίσταται από dd-H₂O.

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων για Tricine-SDS-PAGE (sample buffer)

12% SDS (w/v)

30% γλυκερόλη (w/v)

0,05% χρωστική Coomassie R-250

150mM Tris, pH 7,0

Διάλυμα εμφάνισης με υπόστρωμα DAB 10X (D5637-5G, SIGMA)

Για 10mL διαλύματος:

30mg DAB

10mL PBS

Το διάλυμα που προκύπτει μοιράζεται σε επιμέρους σωλήνες eppendorf (1mL στον καθένα) και φυλάσσεται στους -20°C. Για να χρησιμοποιηθεί, αναμειγνύονται 1mL DAB 10X, 9mL PBS και 3μL H₂O₂ (30%).

Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών (transfer buffer)

Για 1L διαλύματος:

700mL d-H₂O

100mL ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10X pH 7,4

200mL μεθανόλη

Διάλυμα εκχύλισης κυττάρων (Whole Cell Extract buffer)

Για 10mL διαλύματος:

100μL Tris 1M, pH 7,05

125μL NaCl 4M

100μL Triton 100X

50μL PMSF 100mM

Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (Complete mini protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich)

Αναστολείς φωσφατασών (PhosStop, Sigma-Aldrich)

Διαλύματα για καλλιέργεια ζυμομύκητα *P. pastoris*

Θρεπτικό υλικό BMY

1% εκχύλισμα ζύμης

2% πεπτόνης

Ανάλογα με τον αριθμό των κωνικών φιαλών που απαιτούνται, παρασκευάζεται αντίστοιχη ποσότητα BMY λαμβάνοντας υπόψη ότι κάθε γυάλινη κωνική φιάλη χρειάζεται 350mL. Τα συστατικά διαλύονται σε dd-H₂O. Οι κωνικές πωματίζονται με ειδικά πώματα και αποστειρώνονται σε συνθήκες: 121°C, 20min, 1atm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

10% γλυκερόλη

10g/100mL d-H₂O, αποστείρωση σε συνθήκες: 121°C, 20min, 1atm και φύλαξη στους 4°C.

YNB 10X

134g/L YNB (Yeast Nitrogen Base), διήθηση σε συσκευή διήθησης τύπου Stericup με πόρους διαμέτρου 0,2μm και φύλαξη στους 4°C.

5% Μεθανόλη

5mL/100mL d-H₂O, διήθηση σε συσκευή τύπου Stericup με πόρους διαμέτρου 0,2μm και φύλαξη στους 4°C.

1 M KPB pH 6,0

Απαιτείται stock

- 1M K₂HPO₄
- 1M KH₂PO₄

Ενδεικτικά για διάλυμα 500mL KPB pH 6,0 αναμειγνύονται:

66mL K₂HPO₄

434mL KH₂PO₄

Συνήθως το pH του διαλύματος που προκύπτει διαφέρει λίγο από το αναμενόμενο, οπότε απαιτείται περαιτέρω προσθήκη συνήθως διαλύματος K₂HPO₄.

0.02% βιοτίνη

20mg/100mL, διήθηση με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,2μm και φύλαξη στους 4°C.

Θρεπτικό υλικό (YPD) καλλιέργειας σε τρυβλία Petri

1% εκχύλισμα ζύμης

2% πεπτόνη

2% δεξτρόζη

2% άγαρ

Τα συστατικά δεν αναμειγνύονται και δεν αποστειρώνονται όλα μαζί από την αρχή, καθώς η συνηθισμένη θερμοκρασία αποστείρωσης επηρεάζει την διαλυτότητα της γλυκόζης. Έτσι, παρασκευάζεται αρχικά stock γλυκόζης 20% (20g σε 100mL νερό), το οποίο και φυλάσσεται στους 4°C. Το stock αυτό αποστειρώνεται στους 110°C. Στη συνέχεια αναμειγνύονται τα υπόλοιπα συστατικά, εκτός από το άγαρ, σε 90 mL νερό και, αφού τα τοποθετηθούν σε γυάλινο μπουκάλι, προστίθεται και το άγαρ. Το μείγμα αυτό αποστειρώνεται σε φυσιολογικές συνθήκες αποστείρωσης 121°C, 20min, 1atm. Μετά την αποστείρωση και του YP και της γλυκόζης, και αφού έρθουν σε χαμηλότερη θερμοκρασία (περίπου 60°C), προστίθενται στο YP 10mL γλυκόζης και 100μL του αντιβιοτικού ζεοσίνη (100μg/mL). Η ζεοσίνη χρησιμοποιείται ούτως, ώστε να αναπτυχθούν μόνο οι αποικίες κυττάρων που το γονιδίωμά τους φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αυτήν, έπειτα από μετασχηματισμό με κατάλληλο πλασμίδιο. Επίσης, προστίθεται και για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων εφόσον επιδεικνύει ισχυρή τοξικότητα έναντι κυττάρων βακτηρίων, μυκήτων και θηλαστικών. Το αντιβιοτικό είναι φωτοευαίσθητο για αυτό και το ίδιο αλλά και τα τέσσερα τρυβλία που ετοιμάζονται υπό στείρες συνθήκες φλόγας, καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.

Θρεπτικά υλικά για υγρή καλλιέργεια ζυμομυκήτων (BMGY – BMMY)

Σε κωνική φιάλη που περιέχει 350mL διαλύματος BMY προστίθενται για τη μεν παρασκευή BMGY τα:

50mL 1 M KPB pH 6,0

50mL YNB 10X

50mL 10% γλυκερόλη

1mL βιοτίνη 0,02%

ενώ για το BMMY τα:

50mL 1 M KPB pH 6,0

50mL YNB 10X

50mL 5% μεθανόλη &

1mL βιοτίνη 0,02%

Τα υλικά αυτά φυλάσσονται στους 4°C.

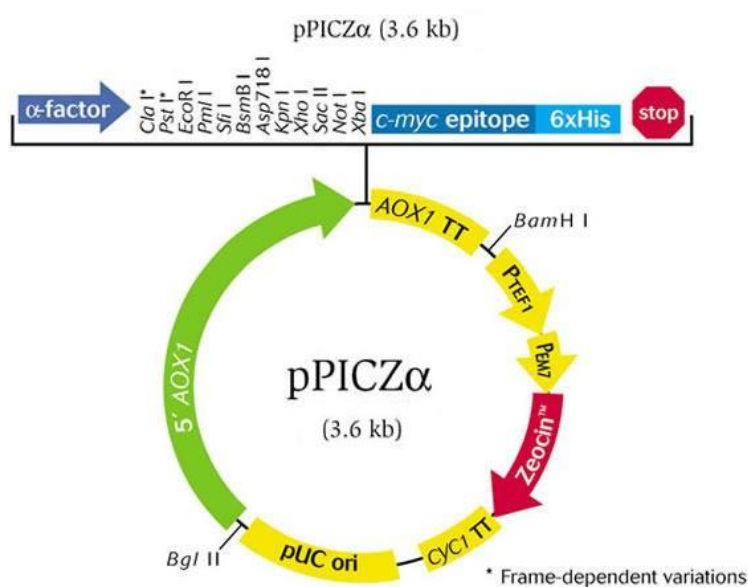
3.1.5 Στελέχη ζυμομύκητα *P. pastoris*, πλασμίδια, κυτταρικές σειρές, εκκινητές

Κύτταρα του ζυμομύκητα *P. pastoris*

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του ανασυνδυασμένου μορίου της ηπατιδίνης Hep25-His και Hep25 ήταν κύτταρα ζύμης *P. pastoris*. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα ο οποίος, ως ευκαρυωτικός οργανισμός, διαθέτει την ικανότητα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που οδηγούν σε επεξεργασία και αναδίπλωση των παραγόμενων πρωτεϊνικών μορίων. Η *P. pastoris* μπορεί να αναπτύσσεται σε υλικό που περιέχει μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα. Το πρώτο βήμα στον μεταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξείδωσή της σε φορμαλδεΰδη και υπεροξειδίο του υδρογόνου, η οποία καταλύεται από το ένζυμο της αλκοολικής οξειδάσης. Υπάρχουν δύο γονίδια που κωδικοποιούν την αλκοολική οξειδάση: τα AOX1 και AOX2, τα οποία παρουσιάζουν 97% ομολογία. Το μεγαλύτερο μέρος της αλκοολικής οξειδάσης εκφράζεται από το AOX1. Ο υποκινητής που ρυθμίζει την μεταγραφή του AOX1 είναι και αυτός που χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών. Για την έκφραση της ηπατιδίνης, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη X33 του *P. pastoris*, τα οποία είναι άγριου τύπου (wild type).

Πλασμίδια pPICZα

Ως φορέας έκφρασης στην *P. pastoris*, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pPICZαB, το οποίο διαθέτει τον υποκινητή του γονιδίου AOX1, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί το πεπτιδίο-οδηγό (α-factor) του *S. cerevisiae*, προκειμένου να γίνεται έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης.



Σχήμα 2.1: Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης pPICZα (ThermoFisher Scientific).

- PUCI ori: το σημείο έναρξης της αντιγραφής
- AOX1: ο υποκινητής του γονιδίου AOX1
- α-factor: το γονίδιο του πεπτιδίου-οδηγού για την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης
- Zeocin: το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην ζεοσίνη
- 6XHis: το γονίδιο που κωδικοποιεί 6 συνεχόμενα κατάλοιπα ιστιδίνης
- c-myc: το γονίδιο που κωδικοποιεί τον επίτοπο c-myc
- ClaI-...-XbaI: πολυσυνδέτης κλωνοποίησης.

Η προσθήκη του γονιδίου *hamp* έγινε ανάμεσα στις δύο θέσεις κοπής XhoI-NotI. Οι αμινοξικές αλληλουχίες της Hep25 και Hep25-His είναι οι εξής:

Hep25: DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT

Hep25-His: GADTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKTFDHHHHHH

Κυτταρική σειρά HepG2

Η καρκινική κυτταρική σειρά HepG2 έχει απομονωθεί από ήπαρ ανθρώπου με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα κύτταρα αυτά μετασχηματίστηκαν με τον φορέα κλωνοποίησης pTRE2Hyg, ο οποίος εκφράζει το γονίδιο ενδιαφέροντος, μέσω επαγωγής με δοξυκυκλίνη, βασιζόμενο στο TET-ON σύστημα. Το TET-ON σύστημα είναι επαγωγίμο σύστημα έκφρασης που χρησιμοποιεί το οπερόνιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Ο καταστολέας TET (TetR) εμποδίζει την μεταγραφή των γονιδίων του οπερονίου απουσία της τετρακυκλίνης. Επίσης, φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι της υγρομυκίνης για την άμεση επιλογή των κυττάρων που φέρουν τον φορέα κλωνοποίησης. Στον φορέα κλωνοποίησης έγινε προσθήκη του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV, με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα κύτταρα, στα οποία ο φορέας κλωνοποίησης είχε το γονίδιο αυτό, ονομάστηκαν κύτταρα C2-3, ενώ εκείνα που δεν το είχε ήταν τα κύτταρα ελέγχου pTRE.

Εκκινητές για ενίσχυση cDNA

Γονίδιο της HAMP

HAMP F 5'-CCA CAA CAG ACG GGA CAA CTT-3'

HAMP R 5'-AGT GGG TGT CTC GCC TCC TT-3'

Γονίδιο της 18S ριβοσωμικής υπομονάδας

18S F 5'-CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC-3'

18S R 5'-CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG-3'

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 SDS–PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών μορίων

Η ηλεκτροφόρηση είναι μέθοδος διαχωρισμού μορίων ή σωματιδίων με πολλές εφαρμογές στη μοριακή βιολογία και τη βιοχημεία. Η βασική αρχή στηρίζεται στο φαινόμενο κατά το οποίο φορτισμένα μόρια και σωματίδια, μέσα σε υδατικά διαλύματα και κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς την κατεύθυνση του ηλεκτροδίου με το αντίθετο φορτίο. Λόγω των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες (κινητικότητα). Δύο από τις πιο γνωστές εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή ακρυλαμιδίου και αгарόζης, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η περιγραφή της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (SDS-PAGE), όπως ακριβώς εφαρμόστηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τον διαχωρισμό και ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων, ενώ παράλληλα συνδυάζεται εύκολα και αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους (π.χ. μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε φύλλο νιτροκυτταρίνης για ανάλυση κατά Western).

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών και επωάζονται για 10min στους 95°C. Οι συνθήκες αυτές είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες, καθώς ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και van der Waals αλληλεπιδράσεων, ενώ η 2-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών. Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες. Παρουσία SDS αποδιατάσσονται οι τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνικών μορίων, στις οποίες παράλληλα προσδίδεται αρνητικό φορτίο από το SDS. Έτσι, όταν οι πρωτεΐνες τοποθετηθούν στο ηλεκτρικό πεδίο, ο διαχωρισμός τους θα εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος και το σχήμα τους. Μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή, μπορεί να επιτευχθεί διαφορετική ανάλυση του εύρους των μοριακών βαρών, ώστε να προκύψει

καλύτερος διαχωρισμός. Πιο συγκεκριμένα, μεγαλύτερη πυκνότητα σε ακρυλαμίδιο ευνοεί τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με μικρό μοριακό βάρος και, αντίστροφα, μικρότερη πυκνότητα σε ακρυλαμίδιο ευνοεί τον καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με μεγάλο μοριακό βάρος. Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου στο SDS-PAGE ήταν από 12% μέχρι και 17%, ανάλογα με την περίπτωση. Παράλληλα με τα υπό εξέταση δείγματα, προετοιμάζεται και ένα μείγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, το οποίο χρησιμοποιείται ως δείκτης μοριακών μεγεθών (marker). Η ηλεκτροφόρηση ξεκινά με ρύθμιση της τάσης στα 120V μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν πλήρως στην πηκτή διαχωρισμού και ρυθμίζεται σταθερά στα 200V μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Για μία ηλεκτροφόρηση απαιτείται 1L ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης και η όλη διαδικασία διαρκεί περίπου 1 ώρα.

Η Tricine - SDS - PAGE αποτελεί μία παραλλαγή της κλασικής ηλεκτροφόρησης SDS - PAGE και χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει πρωτεϊνικά μόρια μοριακού βάρους 1 – 100kDa. Προτιμάται κυρίως για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με μοριακό βάρος μικρότερο των 30kDa. Οι συγκεντρώσεις του ακρυλαμιδίου στην πηκτή που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο αυτή είναι χαμηλότερες σε σχέση με άλλα ηλεκτροφορητικά συστήματα, διευκολύνοντας την διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς που είναι πολύ κρίσιμη για υδρόφοβες πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Στην ηλεκτροφόρηση Tricine - SDS - PAGE, οι πηκτές αποτελούνται από ένα επιπλέον στρώμα που τοποθετείται ανάμεσα στην πηκτή συμπίκνωσης και την πηκτή διαχωρισμού. Αυτό καλείται ενδιάμεση πηκτή (spacer) και χρησιμοποιείται όταν το προς ανίχνευση πρωτεϊνικό μόριο κυμαίνεται στα 1 – 5kDa. Στην περίπτωση αυτή, η ηλεκτροφόρηση ξεκινά με ρύθμιση της τάσης στα 30A μέχρι τα δείγματα να εισέλθουν πλήρως στην πηκτή συμπίκνωσης, και έπειτα ρυθμίζεται σταθερά στα 120V αλλά χωρίς να ξεπεράσει τα 80A μέχρι το τέλος της διαδικασίας. Για μία ηλεκτροφόρηση απαιτούνται 150mL διαλύματος καθόδου, 800mL διαλύματος ανόδου και η όλη διαδικασία διαρκεί περίπου 2,5 ώρες.

Χρωματισμός και αποχρωματισμός πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η απεικόνιση των πρωτεϊνών επιτρέπεται με τη χρήση διαφόρων χρωστικών, οι οποίες δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης ποσότητας $> 2\text{ng}$ πρωτεΐνης. Η χρωστική που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η Coomassie Brilliant Blue (ανίχνευση $> 1\mu\text{g}$). Η πηκτή επωάζεται στους 37°C για τουλάχιστον 30min υπό ανάδευση με τη χρωστική. Εν συνεχεία, γίνεται έκπλυση και τοποθετείται ποσότητα διαλύματος αποχρωματισμού (destain buffer). Το διάλυμα αποχρωματισμού προστίθεται για επώαση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για τόσο χρόνο, ώστε να μείνει μόνο η χρωστική που έχει δεσμευτεί στις πρωτεΐνες πάνω στην πηκτή.

3.2.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

1. Η μέθοδος απαιτεί χαρτιά Whattman, σφουγγάρι και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ώστε να κατασκευάσουμε το σύμπλεγμα μεταφοράς των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη.
2. Διαβρέχουμε τα χαρτιά Whattman, τα σφουγγάρια, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και την πηκτή στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
3. Τοποθετούμε διαδοχικά ένα σφουγγάρι, ένα χαρτί Whattman, την πηκτή, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλο ένα χαρτί Whattman και άλλο ένα σφουγγάρι στην ειδική συσκευή μεταφοράς.
4. Η νιτροκυτταρίνη πρέπει να είναι τοποθετημένη προς την άνοδο, γιατί οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και, μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, οδεύουν προς την άνοδο.
5. Ρυθμίζουμε την ένταση του ρεύματος στα 300mA και αφήνουμε τη συσκευή για 1,5 .
6. Μετά την εφαρμογή της μεθόδου, ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau S ώστε να επιβεβαιωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών.
7. Η χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau S είναι πρόσκαιρη και απομακρύνεται μετά από επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απιονισμένο νερό.

3.2.3 Τεχνική ανοσοαποτύπωσης τύπου Western

Κορεσμός των μη ειδικών θέσεων αναγνώρισης του αντισώματος

1. Κατασκευάζουμε διάλυμα κορεσμού το οποίο αποτελείται από 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος σε TBS 1X (blocking solution).
2. Επωάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 10mL διαλύματος κορεσμού για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Δέσμευση 1^{ου} αντισώματος:

1. Χρησιμοποιείται μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης.
2. Επωάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το αντίσωμα για 16-18 ώρες, στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και δεσμεύεται με τους επιτόπους του. Το αντίσωμα αναδιαλύεται σε διάλυμα που αποτελείται συνήθως από 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος και 0,1% Tween-20 σε TBS 1X σε αραιώση που προτείνεται από την εταιρεία που το προμηθεύει.
3. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης 0.1% Tween-20 σε TBS 1X. Οι εκπλύσεις διαρκούν 5min και επαναλαμβάνονται δύο φορές.
4. Πριν την προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος γίνεται μία ακόμα έκπλυση της μεμβράνης με TBS 1X.

Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος:

1. Παρασκευάζουμε διάλυμα αντισωμάτων έναντι των IgG ποντικού ή κουνελιού, ανάλογα με το είδος αντισώματος που χρησιμοποιήσαμε στο πρώτο στάδιο. Τα αντισώματα αυτού του σταδίου έχουν συζευχθεί με υπεροξειδάση και χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:20.000 σε 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος σε TBS 1X.
2. Επωάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος για 1,5 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση με 0,1% Tween-20 σε TBS 1X. Οι εκπλύσεις διαρκούν 5min και επαναλαμβάνονται τρεις φορές.

4. Γίνεται μία τελική έκπλυση με TBS 1X. Η μεμβράνη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C αν χρειαστεί για μερικές ώρες μέχρι την εμφάνιση της.

Ανίχνευση του σήματος

1. Μεταφέρουμε την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην ειδική κασέτα εμφάνισης, μέσα σε διαφανή μεμβράνη.
2. Ετοιμάζουμε το διάλυμα εμφάνισης από το kit του ECL με την ανάμειξη ίσων όγκων από τα δύο αντιδραστήρια. Συνήθως 1mL τελικού όγκου αρκεί για κάθε μεμβράνη.
3. Επωάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο ειδικό διάλυμα ECL (τοποθετώντας το με πιπέτα), για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απομακρύνουμε την περίσσεια υγρού πάνω από την μεμβράνη καθώς και τις φυσαλίδες αέρα από την διαφανή μεμβράνη στην οποία την τοποθετήσαμε.
5. Τοποθετούμε το φιλμ ακριβώς πάνω από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το αφήνουμε για χρόνο ανάλογα με το 1^ο αντίσωμα που χρησιμοποιούμε, ώστε να αποτυπωθεί το σήμα. Ο χρόνος κυμαίνεται από 5sec μέχρι και 1,5 ώρα οπότε και αδρανοποιούνται τα υλικά της αντίδρασης. Η διαδικασία εμφάνισης του φιλμ γίνεται υποχρεωτικά σε σκοτεινό θάλαμο.

3.2.4 Ομοιοπολική πρόσδεση μονοκλωνικού αντισώματος σε σφαιρίδια (πρωτεΐνης G-σεφαρόζης)

Για να επιτευχθεί ένας αποδοτικός καθαρισμός και απομόνωση του πρωτεϊνικού μορίου Her25 είναι απαραίτητη η δημιουργία στήλης χρωματογραφίας συγγένειας με την χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος, που αναγνωρίζει ικανοποιητικά το μόριο, και σφαιριδίων πρωτεΐνης G-σεφαρόζης (GE Healthcare, # 17-0618-01). Τα σφαιρίδια από αгарόζη σφαιρικής δομής είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη G, μία πρωτεΐνη δέσμευσης ανοσοσφαιρινών. Η ακριβής διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Απαιτούνται 2mg επιλεγμένου αντισώματος για κάθε 1mL σφαιριδίων.

2. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται παρουσία διαλύματος PBS pH 7,4 σε συνθήκες: 4°C, 2500rpm για 5min ούτως, ώστε να εξισορροπηθούν και να απαλλαγούν από το διάλυμα συντήρησης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.
3. Το επιλεγμένο αντίσωμα προστίθεται στα σφαιρίδια και λαμβάνει χώρα ολονύκτια επώαση στους 4°C υπο ανάδευση.
4. Τα σφαιρίδια πλένονται 2 φορές με 10 όγκους διαλύματος 0,2M βορικού νατρίου pH 9,0 σε συνθήκες: 4°C, 2500rpm για 3min.
5. Τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 10 όγκους διαλύματος 0,2M βορικού νατρίου pH 9,0 και γίνεται προσθήκη στερεού DMP σε συγκέντρωση 20mM. Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min.
6. Η αντίδραση σταματά έπειτα από πλύσιμο των σφαιριδίων με διάλυμα 0,2M αιθανολαμίνης pH 8,0 σε συνθήκες: 4°C, 2500rpm για 5min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές.
7. Τα σφαιρίδια επωάζονται με διάλυμα 0,2M αιθανολαμίνης pH 8,0 σε roller για 2 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Ακολουθεί πλύσιμο των σφαιριδίων με διάλυμα PBS pH 7,4 σε συνθήκες: 4°C, 2500rpm για 5min και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές.
9. Τέλος, τα συζευγμένα με το αντίσωμα σφαιρίδια φυλλάσσονται σε 10mL διαλύματος PBS pH 7,4 και 0,01% διαλύματος αζιδίου του νατρίου στους 4°C.
10. Η επιτυχία ή μη της ομοιοπολικής πρόσδεσης διαπιστώνεται με την χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου 12% και σε αποδιατακτικές συνθήκες, όπου ελέγχονται δείγματα που έχουν ληφθεί κατά τα διάφορα στάδια της διαδικασίας.

3.2.5 Έκφραση, συλλογή και καθαρισμός του ανασυνδυασμένου μορίου Hep25 στην *Pichia pastoris*

Η *Pichia pastoris* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός (ζύμη). Όπως ναφέρθηκε και στις μεθόδους, για την έκφραση της ανασυνδυασμένης ηπατιδίνης, είχε εισαχθεί προηγουμένως στο εργαστήριο μας πλασμιδιακός φορέας στον οποίο περιέχεται και το γονίδιο έκφρασης της ηπατιδίνης. Ως

ευκαρυωτικός οργανισμός διαθέτει πολλά από τα πλεονεκτήματα των συστημάτων έκφρασης ανώτερων οργανισμών όπως: η επεξεργασία των πρωτεϊνών, η πρωτεϊνική αναδίπλωση και η δυνατότητα για μετα-μεταφραστική τροποποίηση, ενώ παράλληλα μπορεί να γίνει χειρισμός του εξίσου εύκολα όσος τη *E. coli* ή του *S. cerevisiae*. Σε σχέση με άλλα ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης αναπτύσσεται γρηγορότερα είναι πιο εύκολο στον χειρισμό και πιο οικονομικό, ενώ παράλληλα επιφέρει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν την *P. pastoris* ένα πολύ χρήσιμο σύστημα πρωτεϊνικής έκφρασης. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι μεθυλοτροφικός και διαθέτει την ικανότητα να μεταβολίζει μεθανόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Το πρώτο βήμα στον μεταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξειδωσή της σε φορμαλδεύδη από το ένζυμο αλκοολική οξειδάση. Η ύπαρξη του υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής οξειδάσης (AOX) στο γονιδίωμά του, επιτρέπει την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών ως απόκριση στην μεθανόλη, ενώ η ύπαρξη ενός αποτελεσματικού μονοπατιού έκκρισης των παραγόμενων πρωτεϊνών επιτρέπει στις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται και προορίζονται για έκκριση να συγκεντρωθούν σε μεγάλη πυκνότητα. Επειδή το γονίδιο της αλκοολικής οξειδάσης ελέγχεται μεταγραφικά, προτείνεται ανάπτυξη σε γλυκερόλη πριν την μεθανόλη, καθώς η γλυκερόλη καταστέλλει την μεταγραφή και έτσι με το πέρασμα σε μεθανόλη επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη επαγωγή.

Η ανασυνδυασμένη ηπατιδίνη (Hep25 και Hep25-His) είχε κατασκευαστεί συνθετικά στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας (EMBA) του Ινστιτούτου Παστέρ χρησιμοποιώντας τον φορέα κλωνοποίησης pPICZaC (Invitrogen, Carlsbad, CA). Το πρωτόκολλο παραγωγής και απομόνωσης του μορίου της ηπατιδίνης στον φορέα *P. pastoris* είναι το παρακάτω:

Ημέρα 1η

Επίστρωση (streaking) υπό φλόγα μετασχηματισμένων κυττάρων *P. pastoris*, που φυλάσσονται στους -80°C με γλυκερόλη, σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό YPD. Επώαση στους 30°C για 3 ημέρες σε ειδικό επωαστήριο. 3 μέρες

μετά, το τρυβλίο τοποθετείται στους 4°C ανεστραμμένο για αναστολή ανάπτυξης του ζυμομύκητα.

Ημέρα 4η

Σε αεροστεγώς κλειστό δοκιμαστικό σωλήνα των 50mL προστίθενται υπό φλόγα:

7mL BMY

1mL 10% glycerol

1mL YNB

1mL KPB

20μL βιοτίνη και

10μL ζεοσίνη.

Στη συνέχεια, γίνεται εμβολιασμός μεμονωμένης αποικίας και ακολουθεί ολονύκτια επώαση σε ειδικό επωαστήριο στους 30°C. Το επόμενο πρωί ο δοκιμαστικός σωλήνας μεταφέρεται στους 4°C.

Ημέρα 5η

Σε κωνική φιάλη που περιέχει 350mL BMY προστίθενται υπό φλόγα:

50mL 10% γλυκερόλη

50mL YNB

50mL KPB και

1mL βιοτίνη.

(το υλικό αυτό ονομάζεται BMGY και μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C έως και για ένα μήνα).

Γίνεται εμβολιασμός ποσότητας (200μL) από την μικρή καλλιέργεια και ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30°C, υπό ανάδευση σε 250rpm.

Ημέρα 6η

Προσδιορισμός συγκέντρωσης με φωτομέτρηση στα 600nm. Σε κυψελίδα φωτομέτρησης τοποθετούνται 100μL από την καλλιέργεια και 900μL από το BMY, ενώ ως τυφλό χρησιμοποιούμε 1mL BMY. Στη συνέχεια, απομονώνεται

τόση ποσότητα καλλιέργειας ούτως ώστε οι κωνικές στις οποίες θα τοποθετηθεί η καλλιέργεια (και που θα περιέχουν μεθανόλη να)έχουν οπτική απορρόφηση στα 600nm ίση με 1. Η ποσότητα αυτή φυγοκεντρείται σε 2500rpm, για 15min, στους 4°C. Παράλληλα, σε επιθυμητό αριθμό κωνικών φιαλών που περιέχουν 350mL BMY προστίθενται:

50mL 5% μεθανόλη

50mL YNB

50mL KPB

1mL βιοτίνη

(Το υλικό αυτό καλείται BMMY και μπορεί να φυλαχθεί στους 4°C έως ένα μήνα.)

Όταν τελειώσει η φυγοκέντρηση, το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται με μικρή ποσότητα θρεπτικού BMMY και προστίθεται στις κωνικές. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30°C και 250rpm.

Ημέρα 7η

Λαμβάνεται 1mL δείγματος από τυχαία επιλεγμένη κωνική φιάλη για ανάλυση της έκφρασης με ανοσοαποτύπωση σε κηλίδες (dot blot). Έπειτα προστίθενται 2,5mL μεθανόλης σε κάθε κωνική φιάλη ούτως, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5% και να γίνει επαγωγή της έκφρασης της ηπατιδίνης Her25. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση στους 30°C και 250rpm.

Ημέρα 8η

Λαμβάνει χώρα η ίδια διαδικασία με την έβδομη μέρα.

Ημέρα 9η

Λαμβάνεται 1mL δείγματος από την κωνική φιάλη για ανάλυση της έκφρασης με ανοσοαποτύπωση σε κηλίδες (dot blot). Ακολουθεί φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών σε 6.000rpm, για 45min, στους 4°C και το υπερκείμενο διηθείται υπό κενό από φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,2μm. Στο διήθημα προστίθενται αναστολέας πρωτεασών PMSF για αποφυγή αποικοδόμησης της πρωτεΐνης (1mL/1L) και 10% αζίδιο του νατρίου (5mL/1L) για αποφυγή μόλυνσης. Ακολουθώντας, γίνεται συμπύκνωση της εκκρινόμενης Her25 μέσω συσκευής

εφαπτόμενης συνεχούς ροής, εφοδιασμένης με φίλτρο 1kDa (Millipore, Bedford, MA). Πριν τη χρήση, η συσκευή εκπλένεται με 2L απιονισμένου νερού ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα 0,1N NaOH στο οποίο φυλάσσεται. Ακολουθεί συμπύκνωση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και στον μικρότερο δυνατό όγκο, ο οποίος συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 150-200mL. Το φίλτρο στη συνέχεια εκπλένεται με 2L απιονισμένου νερού και 4L διαλύματος NaOH 0,1N και φυλάσσεται στους 4°C.

3.2.6 Ανοσοαποτύπωση σε κηλίδες υπό κενό (dot blot)

Η ανοσοαποτύπωση σε κηλίδες αποτελεί μία ποιοτική τεχνική ανίχνευσης βιομορίων, που αντιπροσωπεύει μία απλουστευμένη εκδοχή του ανοσοστυπώματος κατά Western. Τα προς ανίχνευση μόρια δεν διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά, αντιθέτως ένα μείγμα που περιέχει το μόριο ενδιαφέροντος εφαρμόζεται απευθείας πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την μορφή κουκίδας. Ακολουθεί ανίχνευση του μορίου με ειδικά αντισώματα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Στην συσκευή τοποθετούνται δύο φύλλα Whatman και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, σε μέγεθος που να καλύπτει την επιφάνεια της συσκευής. Έπειτα η συσκευή συναρμολογείται και συνδέεται με κενό.
2. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων. Τα δείγματα που ελέγχονται είναι τα ακόλουθα:

θρεπτικό υλικό BMY, πρώτη, δεύτερη και τρίτη μέρα επαγωγής με μεθανόλη, διάλυμα PBS (αρνητικός δείκτης) και πρωτεϊνικό μόριο γνωστό για την ικανότητα του να αλληλεπιδρά με το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση (θετικός δείκτης).

3. Τοποθετούνται 150μL από κάθε δείγμα και 5μg από τον θετικό δείκτη.
4. Τα δείγματα αφήνονται να απορροφηθούν στην νιτροκυτταρίνη υπό κενό και, στη συνέχεια, η νιτροκυτταρίνη μεταφέρεται σε διάλυμα 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος – PBS για 30min στους 37°C, για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.
5. Η νιτροκυτταρίνη μεταφέρεται σε διάλυμα 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος – PBS που περιέχει μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό έναντι της

- ανασυνδυασμένης ηπατιδίνης σε συγκέντρωση 2μg/mL και αναδεύεται ολονύκτια στους 4°C.
6. Ακολουθεί πλύσιμο της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα 0,1% Tween – PBS για 10min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και ακολουθεί πλύσιμο με διάλυμα PBS pH 7,4 για 5min.
 7. Η νιτροκυτταρίνη μεταφέρεται σε διάλυμα 5% μίγμα πρωτεϊνών γάλακτος – PBS που περιέχει αντίσωμα κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικών συζευγμένο με υπεροξειδάση (Dako) σε αραιώση 1:2.000 και αναδεύεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 8. Ακολουθεί πλύσιμο της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα 0,1% Tween – PBS για 10min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και ακολουθεί πλύσιμο με διάλυμα PBS pH 7,4 για 5min.
 9. Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται διάλυμα DAB. 1mL διαλύματος 10X αραιώνεται με 9mL διαλύματος PBS και προστίθενται 3μL διαλύματος 30% H₂O₂.
 10. Η αντίδραση διακόπτεται με την μεταφορά της νιτροκυτταρίνης σε απιονισμένο νερό, όταν καταστεί εμφανές το σήμα στις κηλίδες της νιτροκυτταρίνης.

Χρωματογραφικές Μέθοδοι Ανάλυσης

Κάθε μία από τις παρακάτω τεχνικές καθαρισμού μέσω χρωματογραφίας έγιναν με τη χρήση συσκευής FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Κάθε διάλυμα που χρησιμοποιήσαμε στην συσκευή αυτή είχε πρώτα διηθηθεί σε συσκευή κενού με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,2μm και απαερωθεί υπό κενό και υπό ανάδευση για 15min τουλάχιστον.

3.2.7 Καθαρισμός του ανασυνδυασμένου μορίου της ηπατιδίνης (Hep25) με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας σε στήλη σφαιριδίων πρωτεΐνης G-σεφαρόζης που φέρουν ομοιοπολικά προσδεδεμένο μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων

1. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης του υπερκείμενου διαλύματος προετοιμάζεται η στήλη με τα σφαιρίδια που εμπεριέχουν το μείγμα των αντισωμάτων ειδικών, έναντι της ηπατιδίνης. Για τον σκοπό αυτό γίνεται έκπλυση με 10 όγκους στήλης με διάλυμα PBS 1X, pH 7,4 σε μηχανήμα FPLC με ροή 1mL/min και πίεση που φτάνει στα 0.23MPa, σε θερμοκρασία δωματίου. Η στήλη είναι αποθηκευμένη σε PBS - azide και δεν χρειάζεται να πλυθεί πρώτα με νερό, όπως θα χρειαζόταν εάν ήταν αποθηκευμένη σε αιθανόλη.
2. Γεμίζουμε με την βοήθεια σύριγγας των 10mL, τον γυάλινο κύλινδρο (loop) με το συμπυκνωμένο υπερκείμενο διάλυμα, ώστε να εισέλθει στο FPLC.
3. Αφού συνδεθεί στο μηχανήμα ο κύλινδρος, εφαρμόζουμε ροή 1mL/min και το υπερκείμενο μεταφέρεται και περνά διαμέσου της στήλης των αντισωμάτων. Το εκλουόμενο υγρό συλλέγεται σε κλάσματα των 50mL για ασφάλεια και ανίχνευση της απώλειας που έχουμε σε πρωτεΐνη.
4. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 όγκους PBS 1X για να απομακρυνθούν debris και πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά.
5. Η έκλυση του πεπτιδίου γίνεται με τη χρήση γλυκίνης 0,1M και pH 2,5 σε κλάσματα του 1mL. Ο έλεγχος που γίνεται αρχικά για την εύρεση των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη γίνεται μέσω της απορρόφησης τους στα 280nm και έπειτα γίνεται επιβεβαίωση με την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τους.
6. Για την άμεση εξουδετέρωση του χαμηλού pH της γλυκίνης, η συλλογή γίνεται σε σωλήνες erpendorf που περιέχουν ποσότητα διαλύματος Tris pH 9,0 , τέτοια ώστε το τελικό pH να είναι 7,0 για να μην βρίσκεται το πεπτίδιο σε ακραία pH. Γίνεται κάθε φορά πρώτα πεχαμέτρηση γλυκίνης με Tris για να γνωρίζουμε ακριβώς την ποσότητα Tris που χρειαζόμαστε.

7. Συνήθως συλλέγονται 5 εκλούσματα, ανάλογα με το φάρδος της κορυφής απορρόφησης στα 280nm.
8. Ακολούθως γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 όγκους PBS pH 7,4 και στη συνέχεια, έκπλυση με 10 όγκους PBS - αζίδιο του νατρίου (0,00001%). Η στήλη φυλάσσεται στους 4°C.
9. Από τα εκλούσματα που προκύπτουν ελέγχονται ηλεκτροφορητικά 20μL από κάθε δείγμα σε Tricine-SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση
10. Οι σωλήνες errendorf των κλασμάτων με το πεπτίδιο που συνελέχθησαν, αφού κλειστούν με παραφίλμ και τους ανοιχτούν πόροι με την βοήθεια βελόνας, καταψύχονται στους -80°C για μία ώρα και στην συνέχεια οδηγούνται για ολονύκτια λυοφιλοποίηση υπό συνεχή ψήξη.

3.2.8 Καθαρισμός του ανασυνδυασμένου μορίου της ηπατιδίνης (Hep25-His) με χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας σε στήλη ρητίνης αγαρόζης-νικελίου (Ni-NTA)

Στην περίπτωση που το πεπτίδιο που παρήχθη είναι η Hep25-His η διαδικασία καθαρισμού είναι η εξής:

1. Στο υπερκείμενο διάλυμα που συμπυκνώθηκε προσθέτουμε ίσο όγκο (100mL) διαλύματος εξισορρόπησης (20mM φωσφορικό νάτριο 300mM χλωριούχο νάτριο και 10mM ιμιδαζόλη pH 7,4). Συμπυκνώνουμε και πάλι το διάλυμα στα 100mL προσθέτοντας διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι το pH του τελικού διαλύματος να είναι 7,4.
2. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης του υπερκείμενου διαλύματος προετοιμάζεται η στήλη νικελίου. Για τον σκοπό αυτό γίνεται έκπλυση με 10 όγκους στήλης με dd-H₂O σε μηχανήμα FPLC με ροή 1mL/min και πίεση που φτάνει στα 0,23MPa, σε θερμοκρασία δωματίου. Η στήλη είναι αποθηκευμένη σε αιθανόλη η οποία πρέπει να απομακρυνθεί πλήρως πριν εισέλθουν ανόργανα άλατα στη στήλη.

3. Γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 όγκους στήλης με διάλυμα εξισορρόπησης για να είναι στο ίδιο περιβάλλον και pH με το υπερκείμενο διάλυμα.
4. Γεμίζουμε με την βοήθεια σύριγγας των 10mL, τον γυάλινο κύλινδρο με το συμπυκνωμένο υπερκείμενο διάλυμα, ώστε να εισέλθει στο FPLC.
5. Αφού συνδεθεί στο μηχάνημα ο κύλινδρος, εφαρμόζουμε ροή 1mL/min και το υπερκείμενο μεταφέρεται και περνά διαμέσου της στήλης νικελίου. Το εκλούόμενο υγρό συλλέγεται σε κλάσματα των 50mL για ασφάλεια και ανίχνευση της απώλειας που έχουμε σε πρωτεΐνη.
6. Στη συνέχεια γίνεται έκπλυση της στήλης με 10 όγκους διαλύματος έκπλυσης (διάλυμα φωσφορικών) και 25mM ιμιδαζόλη, για να απομακρυνθούν debris και πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά.
7. Η έκλυση του πεπτιδίου γίνεται με (διάλυμα φωσφορικών) και 300mM ιμιδαζόλη σε κλάσματα του 1mL. Ο έλεγχος που γίνεται αρχικά για την εύρεση των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη γίνεται μέσω της απορρόφησης τους στα 280nm και έπειτα γίνεται επιβεβαίωση με την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων τους.
8. Συνήθως συλλέγονται 5 εκλούσματα, ανάλογα με το φάρδος της κορυφής απορρόφησης στα 280nm.
9. Για την πλήρη απομάκρυνση πρωτεϊνών από τη στήλη γίνεται έκπλυση με 10 όγκους στήλης (διάλυμα φωσφορικών) και 1M ιμιδαζόλη.
10. Ακολούθως γίνεται έκπλυση της με 10 όγκους στήλης ddH₂O και στη συνέχεια, πλένεται με 10 όγκους στήλης 20% αιθανόλη. Η στήλη φυλάσσεται στους 4°C.
11. Από τα εκλούσματα που προκύπτουν ελέγχονται ηλεκτροφορητικά 20μL από κάθε δείγμα σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση
12. Οι σωλήνες erpendorf των κλασμάτων με το πεπτίδιο που συνελέχθησαν, αφού κλειστούν με παραφίλμ και τους ανοιχτούν πόροι με την βοήθεια βελόνας, καταψύχονται στους -80°C για μία ώρα και στην συνέχεια οδηγούνται για ολονύκτια λυοφιλοποίηση υπό συνεχή ψήξη.

3.2.9 Απομόνωση των ανασυνδιασμένων μορίων ηπατιδίνης με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε στήλη μοριακού αποκλεισμού (SEC)

Στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους και την τρισδιάστατη δομή τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια ειδικών σφαιριδίων που βρίσκονται μέσα στη στήλη τα οποία έχουν πόρους διαφόρων μεγεθών. Οι μεγάλοι μεγέθους πρωτεΐνες, οι οποίες δεν μπορούν να περάσουν διαμέσου των πόρων αναγκάζονται να περνούν όταν τους εφαρμοστεί πίεση, στον διάκενο χώρο ανάμεσα από τα σφαιρίδια και να ρέουν γρήγορα μέσω της στήλης. Αντιθέτως τα μικρότερα μόρια εισέρχονται στους πόρους των σφαιριδίων, τα οποία δυσχεραίνουν την ροή των μορίων αυτών και διέρχονται με μεγαλύτερη καθυστέρηση από τη στήλη.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο ήταν η εξής:

1. Αφού τα κλάσματα λυοφιλοποιηθούν και δείγματά τους έχουν χρησιμοποιηθεί σε πηκτή ηλεκτροφόρησης, ενώνουμε τα κλάσματα που περιέχουν ποσότητα του πεπτιδίου μας και όσο το δυνατόν λιγότερες προσμίξεις, αναδιαλύοντάς τα σε 500μL dd-H₂O καθαρών από πρωτεάσες. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, tris και γλυκίνης που υπήρχε στα κλάσματα δεν μπορούν ενωθούν πάνω από 5 κλάσματα λόγω καταβύθισης δυσδιάλυτου ιζήματος.
2. Γίνεται έκπλυση της στήλης μοριακού αποκλεισμού με 2 όγκους στήλης (50mL) dd-H₂O για να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη στην οποία είναι αποθηκευμένη, με ροή τέτοια ώστε να μην δημιουργεί πίεση στη στήλη μεγαλύτερη από 1,8Pa.
3. Εν συνεχεία θέτουμε σε ροή μέσω της στήλης την κινητή φάση που θα χρησιμοποιήσουμε, συχνά dd-H₂O ή NaPB με 150mM NaCl. Πριν εισάγουμε το δείγμα μας προσαρμόζουμε την ροή στα 0,4mL/min.
4. Εισάγουμε το δείγμα με σύριγγα 1mL σε ειδικό σωλήνα φόρτωσης δείγματος 0,5mL.
5. Συλλέγουμε όλο το έκλουσμα σε κλάσματα του 0,5mL μέχρις ότου να περάσει ένας όγκος στήλης τουλάχιστον (25mL), δηλαδή 50 κλάσματα. Η ανίχνευση του πεπτιδίου γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αρχικά και τελικά με ELISA.

6. Η έκπλυση της στήλης γίνεται με 2 όγκους στήλης dd-H₂O και η αποθήκευσή της με 2 όγκους στήλης 20% αιθανόλη.

3.2.10 Ποσοτικοποίηση πεπτιδίων μέσω φθορισμομετρίας

Η μέτρηση της συγκέντρωσης πεπτιδίων μέσω φθορισμομετρίας σε φθορισμόμετρο Qubit γίνεται ως εξής:

1. Ετοιμάζουμε 3 σωλήνες erppendorf 0,5mL για τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης και 1 για κάθε δείγμα προς ανάλυση.
2. Από το Quant-it Qubit kit της Invitrogen, παρασκευάζουμε το διάλυμα εργασίας, αραιώνοντας την χρωστική 1:200 στο protein buffer. Φτιάχνουμε 200μL για κάθε δείγμα.
3. Για την πρότυπη καμπύλη βάζουμε σε κάθε σωλήνα 190μL διαλύματος εργασίας και 10μL από την πρότυπη πρωτεΐνη από το kit. Για τα άγνωστα δείγματα βάζουμε σε κάθε σωλήνα 199μL διαλύματος εργασίας και 1μL δείγματος.
4. Κάνουμε ανάδευση των σωληνίων για 3 δευτερόλεπτα και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
5. Βαθμονομείται το φθορισμόμετρο Qubit με τα δείγματα της πρότυπης καμπύλης και μετράμε την απορρόφηση των αγνώστων δειγμάτων.

3.2.11 Ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA

Η ανοσοενζυμική δοκιμασία ELISA είναι μία ετερογενής ανοσοδοκιμασία, στην οποία το σύμπλοκο αντιγόνου και αντισώματος που προκύπτει ανιχνεύεται μετά την προσθήκη ειδικού υποστρώματος, η αντίδραση του οποίου με κατάλληλο ένζυμο δίνει ανιχνεύσιμο προϊόν. Η μέθοδος είναι ημιποσοτική ή και ποσοτική .

Ανάπτυξη δοκιμασίας ELISA για τον έλεγχο και ποσοτικοποίηση του πεπτιδίου της ηπατιδίνης

Χρησιμοποιούνται πλάκες μικροτιτλοδότησης με 96 βοθρία. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Διάλυμα PBS 1X pH 7,4 με το αντιγόνο Her25 τελικής συγκέντρωσης 1μg/mL προστίθεται σε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 50μL διαλύματος. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση στους 4°C.
2. Πλύση μία φορά με διάλυμα PBS, pH 7,4.
3. Προσθήκη 100μL διαλύματος 3% BSA - 0,05% Tween - PBS / βοθρίο για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.
4. Πλύση 2 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,05% Tween - PBS, pH 7,4).
5. Πλύση μία φορά με διάλυμα PBS, pH 7,4.
6. Προσθήκη 50μL/βοθρίο από το πρώτο αντίσωμα που συνδέεται ειδικά με το αντιγόνο που έχει προσκολληθεί στην πλάκα. Το αντίσωμα αραιώνεται σε διάλυμα 1,5% BSA - 0,05% Tween - PBS, ενώ οι αραιώσεις γίνονται αρχικά σε πλάκα χαμηλής προσρόφησης (low binding plate) και ακολούθως μεταφέρονται στην αρχική πλάκα μικροτιτλοδότησης. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αραιώνονται διαδοχικά σε συγκεντρώσεις από 250 μέχρι 0,25ng/mL από τα αριστερά προς τα δεξιά της πλάκας μικροτιτλοδότησης. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα, στους 37°C υπό ήπια ανάδευση.
7. Πλύση 2 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,05% Tween - PBS, pH 7,4).
8. Πλύση μία φορά με διάλυμα PBS, pH 7,4.
9. Στη συνέχεια προστίθενται 50μL/βοθρίο από το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο (υπεροξειδάση). Το δευτερογενές αντίσωμα κατ΄εξοχή έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση (Pierce Prod # 31439) προστίθεται σε αραιώση 1:15.000 σε διάλυμα 1,5% BSA - 0,05% Tween - PBS . Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα, στους 37°C υπό ήπια ανάδευση.
10. Πλύση 2 φορές με διάλυμα έκπλυσης (PBS-Tween 0,05%, pH 7,4).
11. Πλύση μία φορά με διάλυμα PBS, pH 7,4.
12. Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται το υπόστρωμα TMB substrate kit (Thermo scientific), τα συστατικά του οποίου αναμειγνύονται με νερό σε αναλογία 1/1/2 (Peroxidase Substrate (TMB)/ Peroxide Solution (H₂O₂)/dH₂O). Από το διάλυμα που προκύπτει τοποθετούνται άμεσα 50μL ανά βοθρίο και το σήμα

αφήνεται να αναπτυχθεί για 15min ή ως ότου να υπάρχει ικανοποιητικό σήμα στα 620nm.

13. Για τον τερματισμό της αντίδρασης χρησιμοποιείται διάλυμα 1N H₂SO₄ σε ποσότητα 50μL ανά βοθρίο και η απορρόφηση μετράται στα 450nm με διορθωτικό φίλτρο υποβάθρου στα 620nm

Ανάπτυξη ανταγωνιστικής δοκιμασίας ELISA για την ποσοτικοποίηση του μορίου της ηπατιδίνης σε καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων

Χρησιμοποιούνται πλάκες μικροτιτλοδότησης με 96 βοθρία. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρώνεται με το πεπτίδιο Hep25-His σε συγκέντρωση 1 και 0,5μg/mL με διάλυμα PBS 1X pH 7,4. Ταυτόχρονα, το πολυκλωνικό αντίσωμα αραιωμένο σε συγκέντρωση 0,33mg/L σε 3% BSA σε PBS επώαστηκε με ίση ποσότητα της πρότυπης καμπύλης ή του αραιωμένου υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας (8μL σε 25μL PBS ανά βοθρίο). Η επώαση έλαβε χώρα ολονύκτια στους 4°C. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιείται το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο Hep25-His αραιωμένο σε διάλυμα PBS (σε συγκεντρώσεις 5, 20, 50, 200, 500, 1.000ng/mL ή 1, 5, 10, 50, 100ng/mL).
2. Πλύση 2 φορές με διάλυμα έκπλυσης PBS pH 7,4.
3. Προσθήκη 100μL διαλύματος 3% BSA σε PBS / βοθρίο για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.
4. Πλύση 5 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,05% Tween - PBS, pH 7,4) και μία φορά με διάλυμα PBS pH 7,4.
5. Τα συμπλέγματα που σχηματίστηκαν από την ολονύκτια επώαση προστέθηκαν, στη συνέχεια, στα επιστρωμένα βοθρία εις τετραπλούν με 50μL/βοθρίο και επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C.
6. Πλύση 9 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,05% Tween - PBS, pH 7,4) και μία φορά με διάλυμα PBS pH 7,4.

7. Στη συνέχεια προστίθενται 50μL/βοθρίο από το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με ένζυμο (υπεροξειδάση). Το δευτερογενές αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με υπεροξειδάση (DakoCytomation, # P0448) προστίθεται σε αραιώση 1:4.000 σε διάλυμα 3% BSA σε PBS. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.
8. Πλύση 9 φορές με διάλυμα έκπλυσης (0,05% Tween-PBS, pH 7,4) και μία φορά με διάλυμα PBS pH 7,4.
9. Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται το υπόστρωμα TMB substrate kit (Thermo scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Από το διάλυμα που προκύπτει τοποθετούνται 50μL ανά βοθρίο και το σήμα αφήνεται να αναπτυχθεί.
10. Για τον τερματισμό της αντίδρασης χρησιμοποιείται διάλυμα 1N H₂SO₄ σε ποσότητα 50μL ανά βοθρίο και η απορρόφηση μετράται στα 450nm με διορθωτικό φίλτρο υποβάθρου στα 620nm.

3.2.12 Καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες στις οποίες χειρίζονται κύτταρα γίνονται σε στείρες συνθήκες και σε ειδικό απαγωγό για κυτταροκαλλιέργειες.

Διαδικασία απόψυξης κυττάρων

1. Θερμαίνουμε το κρυογονικό φιαλίδιο με τα κύτταρα σε υδατόλουτρο 37°C για 1min
2. Το περιεχόμενο κάθε κρυογονικού φιαλιδίου όγκου 1mL μεταφέρεται σε σωλήνα των 15 mL, όπου αναδιαλύεται σε 9mL DMEM
3. Φυγοκεντρούμε τους σωλήνες σε 1.000rcf για 1min
4. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και αναδιάλυση των κυττάρων σε 5mL 20% FBS σε DMEM
5. Μεταφορά των κυττάρων σε φιάλη καλλιέργειας 25cm²
6. Μετά από 24 ώρες αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε 10% FBS σε DMEM με προσθήκη αντιβιοτικών: 1:100 πενικιλίνη και στρεπταβιδίνη και 1:1.000 γενετισίνη και υγρομυκίνη

Ανάπτυξη κυτταρικής σειράς

Τα κύτταρα όταν πολλαπλασιαστούν επαρκώς και καλύψουν όλη την επιφάνεια της μικρής φιάλης καλλιέργειας μεταφέρονται σε μεγαλύτερη φιάλη 75cm². Για την μεταφορά τους πρέπει να γίνει η εξής διαδικασία:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού με ειδική αντλία και έκπλυσή τους με PBS 1X, το οποίο έχει πρώτα αποστειρωθεί.
2. Προσθήκη 0,5mL διαλύματος θρυψίνης και επώαση των κυττάρων στους 37 °C για 15min.
3. Προσθήκη 10mL θρεπτικού υλικού DMEM με 10% FBS για απενεργοποίηση της θρυψίνης και μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα των 15mL.
4. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1.000rcf για 5min και έπειτα απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει την θρυψίνη.
5. Αναδιάλυση των κυττάρων σε 15-20mL 10% FBS σε DMEM με αντιβιοτικά και μεταφορά σε φιάλη καλλιέργειας 75cm².
6. Ανάλογα με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, πρέπει ανά τακτά χρονικά διαστήματα να γίνεται ανακαλλιέργεια και μοίρασμα των κυττάρων επαναλαμβάνοντας την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω καθώς και ανανέωση του θρεπτικού υλικού.

Ψύξη κυττάρων

Από μία φιάλη καλλιέργειας 75cm² μπορούμε να παγώσουμε μέχρι και 10 κρυογονικά φιαλίδια. Συνήθως όταν ξεπαγώνει ένα φιαλίδιο με κύτταρα, όταν πολλαπλασιαστούν αρκετά και γεμίσουν μία φιάλη 75cm², τότε παγώνουμε τα μισά και με τα υπόλοιπα συνεχίζουμε την καλλιέργεια.

1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και γίνεται έκπλυση με PBS 1X.
2. Προσθήκη 1,5mL διαλύματος θρυψίνης και επώαση των κυττάρων στους 37 °C για 15min.

3. Προσθήκη 10mL θρεπτικού υλικού DMEM με 10% FBS για απενεργοποίηση της θρυψίνης και μεταφορά των κυττάρων σε δύο σωλήνες των 15mL, 5mL στο καθένα.
4. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1.000rcf για 5min και έπειτα απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει την θρυψίνη.
5. Αναδιάλυση των κυττάρων από ο ένας σωλήνα σε 15-20mL 10% FBS σε DMEM με αντιβιοτικά και μεταφορά σε φιάλη καλλιέργειας 75cm².
6. Αναδιάλυση των υπόλοιπων κυττάρων στον άλλο σωλήνα σε 5-6mL 10% FBS, 10% DMSO σε DMEM
7. Μεταφορά 1mL από το διάλυμα των κυττάρων σε κάθε κρυογονικό φιαλίδιο, ύστερα από καλή ανάδευση των κυττάρων με την πιπέτα κάθε φορά.
8. Αποθήκευση των φιαλιδίων σε βαθειά κατάψυξη -80°C για 16-18 ώρες
9. Γρήγορη μεταφορά των φιαλιδίων σε δεξαμενή υγρού αζώτου για αποθήκευση

Υποκυτταρική κλασμάτωση πρωτεϊνών

Για να διαχωρίσουμε τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στον πυρήνα από τις υπόλοιπες χρησιμοποιούμε το ProteoJET Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit της Fermentas Life Sciences # K0311. Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Φυγοκενρούμε το ίζημα των κυττάρων στα 250g για 5min και απομακρύνουμε το υπερκείμενο
2. Επαναδιαλύουμε σε PBS και επαναλαμβάνουμε το βήμα 1.
3. Προσθέτουμε 10 όγκους των κυττάρων, διάλυμα λύσης (με αναστολέα πρωτεασών και DTT).
4. Ανάδευση για 10sec, επώαση στον πάγο για 10min και ανάδευση ξανά για 10sec.
5. Φυγοκέντρηση στα 500g για 7min στους 4°C. Απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, όπου είναι οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σε νέο σωλήνα. Τοποθέτηση του πυρήνα στον πάγο.

6. Φυγοκέντρηση του υπερκείμενου υγρού στα 20.000g για 15min στους 4°C και μεταφορά του νέου υπερκείμενου σε νέο σωλήνα (κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες). Άμεση ανάλυση ή αποθήκευση στους -80°C
7. Προσθήκη 500μL διαλύματος έκπλυσης των πυρήνων (με αναστολέα πρωτεασών και DTT) στο ίζημα των πυρήνων, γρήγορη ανάδευση και επώαση 2min στον πάγο. Φυγοκέντρηση στα 500g για 7min στους 4°C και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
8. Επαναλαμβάνουμε το βήμα 7.
9. Προσθήκη 150μL παγωμένου διαλύματος αποθήκευσης πυρήνων (με αναστολέα πρωτεασών και DTT) στο ίζημα των πυρήνων. Ήπια αναδιάλυση 5-10 φορές για την διάλυση συσσωματωμάτων. Εδώ μπορεί να γίνει αποθήκευση στους -80°C.
10. Προσθήκη 1:10 του όγκο διαλύματος λύσης πυρήνων στο διάλυμα των πυρήνων. Σύντομο vortex και ανάδευση σε 900-1200rpm για 15min στους 4°C.
11. Φυγοκέντρηση στα 20.000g για 5min στους 4°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα (πυρηνικές πρωτεΐνες). Άμεση ανάλυση ή αποθήκευση στους -80°C.

3.2.13 Απομόνωση RNA

1. Στα φυγοκεντρημένα κύτταρα που έχουμε συλλέξει σε tubes, προστίθεται ανάλογα με τον αριθμό τους (200μL για 1.000.000 κύτταρα), ποσότητα RNAzol B, το οποίο περιέχει φαινόλη.
2. Προσθέτουμε χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:10 ως προς το RNAzolB που προσθέσαμε.
3. Κάνουμε ανάδευση και εναπόθεση των δειγμάτων στον πάγο για 5min.
4. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα σε 12.000rcf για 20min υπό ψύξη στους 4°C.
5. Ύστερα από την φυγοκέντρηση έχουν δημιουργηθεί δύο φάσεις στα δείγματα, η άνω που είναι η υδατική φάση και περιέχει το RNA, και η κάτω η οποία είναι η οργανική φάση που δημιουργήθηκε λόγω της

φαινόλης και περιέχει το DNA των κυττάρων. Ενδέχεται να διακρίνεται και μία ενδιάμεση φάση, στην οποία περιέχονται οι πρωτεΐνες. Γίνεται συλλογή αποκλειστικά της υδατικής φάσης σε νέους σωλήνες.

6. Μετρείται ο όγκος της υδατικής φάσης κάθε δείγματος που απομονώθηκε και προστίθεται 1:1 όγκος ισοπροπανόλης.
7. Για την ποσοτική καταβύθιση του RNA προσθέτουμε γλυκογόνο σε όγκο 1:20 ως προς τον τελικό όγκο του δείγματος που απομονώσαμε και αφού αναδεύσουμε τα δείγματα, τα αποθηκεύουμε για 16 ώρες στους -20°C.
8. Φυγοκέντρωση των δειγμάτων σε 16.000rcf για 20min υπό ψύξη στους 4°C.
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και προσθέτουμε 150μL 75% αιθανόλης υψηλής καθαρότητας σε κάθε δείγμα, για την έκπλυση του RNA.
10. Γίνεται σύντομη ανάδευση των δειγμάτων και έπειτα φυγοκέντρωση τους 12.000rcf για 15min υπό ψύξη στους 4°C.
11. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο διάλυμα και εξατμίζουμε πλήρως την αιθανόλη σε vacuum concentrator για 10min.
12. Αναδιαλύουμε με πιπέτα το RNA προσθέτοντας 20μL d-H₂O, χωρίς RNases. Το RNA αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη -80°C.
13. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA γίνεται με τη συσκευή nanodrop χρησιμοποιώντας 1μL από το δείγμα.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχύσει ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA, το οποίο βρίσκεται μεταξύ δύο περιοχών με γνωστή αλληλουχία. Δύο ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται ως εκκινητές για μία σειρά συνθετικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από μία DNA πολυμεράση. Προϋπόθεση για να εφαρμόσουμε τη μέθοδο PCR, είναι να γνωρίζουμε μέρος της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του

τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε ώστε να μπορέσουμε να σχεδιάσουμε τους κατάλληλους εκκινητές (primers).

3.2.14 Αντίστροφη μεταγραφή

Η τεχνική της PCR έχει ως βασική αρχή την αντιγραφή περιοχών DNA με γνωστά άκρα με την βοήθεια του ενζύμου της DNA-πολυμεράσης. Στην περίπτωση της αντίστροφης μεταγραφής είναι διαφορετικό και το μητρικό μόριο και το ένζυμο που καταλύει την αντιγραφή. Το μητρικό μόριο είναι RNA και το ένζυμο που πραγματοποιεί την διεργασία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση. Όπως υποδεικνύει και η ονομασία του, το ένζυμο αυτό δεν κάνει αντιγραφεί μορίων RNA, αλλά χρησιμοποιώντας ως μητρικό μόριο το RNA συνθέτει μονόκλωνα μόρια DNA (cDNA). Με τη βοήθεια των τυχαίων εκκινητών (rd(N)₆), οι οποίοι προσδένονται σε πολλές περιοχές στο RNA είναι δυνατή η αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA του δείγματος και στην συνέχεια κάνοντας qPCR στα μονόκλωνα μόρια DNA που προκύπτουν να κάνουμε ανάλυση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την αντίστροφη μεταγραφή είναι η εξής:

1. Αφού έχουμε κάνει μέτρηση τη συγκέντρωσης του RNA υπολογίζουμε τον όγκο στον οποίο περιέχεται 1μg RNA και τον όγκο d-H₂O που πρέπει να προστεθεί σε κάθε δείγμα, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 12,5μL. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μL.
2. Σε ειδικούς σωλήνες PCR των 250μL προσθέτουμε τον όγκο d-H₂O που υπολογίσαμε για κάθε δείγμα και προσθέτουμε 1μL από τους τυχαίους εκκινητές rd(N)₆.
3. Προσθέτουμε το RNA στα tubes, κρατώντας τα μέχρι να τελειώσει η παραπάνω διαδικασία στον πάγο.
4. Μεταφέρουμε τα δείγματα στους θερμικούς ανακυκλωτές, και προγραμματίζουμε το πρωτόκολλο ώστε να έχουμε τις παρακάτω συνθήκες:
 - Θέρμανση στους 70°C για 5min
 - Θέρμανση στους 37°C για 1 ώρα

- Θέρμανση στους 92°C για 2min
 - Ψύξη στους 4°C για πάντα
5. Όσο τα δείγματα θερμαίνονται στους 70°C, ώστε να συνδεθούν οι εκκινητές σε όλο το RNA, ετοιμάζουμε το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, στο οποίο περιέχονται για κάθε δείγμα:
- 4μL διαλύματος 5X
 - 1μL μίγμα dNTP's
 - 0,5μL αναστολέα RNAσών
 - 1μL ένζυμο MMLV
6. Μετά την θέρμανση των δειγμάτων στους 70°C γίνεται παύση και τα δείγματα μεταφέρονται πάλι στον πάγο. Γίνεται spin φυγοκέντρηση να κατέβει η υγρασία από τα τοιχώματα και προστίθενται 6,5μL από το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης σε κάθε δείγμα RNA.
7. Γίνεται ανάδευση των δειγμάτων και spin φυγοκέντρηση.
8. Τοποθετούνται πίσω στον θερμικό ανακυκλωτή και συνεχίζεται το πρωτόκολλο μέχρι την ολοκλήρωσή του.
9. Τα δείγματα αραιώνονται με την προσθήκη 80μL d-H₂O και αποθηκεύονται στους -80°C.

3.2.15 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

Στην qPCR (quantitative PCR) έχουμε την δυνατότητα να παρακολουθούμε τον αριθμό των παραγόμενων μορίων DNA σε πραγματικό χρόνο με την βοήθεια ειδικών μορίων σήμανσης (SYBR Green), τα οποία μπορούν να προσδεθούν στα δίκλινα μόρια DNA. Τα μόρια της φθορίζουσας ουσίας αυτής, όταν συνδεθούν στο DNA απορροφούν κυανή ακτινοβολία και εκπέμπουν πράσινη. Μετρώντας την εκπεμπόμενη ακτινοβολία μπορούμε να υπολογίσουμε ημιποσοτικά την συγκέντρωση του DNA, χρησιμοποιώντας και ένα άλλο γονίδιο ως γονίδιο αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς πρέπει να βρίσκεται σε τέτοια συγκέντρωση, ώστε να είναι πάντα ανιχνεύσιμη και να μην επηρεάζεται από τον κυτταρικό κύκλο ή από εξωτερικούς παράγοντες.

Το γονίδιο αναφοράς που επιλέξαμε ήταν το γονίδιο έκφρασης της 18S υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA, βασικό συστατικό όλων των κυττάρων, αφού είναι υπεύθυνο για την μετάφραση των αγγελιοφόρων RNA (mRNA) σε πρωτεΐνες, το οποίο έχει διατηρημένες αλληλουχίες στα άκρα του γονιδίου του σε όλους τους οργανισμούς, επιτρέποντας την χρήση εκκινητών καθολικά για όλα τα είδη. Μετά το τέλος της qPCR δεν χρειάζεται τα δείγματα να φορτωθούν σε πηκτή αгарόζης, διότι η συσκευή και το πρόγραμμα τα οποία χρησιμοποιούνται παρέχουν την δυνατότητα, πέρα από την μέτρηση της συγκέντρωσης με βάση τον φθορισμό της SYBR Green, να διαχωρίζουμε και να ταυτοποιούμε το είδος του DNA που πολλαπλασιάστηκε με βάση το σημείο τήξης του, το οποίο και μετράται.

Η αντίδραση της qPCR γίνεται σε όγκο 15μL. Τα συστατικά της αντίδρασης είναι:

- cDNA 3μL
- εμπρόσθιος εκκινητής 0,1-0,8μM
- οπίσθιος εκκινητής 0,1-0,8μM
- διάλυμα SYBR Green 7,5μL
- dH₂O έως τα 15μL

Στο SYBR Green buffer περιέχονται εκτός από την φθορίζουσα ένωση, το μίγμα των dNTP's, η Taq πολυμεράση, MgCl₂ που είναι απαραίτητο για την δράση της πολυμεράσης και το κατάλληλο buffer για την αντίδραση.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA κάθε δείγματος, χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι οι τιμές των αγνώστων δειγμάτων θα βρεθούν εντός των ορίων της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκε ένα μίγμα με ίσες ποσότητες από το κάθε δείγμα (master mix). Για την κατασκευή της καμπύλης παρασκευάζεται σειρά αραιώσεων του μίγματος.

Όλα τα ρύγχη των πιπετών που χρησιμοποιούνται έχουν φίλτρο και οι πιπέτες αλλά και ο χώρος όπου γίνεται η διαδικασία έχουν πρώτα ακτινοβοληθεί με UV για μισή ώρα τουλάχιστον για αποφυγή επιμολύνσεων και την καταστροφή των DNAσων.

Τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. Σε PCR tube (250μL) φτιάχνουμε το μίγμα της πρότυπης καμπύλης (master mix) αναμιγνύοντας 3μL DNA από κάθε δείγμα.
2. Φτιάχνουμε διαδοχικές αραιώσεις του master mix σε άλλους PCR σωλήνες, ανάλογα με το γονίδιο. Για το 18S που είναι σε μεγάλο σχετικά ποσοστό στο DNA και με μικρή διακύμανση, κάνουμε αραιώσεις 1/2, 1/4, 1/8 και 1/16 , ενώ για άλλα γονίδια οι αραιώσεις είναι 1/10, 1/100 και 1/1.000. Για κάθε PCR χρειαζόμαστε 9μL από κάθε αραιώση και κάθε δείγμα, αφού γίνονται triplicates για επαναληψιμότητα, επομένως φτιάχνουμε επαρκή ποσότητα αναλόγως.
3. Σε πλάκα 96 βοθρίων PCR βάζουμε 3μL DNA από τις αραιώσεις της πρότυπης καμπύλης και από κάθε δείγμα σε triplicates. Σε ένα βοθρίο θα τοποθετήσουμε 3μL d-H₂O για αρνητικό μάρτυρα, ώστε αν έχουν επιμόλυνση τα αντιδραστήρια να το αντιληφθούμε.
4. Σε erppendorf σωλήνα αναμιγνύουμε το d-H₂O, τους εκκινητές και το SYBR Green που έχουμε υπολογίσει πως απαιτούνται για τα triplicates των δειγμάτων και της πρότυπης καμπύλης.
5. Γίνεται ανάδευση του μίγματος και βάζουμε 12μL σε κάθε βοθρίο της PCR πλάκας.
6. Τοποθετούνται τα καπάκια και γίνεται spin φυγοκέντρηση στο plate πριν τοποθετηθεί στον θερμικό ανακυκλωτή.
7. Το πρωτόκολλο για το 18S γονίδιο είναι:

1. Αρχική αποδιάταξη	3min	95 °C
2. Αποδιάταξη DNA	2min	95 °C
3. Προσαρμογή εκκινητών	1min	50 °C
4. Επιμήκυνση	1min	72 °C
5. Επανάληψη από το στάδιο 2	20 φορές	
6. Τελική επιμήκυνση	10min	72 °C

Για άλλα γονίδια το πρωτόκολλο προσαρμόζεται ανάλογα με το σημείο τήξης των εκκινητών, καθώς και στην αρχική ποσότητα του DNA.

Για το γονίδιο έκφρασης της ηπατιδίνης (*hamp*) το πρωτόκολλο είναι το εξής:

- | | | |
|------------------------------|----------|-------|
| 1. Αρχική αποδιάταξη | 3min | 95 °C |
| 2. Αποδιάταξη DNA | 1min | 95 °C |
| 3. Προσαρμογή εκκινήτων | 1min | 50 °C |
| 4. Επιμήκυνση | 1min | 72 °C |
| 5. Επανάληψη από το στάδιο 2 | 45 φορές | |
| 6. Τελική επιμήκυνση | 10min | 72 °C |
8. Επεξεργασία αποτελεσμάτων. Κατά την μετατροπή του ολικού RNA σε cDNA μπορεί να υπάρχουν διακυμάνσεις στην απόδοση της αντίδρασης ανάμεσα στα δείγματα. Για να κανονικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της συγκέντρωσης κάθε δείγματος και να μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους πρέπει να διαιρέσουμε την τιμή της με την τιμή της συγκέντρωσης του 18S rRNA του αντίστοιχου δείγματος.

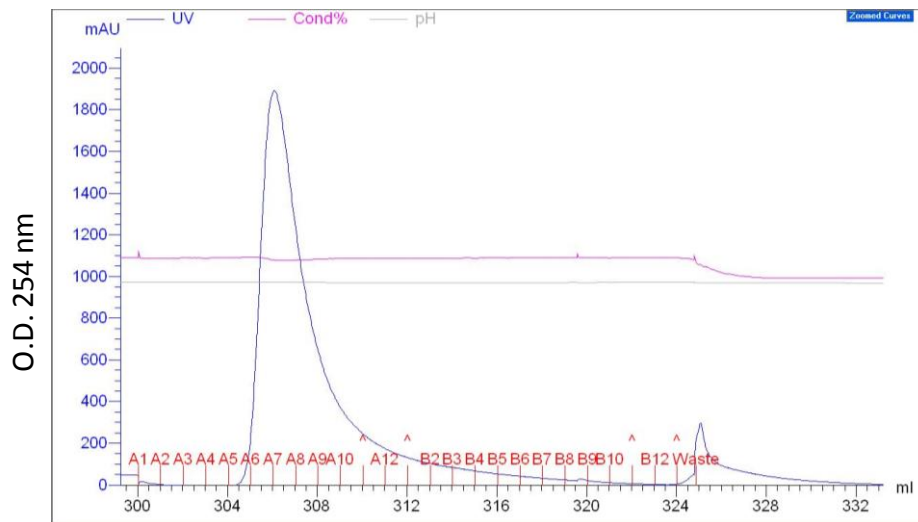
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων μορίων ηπατιδίνης Her25-His και Her25 στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

4.1.1 Παραγωγή και καθαρισμός της Her25-His

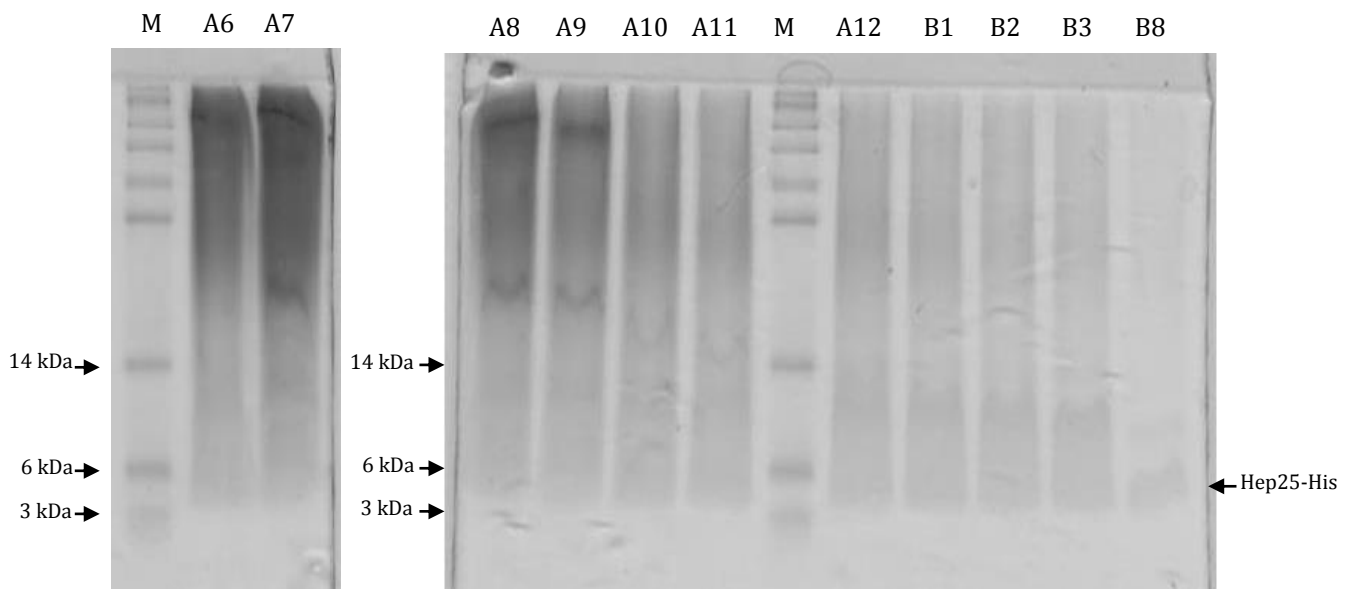
Για τη διαλυτή έκφραση ανασυνδυασμένης ηπατιδίνης στο ζυμομύκητα *P. pastoris*, χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pPICza ο οποίος είχε κατασκευαστεί προηγουμένως στο εργαστήριο (υλικά και μέθοδοι 3.1.5) και έφερε το cDNA της ηπατιδίνης με την προσθήκη μιας ετικέτας 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο του πεπτιδίου (Her25-His). Για την μαζική παραγωγή του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκαν 3 φιάλες καλλιέργειας με 500mL θρεπτικό υλικό η καθεμία, ξεκινώντας από μία αποικία του κλώνου Her25-His #35 ακολουθώντας όλα τα στάδια για την ανάπτυξή τους, όπως περιγράφονται στις μεθόδους (υλικά και μέθοδοι 3.2.5). Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης του πεπτιδίου παρουσία μεθανόλης για 3 ημέρες, μετά την απομάκρυνση της γλυκερόλης από το θρεπτικό υλικό. Το υπερκείμενο διάλυμα το οποίο είχε συλλεχθεί ύστερα από φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών, διηθήθηκε από φίλτρο 0,22μm, συμπυκνώθηκε με ειδική συσκευή συμπίκνωσης εφαιπτόμενης συνεχούς ροής εφοδιασμένης με φίλτρο 1kDa cut-off (Pall Corporation Prod # OS001C70). Έγινε προσθήκη κατάλληλου διαλύματος εξισορρόπησης (υλικά και μέθοδοι 3.2.8) και επανασυμπύκνωση στον επιθυμητό όγκο, μέχρις ότου το διάλυμα να αποτελεί ευνοϊκό περιβάλλον για την αλληλεπίδραση μεταξύ των μεταλλικών ιόντων και των ιστιδινών. Η απομόνωση της Her25-His γίνεται με την χρήση χρωματογραφίας μεταλλικής συγγένειας Ni²⁺-NTA (υλικά και μέθοδοι 3.2.8), λόγω της ύπαρξης των 6 ιστιδινών, σε συσκευή ταχείας ροής υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών (FPLC-AKTA purifier). Η ανίχνευση της έκλουσης των πρωτεϊνών από την στήλη έγινε με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 254nm (σχήμα 4.1).



Κλάσματα έκλουσης 1mL

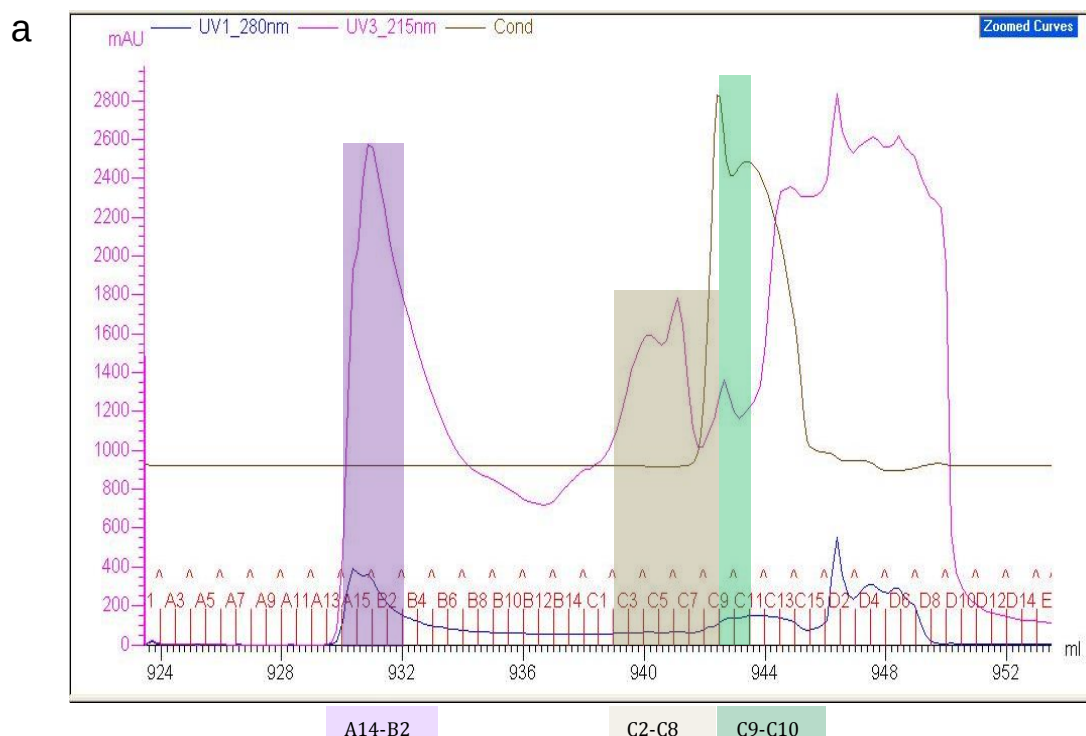
Σχήμα 4.1: Χρωματογράφημα μεταλλικής συγγένειας Ni^{2+} -NTA για την απομόνωση της Hep25-His.

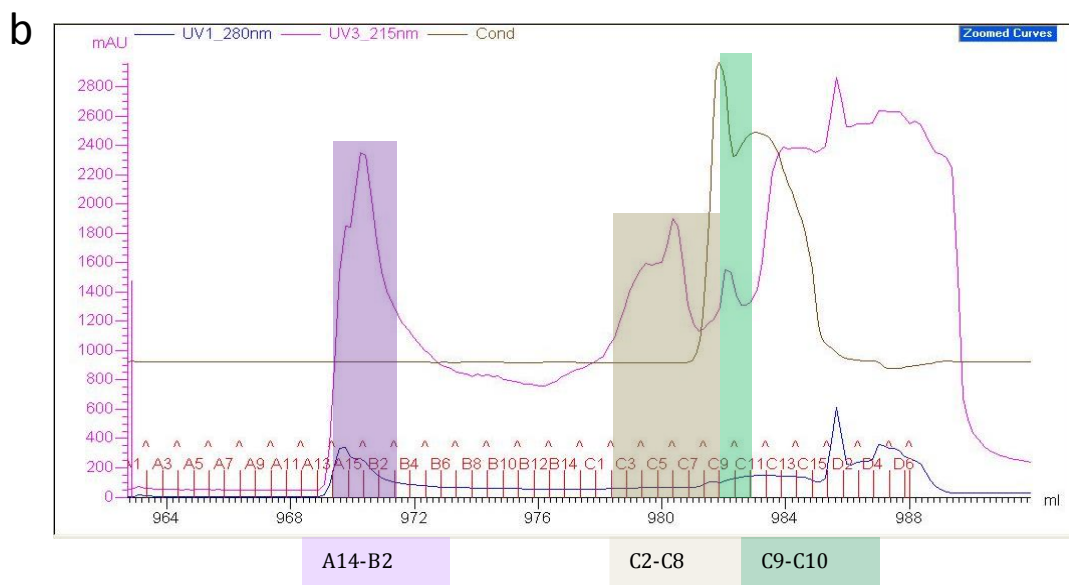
Η ποιοτική ανάλυση των κλασμάτων καθαρισμού του σημασμένου πεπτιδίου Hep25-His με χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας Ni^{2+} -NTA έγινε σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 17% και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2: Πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% των κλάσματα καθαρισμού Hep25-His από τη στήλη μεταλλικής συγγένειας Ni^{2+} -NTA. A6-A12, B1-B3, B8: κλάσματα καθαρισμού, M: δείκτης M.B.

Στο ηλεκτροφόρημα φαίνεται σε όλα τα κλάσματα μία ζώνη μεταξύ 3 και 6kDa, που αντιστοιχεί στο πεπτιδίο Her25-His. Επιλέχθηκαν τα κλάσματα A12-B8 για περαιτέρω καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, λόγω μεγαλύτερης καθαρότητας του πεπτιδίου. Τα κλάσματα αυτά λυοφιλοποιήθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 100μL δις-απεσταγμένο νερό. Τα κλάσματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, στην πρώτη συνενώθηκαν τα κλάσματα A12,B1,B7,B8 (a) και στη δεύτερη τα B2-B6(b) για την πλήρη επαναδιάλυση των αλάτων. Στη συνέχεια υποβλήθηκαν διαδοχικά σε καθαρισμό με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC, Size Exclusive Chromatography) (**σχήμα 4.3**), ώστε να απομονωθεί η μονομερής μορφή της ηπατιδίνης και να απομακρυνθούν τα συσσωματώματα και άλλες οργανικές αλλά και ανόργανες ενώσεις από το τελικό διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε η πεπτιδική στήλη Superdex™ Peptide 10/300 GL στο σύστημα FPLC–Amersham, σε συνθήκες όπως περιγράφονται από την κατασκευαστική εταιρεία GE Healthcare. Η κινητή φάση της στήλης, ήταν NaPB με 150mM NaCl (υλικά και μέθοδοι3.2.9), ενώ συλλέχθηκαν κλάσματα του 1mL.





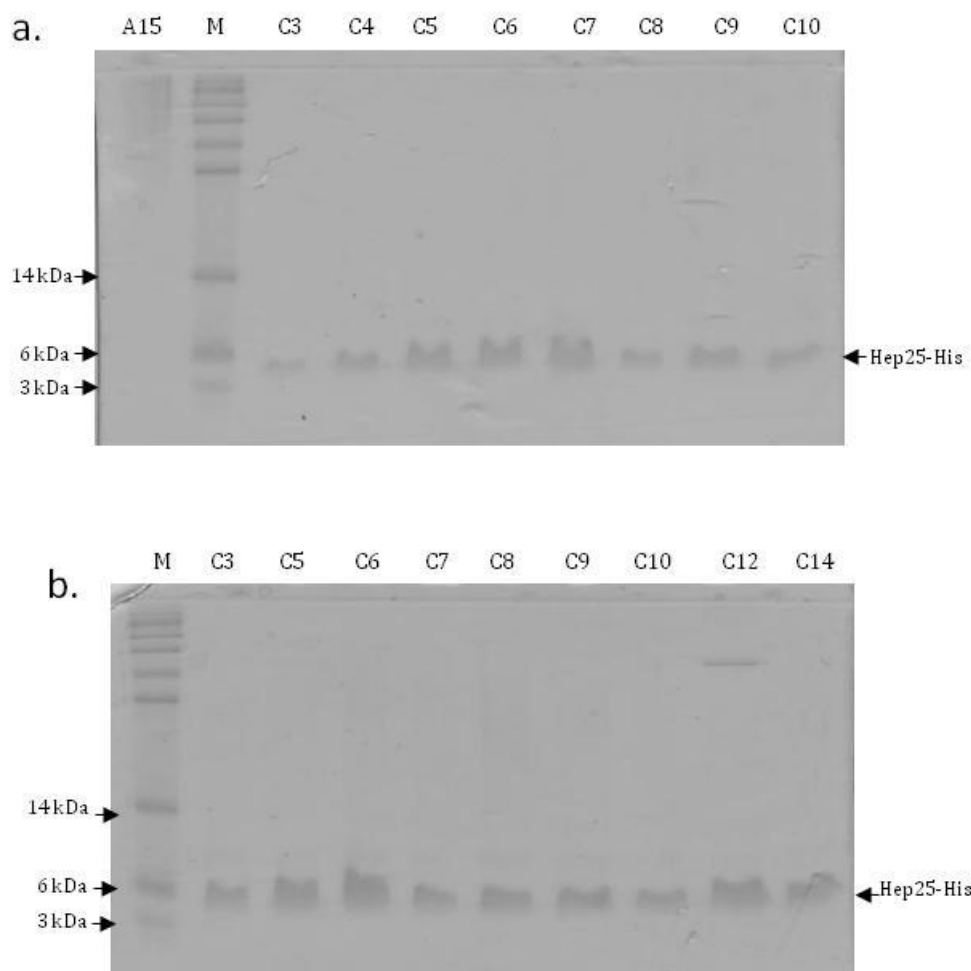
Σχήμα 4.3: Χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης (SEC) καθαρισμού του ανασυνδυασμένου μορίου Hep25-His με στήλη Superdex™ Peptide 10/300 GL

a: Χρωματογράφημα κλασμάτων A12,B1,B7,B8,

b: Χρωματογράφημα κλασμάτων B2-B6.

Τα χρωματογραφήματα a και b των δύο διαδοχικών καθαρισμών είναι πανομοιότυπα παρατηρήθηκε δε η ύπαρξη πολλαπλών κορυφών στα 215 nm.

Η ποιοτική ανάλυση των κλασμάτων έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Παρατηρήθηκε στα κλάσματα A14-B2 της SEC μία κορυφή μεγάλης απορρόφησης στα 215nm η οποία αποδίδεται σε συσσωμάτωμα της ηπατιδίνης ή σε πρωτεΐνες που προσκολλήθηκαν στη στήλη νικελίου μη ειδικά, ή σε συμπλέγματα της ηπατιδίνης με άλλες πρωτεΐνες. Μία διπλή κορυφή στα κλάσματα C2-C8 αποδίδεται σε μικρότερου μεγέθους συσσωματώματα της ηπατιδίνης και μία κορυφή στα κλάσματα C9-C10 αποδίδεται στο μονομερές της ηπατιδίνης (**σχήμα 4.4**). Η μεγάλη απορρόφηση μετά το κλάσμα C11 οφείλεται στο ιμιδαζόλιο.



Σχήμα 4.4: Πηκτή ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες των κλασμάτων που απομονώθηκαν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης των κλασμάτων της Hep25-His.

a: κλάσματα A12,B1,B7,B8 από SEC και

b: κλάσματα B2-B6 από SEC.

Το **σχήμα 4.4a** έδειξε ότι στο κλάσμα A15 της πρώτης κορυφής ανιχνεύθηκαν πρωτεΐνες μεγαλύτερων μοριακών βαρών, ενώ το μονομερές Hep25-His που φάνηκε ότι εκλούστηκε στα κλάσματα C3-C14 δεν αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα της στήλης SEC. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία του SDS στο πήκτωμα, το οποίο μπορεί να αποδιατάξει τα μικρά συσσωματώματα που δημιουργούνται από διαμοριακές έλξεις. Τα κλάσματα της μονομερούς ηπατιδίνης C9-C10 που προέκυψαν από τους δύο καθαρισμούς ενώθηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν μέσω φθορισμομετρίας Qubit

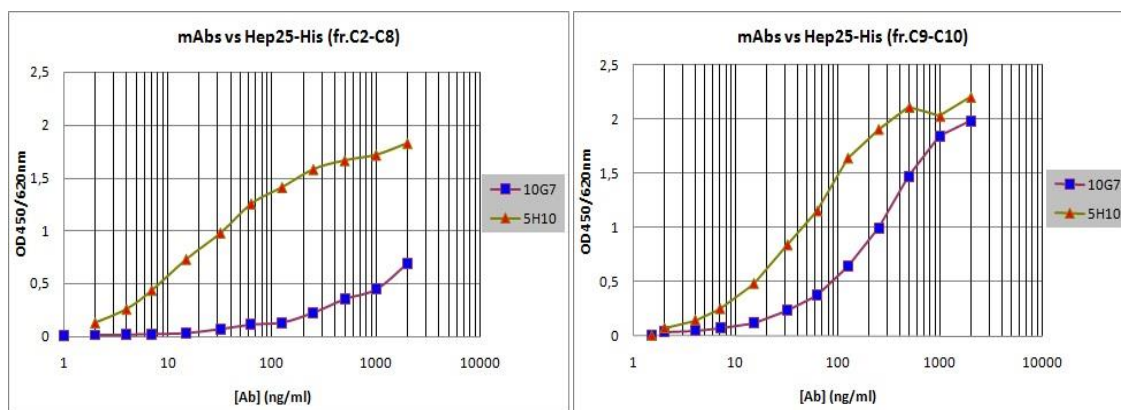
(υλικά και μέθοδοι 3.2.10), κλασματώθηκαν ανά 6 μg σε κάθε eppendorf και τοποθετήθηκαν στους -80°C προς φύλαξη.

Η τελική απόδοση της καλλιέργειας σε μονομερές Hep25-His ήταν $400\mu\text{g/L}$ καλλιέργεια.

4.1.1.1 Χαρακτηρισμός της Hep25-His με μονοκλωνικά αντισώματα

Η ταυτοποίηση του μορίου της ηπατιδίνης έγινε με την βοήθεια ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 5H10 συνδέεται σταθερά με κάθε μορφή της Hep25-His, ενώ η συγγένεια του mAb 10G7 μεταβάλλεται ανάλογα με τη δομή του μορίου. Έχει μεγαλύτερη συγγένεια για μεγάλα συσσωματώματα έναντι μικρότερων δομών, αλλά αναγνωρίζει ισχυρά και τη μονομερή μορφή. Τα κλάσματα C2-C8 που αντιπροσωπεύουν τα ολιγομερή της Hep25 ενώθηκαν σε ένα μείγμα και τα κλάσματα C9-C10 που αντιπροσωπεύουν το μονομερές σε άλλο. $1\mu\text{g/mL}$ του αντιγόνου Hep25-His από το κάθε μείγμα επιστρώθηκαν σε κάθε βοθρίο 2 πλακών ELISA και αναλύθηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις μονοκλωνικών αντισωμάτων (υλικά και μέθοδοι 3.2.11.α) (σχήμα 4.5).

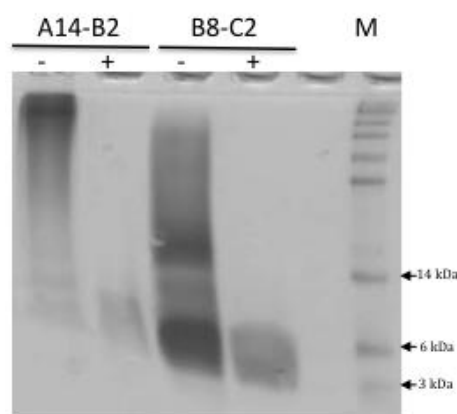
Το αποτέλεσμα έδειξε πως το μονομερές που απομονώσαμε αναγνωρίστηκε ισχυρά και από τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα, γεγονός που πιστοποιεί την απομόνωση υψηλής ποιότητας μονομερούς Hep25-His. Το μονομερές αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ποσοτικοποίησης της ηπατιδίνης στον ανθρώπινο ορό μέσω ανταγωνιστικής ELISA, καθώς και στα πειράματα που εξετάστηκε η αλληλεπίδραση της ηπατιδίνης με την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού HCV, όπως θα δούμε σε επόμενο κεφάλαιο.



Σχήμα 4.5: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της Hep25-His με την μέθοδο ELISA.

4.1.1.2 Διερεύνηση του ρόλου της λυοφιλοποίησης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων ηπατιδίνης

Το μεγαλύτερο τμήμα του πεπτιδίου της ηπατιδίνης σχηματίζει συσσωματώματα, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα και από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Κατά την ανάλυση SDS-PAGE κλασμάτων από άλλες κορυφές της στήλης SEC, η παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT) επιτρέπει τη διάσπαση των συσσωματωμάτων ή ολιγομερών και την παρουσία της ζώνης του μονομερούς στο αναμενόμενο μέγεθος (**σχήμα 4.6**).

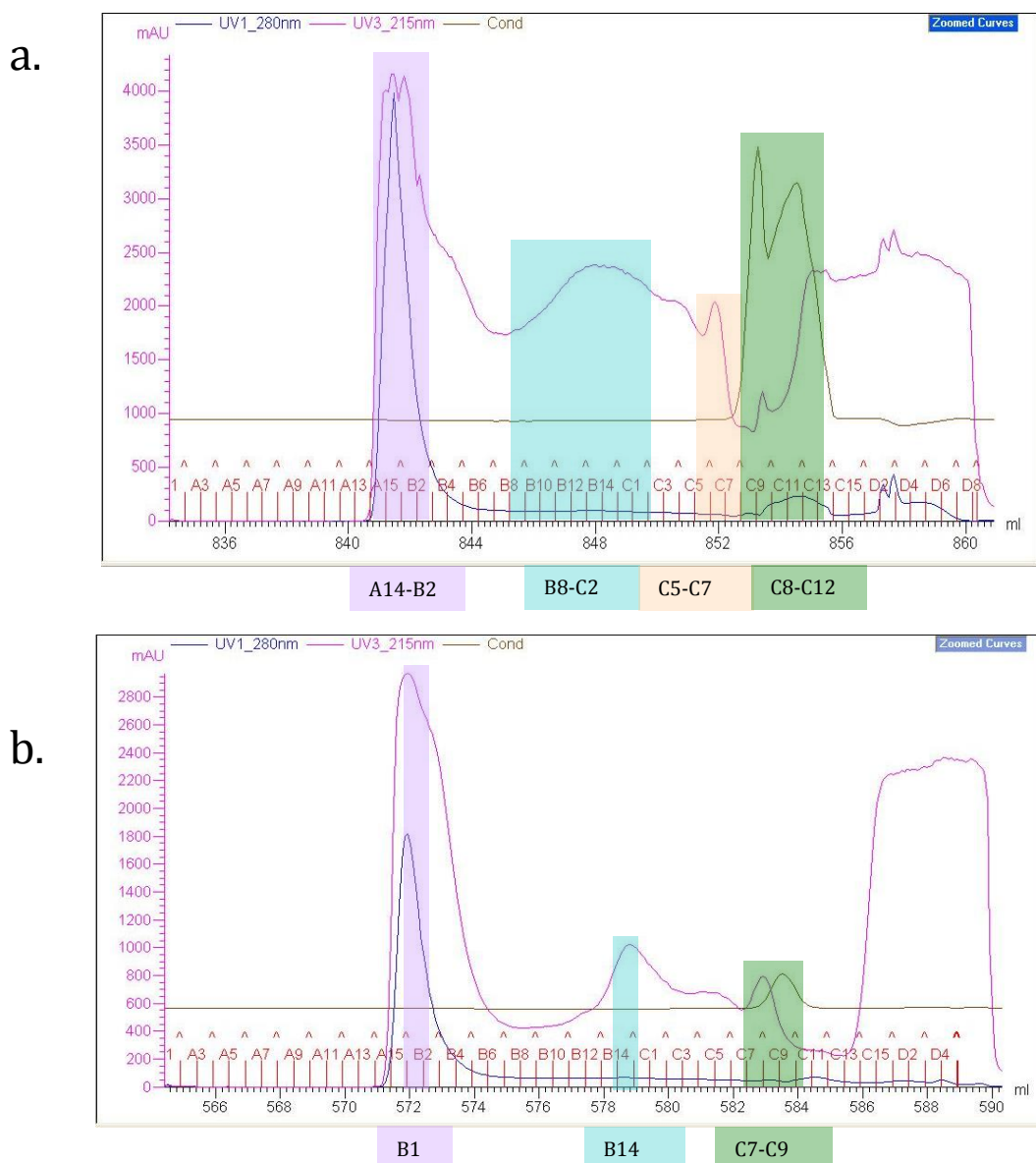


Σχήμα 4.6: Πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% σε αποδιατακτικές συνθήκες (+) και μη (-) των κλασμάτων που περιείχαν συσσωματώματα ηπατιδίνης. M: δείκτης M.B.

Τα κλάσματα που παρουσιάζονται για την ανάλυση της επίδρασης των αποδιατακτικών παραγόντων στα συσσωματώματα, επιλέχθηκαν με βάση το χρωματογράφημα της καλλιέργειας του **σχήματος 4.7.α**. Η μονομερής μορφή της ηπατιδίνης είναι σταθερή στους 28°C. Η χαμηλή θερμοκρασία αλλά και η υψηλή συγκέντρωση ηπατιδίνης που προκύπτει κατά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης, ενδέχεται να ευνοεί τον σχηματισμό συσσωματώματος μέσω της δημιουργίας διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα στα μόρια ηπατιδίνης. Προχωρήσαμε στην παραγωγή καλλιέργειας *P.pastoris* για να διερευνήσουμε αυτήν την πιθανότητα. Για να μειωθεί το φαινόμενο αυτό και επομένως οι απώλειες ποσότητας πεπτιδίου, διαιρέσαμε τον όγκο μιας καλλιέργειας κυττάρων που παρήγαγαν Her25-His σε δύο μέρη. Το ένα μέρος καθαρίστηκε σύμφωνα με το προκαθορισμένο πρωτόκολλο, ενώ το υπόλοιπο, αφού καθαρίστηκε μέσω της στήλης νικελίου, τοποθετήθηκε αμέσως στη στήλη μοριακής διήθησης, παραλείποντας το στάδιο της λυοφιλοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, από 500mL αρχικής καλλιέργειας η χρωματογραφία μεταλλικής συγγένειας Ni²⁺-NTA απέδωσε 10mL πεπτιδίου. Από αυτά τα 3mL συμπυκνώθηκαν με λυοφιλοποίηση και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 0,5mL dd-H₂O. Στη πεπτιδική στήλη μοριακής διήθησης φορτώθηκαν 0,5mL από το λυοφιλοποιημένο δείγμα και επίσης 0,5mL από το μη λυοφιλοποιημένο δείγμα. Να σημειωθεί εδώ ότι η ποσότητα η οποία αναλύθηκε από το μη λυοφιλοποιημένο δείγμα είναι 6 φορές μικρότερη από το λυοφιλοποιημένο δείγμα. Τα χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης των καθαρισμών παρουσιάζονται στο **σχήμα 4.7**.

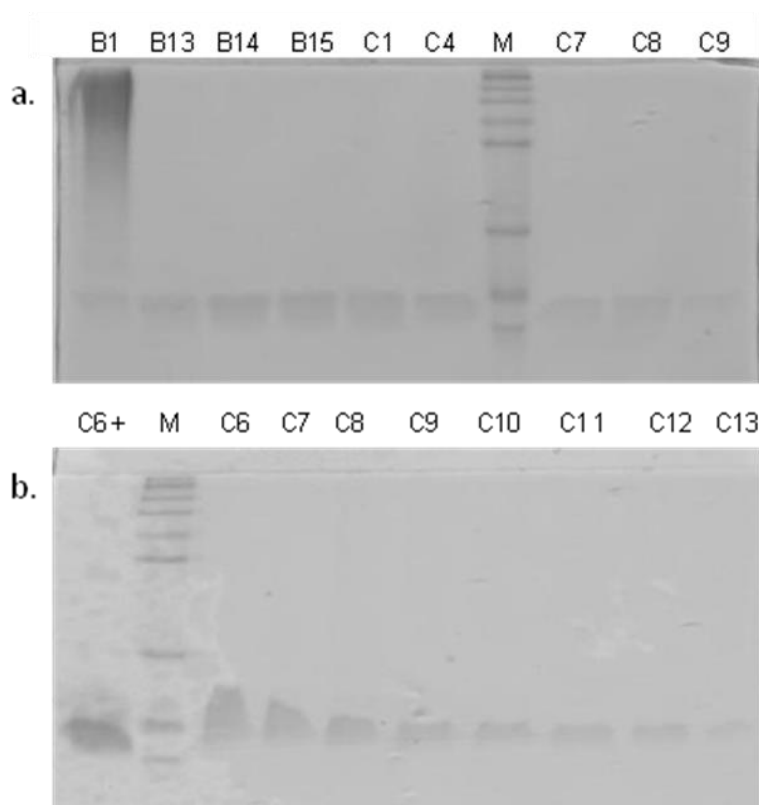
Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε μία κορυφή μεγάλης απορρόφησης στα 215nm στα κλάσματα A14-B4 της SEC, μία δεύτερη κορυφή στα κλάσματα B8-C7, καθώς επίσης και μία κορυφή στο κλάσμα C9 που περιέχει το μονομερές της ηπατιδίνης. Η μεγάλη απορρόφηση μετά το κλάσμα C11 οφείλεται στο ιμιδαζόλιο. Στην περίπτωση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας που δεν υπέστη λυοφιλοποίηση, βλέπουμε ότι όλες οι κορυφές συμπεριλαμβανομένου και του μονομερούς C9 παρουσιάζουν μικρότερη απορρόφηση σε σχέση με το λυοφιλοποιημένο πεπτίδιο. Αυτό όμως οφείλεται στην μειωμένη ποσότητα υλικού που εισήλθε στην στήλη κατά τον καθαρισμό, αφού χωρίς λυοφιλοποίηση οι πρωτεΐνες δεν συμπυκνώθηκαν.

Η ποιοτική ανάλυση των κλασμάτων έγινε μέσω ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση με Coomassie Brilliant Blue (σχήμα 4.8). Και στις δύο περιπτώσεις υπήρχε μονομερές Her25-His, αλλά και πρωτεΐνες υψηλών μοριακών βαρών στα αρχικά κλάσματα, πιθανώς συσσωματώματα ηπατιδίνης (βλ. σχήμα 4.6). Στο σχήμα 4.8.b παρουσιάζεται ενδεικτικά το C6 κλάσμα παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης (C6+) και απουσία (C6). Είναι εμφανής η μείωση του M.B. παρουσία β-ME, άρα και η δημιουργία ολιγομερών.



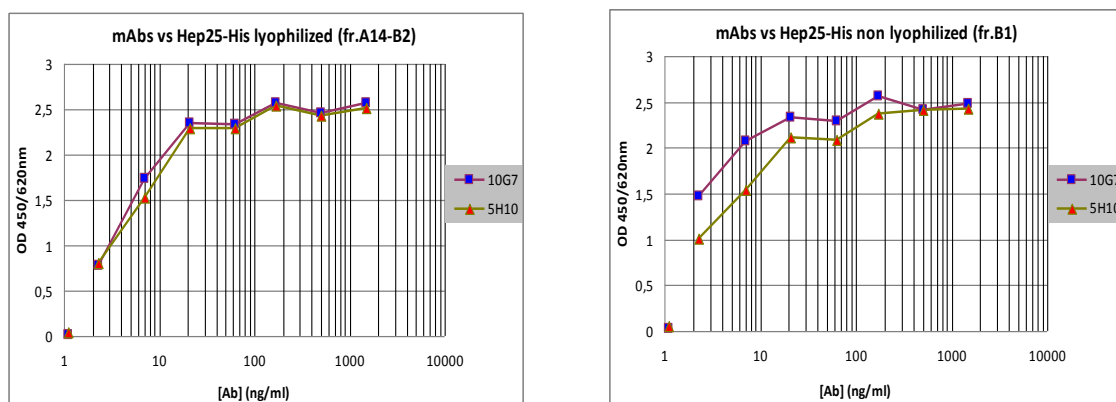
Σχήμα 4.7: Χρωματογραφήματα μοριακής διήθησης καθαρισμού της Her25-His.

a: Λυοφιλοποιημένο δείγμα b: Μη λυοφιλοποιημένο δείγμα.



Σχήμα 4.8: Πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE 17% των κλασμάτων χρωματογραφίας μοριακής διήθησης καθαρισμού Hep25-His, στα οποία δεν έγινε λυοφιλοποίηση (a), ή έγινε λυοφιλοποίηση (b). M: δείκτης M.B., C6+: Το κλάσμα C6 σε αποδιατακτικές συνθήκες.

Για την ταυτοποίηση των συσσωματωμάτων έγινε ανάλυση με τη μέθοδο ELISA, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπήρξε σημαντική μείωσή τους παραλείποντας το στάδιο της λυοφιλοποίησης (σχήμα 4.9).



Σχήμα 4.9: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 στα κλάσματα των συσσωματωμάτων Hep25-His, με λυοφιλοποίηση (a), ή χωρίς (b).

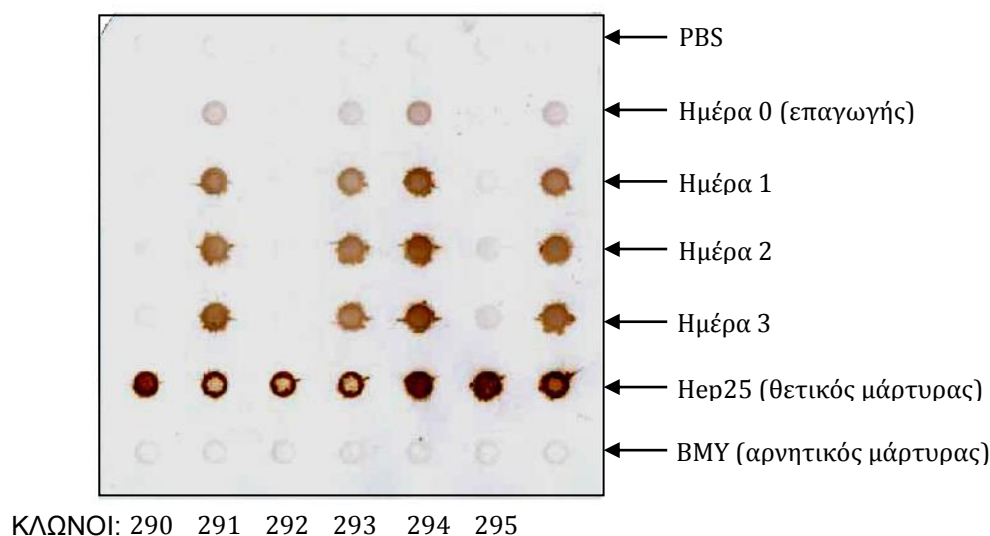
Το συμπέρασμα που προκύπτει από το πείραμα αυτό είναι ότι η μείωση της θερμοκρασίας κατά τη λυοφιλοποίηση, η οποία προηγείται της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, δεν είναι η βασική αιτία δημιουργίας συσσωματωμάτων. Η υπερέκφραση του μορίου της ηπατιδίνης στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας πιθανώς να ενέχεται στη διαμοριακή έλξη, υπόθεση η οποία θα πρέπει να μελετηθεί.

4.1.2 Παραγωγή και καθαρισμός της Hep25

Για να προσεγγίσουμε καλύτερα στη δομή το φυσικό μόριο της ηπατιδίνης, χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης, ο οποίος έφερε το cDNA της ηπατιδίνης Hep25, χωρίς την προσθήκη των 6 ιστιδινών ώστε να είναι ίδιο δηλαδή με το πεπτίδιο άγριου τύπου που βρίσκεται στον άνθρωπο. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο έναντι της Hep25-His, 5H10 και 10G7, αλλά και πολλά ακόμα που κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο και δεν αναφέρονται στην παρούσα διπλωματική εργασία, δοκιμάστηκαν έναντι της Hep25. Αυτά που είχαν συγγένεια με κοινό επίτοπο ανάμεσα στα δύο πεπτίδια, είχαν δηλαδή μεγάλη συγγένεια και με την Hep25 και με την Hep25-His, χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό και την απομόνωση της Hep25. Στο σύνολό τους, τα αντισώματα αναγνωρίζουν την Hep25 (πχ. 10G7), με εξαίρεση το 5H10 που ενώ αναγνωρίζει την Hep25-His, δεν έχει καμία συγγένεια με τη μονομερή μορφή του Hep25. Η συγγένεια του μονοκλωνικού αντισώματος 10G7 με την Hep25 μορφή της ηπατιδίνης επιβεβαιώθηκε επίσης από την ανοσοκατακρήμνιση και ταυτοποίησή της μέσω φασματοσκοπίας μάζας, σε πειράματα που έγιναν παράλληλα από άλλα μέλη του εργαστηρίου. Ο καθαρισμός της Hep25 έγινε με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας. Η διαδικασία παραγωγής της Hep25 μέχρι και το στάδιο της συμπύκνωσης είναι ίδια με την διαδικασία παραγωγής της Hep25-His.

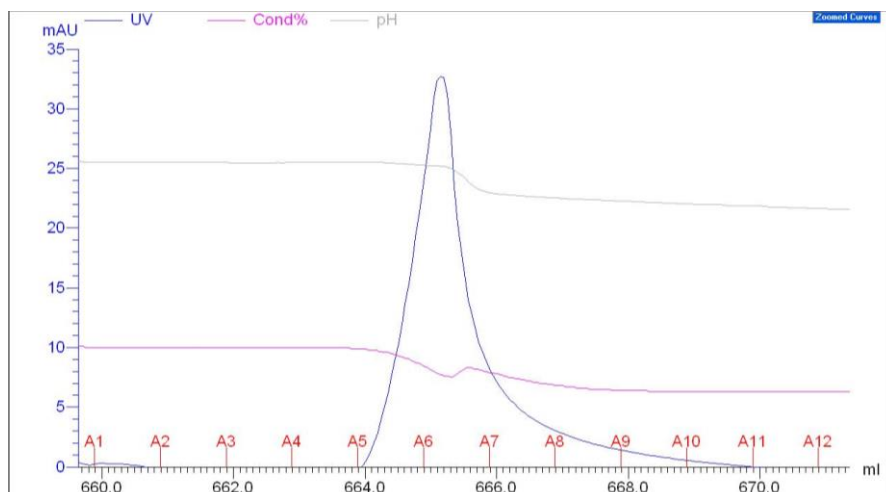
Υπάρχουν στο εργαστήριο διάφοροι κλώνοι της *P.pastoris* για την έκφραση της Hep25. Για την επιλογή του κλώνου που θα χρησιμοποιούσαμε έγινε ανάλυση της έκφρασης των κλώνων σε ηπατιδίνη με την μέθοδο dot-blot (υλικά και μέθοδοι 3.2.6), σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας. Για τον έλεγχο

χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα 10G7 (σχήμα 4.10). Δείγματα καλλιιεργειών συλλέχθηκαν από την κάθε μέρα έκφρασης του πεπτιδίου παρουσία μεθανόλης. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε Her25, η οποία είχε απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε άλλη παραγωγή. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή της καλλιέργειας. Ο κλώνος ο οποίος επιλέχθηκε (294 #35) για την παραγωγή της ηπατιδίνης είχε το ισχυρότερο σήμα.



Σχήμα 4.10: Dot-blot σε διάφορους κλώνους *P. pastoris*.

Το υπερκείμενο της καλλιέργειας, αφού συμπυκνώθηκε σε 200mL, πέρασε στο σύστημα FPLC-AKTA purifier από στήλη χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας που περιείχε σφαιρίδια σεφαρόζης, στα οποία είναι συνδεδεμένα ομοιοπολικά τρία διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα με μεγάλη συγγένεια προς το πεπτίδιο Her25 (mAb10G7, mAb6A5, mAb7G3) (υλικά και μέθοδοι 3.2.4). Ως διάλυμα έκλουσης του πεπτιδίου από την στήλη χρησιμοποιήθηκε 0,1M γλυκίνης pH 2,5 και ως διάλυμα εξουδετέρωσης 1M Tris pH 9,0, ώστε το pH του διαλύματος να επανέλθει στο 7,0 (υλικά και μέθοδοι 3.2.7) (σχήμα 4.11).

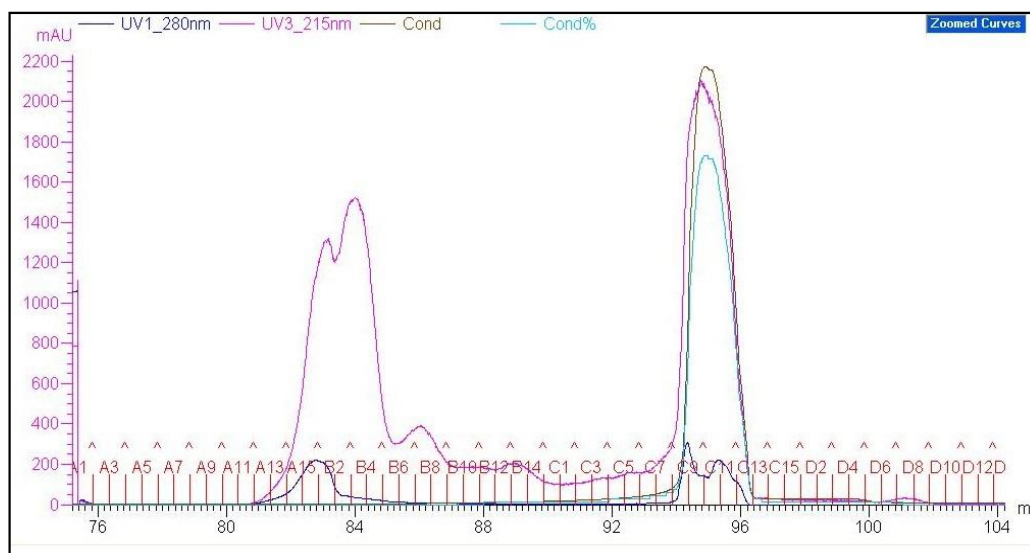


Σχήμα 4.11: Χρωματογράφημα ανοσοσυγγένειας καθαρισμού της Her25.

Τα κλάσματα A5-A7 (όγκου 3mL συνολικά) λόγω της απορρόφησής τους στα 254nm, επιλέχθηκαν, λυοφιλοποιήθηκαν, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500μL dd-H₂O και καθαρίστηκαν εκ νέου με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) στο σύστημα FPLC-Amersham, ώστε να απομονωθεί το μονομερές της Her25 και να απομακρυνθούν τα τυχόν συσσωματώματα, καθώς επίσης και οι άλλες ενώσεις που συνυπάρχουν στο διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το πεπτιδίο, όπως π.χ. γλυκίνη και Tris. Το νερό επιλέχθηκε ως κινητή φάση για τον καθαρισμό της Her25, σε αντίθεση με το διάλυμα φωσφορικού νατρίου το οποίο χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό της Her25-His, διότι θέλαμε το μόριο της ηπατιδίνης που θα απομονώναμε να βρίσκεται μόνο του στο διάλυμα, ώστε να μην επηρεάζουν άλλες ενώσεις του διαλύματος τις ευαίσθητες τεχνικές στις οποίες θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί (πχ κρυσταλλογραφία). Σημειώνεται ότι για τη φύλαξη και του ομόλογου - εμπορικά διαθέσιμου- συνθετικού μορίου της ηπατιδίνης (LEAP-1) συνίσταται η βαθειά κατάψυξη σε διάλυμα υπερκάθαρου νερού.

Στο **σχήμα 4.12** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας από στήλη μοριακής διήθησης Superdex για τον καθαρισμό του πεπτιδίου Her25. Δύο κορυφές απορρόφησης ξεχωρίζουν στο χρωματογράφημα, μία διπλή κορυφή στα κλάσματα A14-B4 που αποδίδεται σε συσσωματώματα του πεπτιδίου και μία στα κλάσματα C8-C12 που αποδόθηκε στην μονομερή

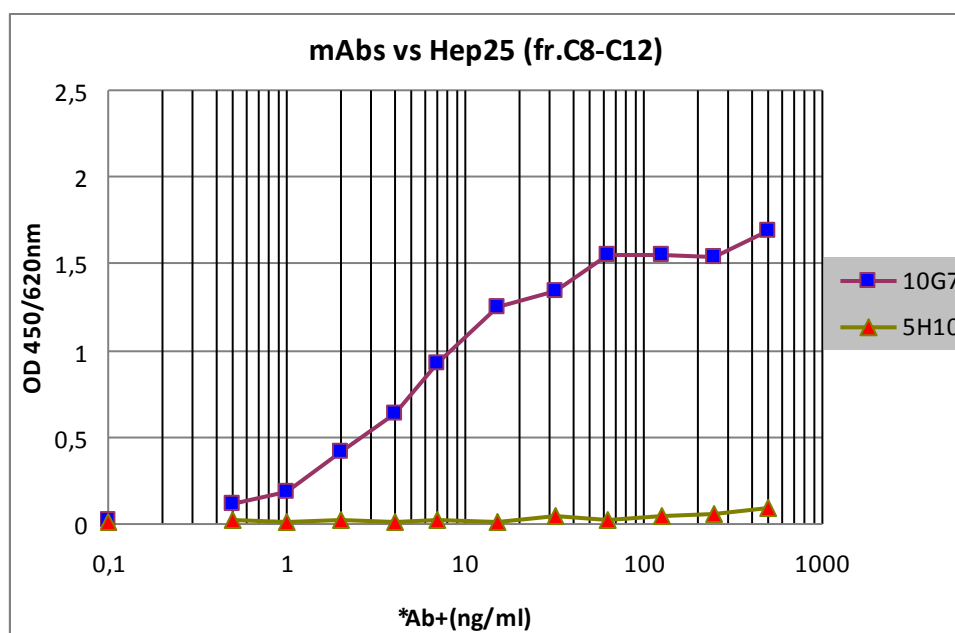
μορφή της Her25. Παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε άλλη κορυφή μετά την έκλυση του μονομερούς που θα αντιστοιχούσε στην έκλυση της γλυκίνης. Όπως θα δειχθεί και παρακάτω η υψηλής έντασης δεύτερη κορυφή απορρόφησης εμπεριέχει και τη γλυκίνη.



Σχήμα 4.12: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης στήλης superdex καθαρισμού του πεπτιδίου Her25.

Κατά τον ποιοτικό έλεγχο των κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-PAGE 17% δεν μπορέσαμε να διακρίνουμε κάποια ζώνη στα κλάσματα C8-C12, όπου θα έπρεπε να είχε εκλυστεί το μονομερές της Her25. Έγινε ηλεκτροφόρηση και σε πήκτωμα τρισίνης (υλικά και μέθοδοι 3.2.1) των ίδιων κλασμάτων για να εξεταστεί αν το περιβάλλον του πηκτώματος δυσκόλευε την κινητικότητα του πεπτιδίου, αλλά και πάλι δεν εμφανίστηκε ζώνη. Πιθανότατα, η ποσότητα του εκλυόμενου πεπτιδίου ήταν πολύ μικρή και η ποσότητα η οποία αναλυόταν στην πηκτή δεν επέτρεπε την εμφάνισή της. Στη συνέχεια, τα ίδια κλάσματα εξετάστηκαν με τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της Her25 σε τεχνική ELISA, η οποία αποτελεί μία πολύ ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης. Το αποτέλεσμα έδειξε την ύπαρξη ποσότητας ηπατιδίνης στην περιοχή έκλυσης C8-C12 (**σχήμα 4.13**). Η ποσοτικοποίηση του δείγματος της Her25 έγινε με φθορισμομετρία και η συγκέντρωσή της στα κλάσματα C8-C12 υπολογίστηκε στα 160 $\mu\text{g/mL}$. Η ποσότητα αυτή δεν αντικατοπτρίζει

όμως την πραγματική ποσότητα πεπτιδίου λόγω παρουσίας της γλυκίνης. Το mAb 5H10 δεν αναγνώριζε το δείγμα, όπως και αναμενόταν. Το mAb10G7 όμως, το οποίο έχει δειχθεί και από άλλα πειράματα πως έχει μεγάλη συγγένεια με το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο Hep25, έδινε ισχυρό σήμα απορρόφησης. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδήγησαν στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης και άλλων παραγόντων ώστε να ελέγξουμε την διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

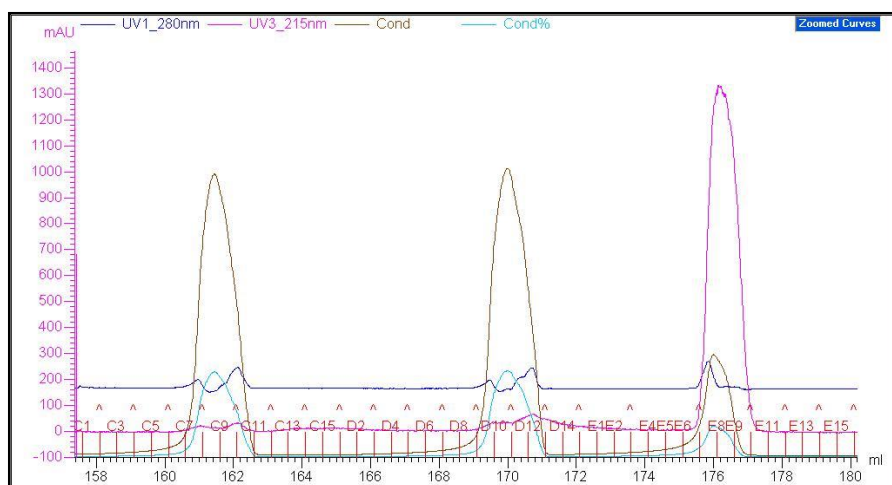


Σχήμα 4.13: Καμπύλες απορρόφησης των μονοκλωνικών αντισωμάτων 10G7 και 5H10 έναντι της Hep25.

4.1.2.1 Προσδιορισμός του όγκου έκλουσης των άλλων ενώσεων του δείγματος

Για την έκλυση του πεπτιδίου από τη στήλη χρωματογραφίας ανοσοσυγγένειας και την εξουδετέρωση του διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν γλυκίνη και Tris, αντίστοιχα. Οι ενώσεις αυτές δεν είναι πτητικές και παραμένουν ύστερα από τη λυοφιλοποίηση και την επαναδιάλυση του πεπτιδίου μέσα στο διάλυμα που φορτώνεται στη στήλη. Έτσι, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε διάλυμα γλυκίνης με Tris χωρίς το πεπτίδιο, ώστε να δούμε σε ποιόν όγκο εκλούνται οι

παραπάνω ενώσεις (**σχήμα 4.14**) και ποιά ένταση απορρόφησης και αγωγιμότητας έχουν. Τα μοριακά βάρη της γλυκίνης και του Tris είναι 75,07g/mol και 121,14g/mol αντίστοιχα. Η συγκέντρωση της γλυκίνης και του Tris, η οποία εισήχθη στη στήλη χρωματογραφίας είναι ίδια με εκείνη του διαλύματος που περιέχεται η Her25 πριν την λυοφιλοποίηση. Ύστερα από τη λυοφιλοποίηση αναμένεται η συγκέντρωση της γλυκίνης να είναι αυξημένη ανάλογα με τον αριθμό των κλασμάτων που ενώθηκαν κατά την επαναδιαλυτοποίηση. Όταν εισήχθη μόνον Tris, αυτό ήταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (200mM) για να είναι ευδιάκριτες οι μεταβολές στο χρωματογράφημα.



Σχήμα 4.14: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης μετά από 3 διαδοχικές ενέσεις 500μL στην στήλη. Οι δύο πρώτες κορυφές προέκυψαν από 200mM Tris και η τρίτη κορυφή από 0,1M γλυκίνη και 50mM Tris.

Τα 200mM Tris εκκλύονται από την στήλη σε όγκο 18,5mL και προκαλούν αύξηση στην αγωγιμότητα, αλλά δεν επηρεάζουν την απορρόφηση στα 215nm. Τα 0,1M γλυκίνης με 50mM Tris εκκλύονται επίσης στα 18,5mL και παρουσιάζουν αύξηση της αγωγιμότητας ίδια με το διάλυμα Tris, ενώ αυξάνεται και η απορρόφηση στα 215nm. Οι δύο ενώσεις δεν διαχωρίστηκαν από την στήλη χρωματογραφίας, πιθανώς λόγω του μικρού και παραπλήσιας τάξης μεγέθους μοριακού τους βάρους. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι εκκλύονται στον όγκο που αναμενόταν να εκλουστεί η Her25. Η αποτυχία του διαχωρισμού των ενώσεων αυτών από το πεπτίδιο μπορεί να οφείλεται στην

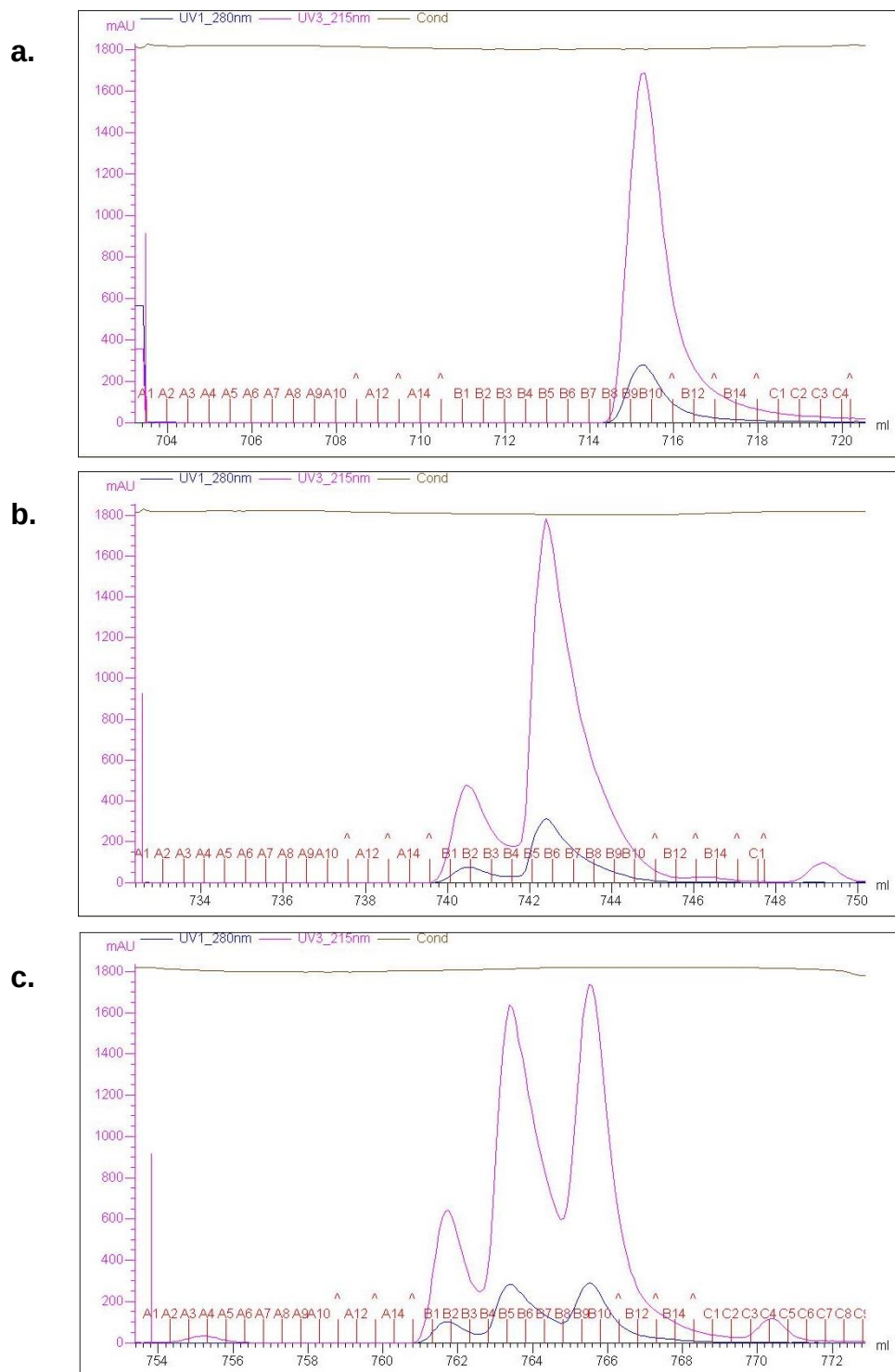
ιοντική ισχύ της κινητής φάσης, που επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων ή σε ελάττωμα της στήλης. Κατά τον καθαρισμό της Her25, η απορρόφηση του πεπτιδίου πιθανώς επικαλύπτεται από εκείνη της γλυκίνης. Σημειώνεται ότι στα 500μL ενέσιμου δείγματος Her25 περιέχονται 600mM γλυκίνης και 300mM Tris, δηλαδή 6 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό διάλυμα έκλουσης, λόγω της συμπύκνωσής τους κατά την λυοφιλοποίηση.

4.1.2.2 Έλεγχος της πεπτιδικής στήλης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης με πρότυπα διαλύματα πρωτεϊνών

Διαπιστώνοντας την αδυναμία διαχωρισμού της Her25 και της γλυκίνης με τη στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών ως πρότυπα δείγματα (**σχήμα 4.15**), για να διαπιστωθεί εάν ο όγκος έκλουσης των πρωτεϊνών αυτών είναι ο αναμενόμενος και εάν θα διαχωριστούν επιτυχώς. Η ινσουλίνη και η απροτινίνη, οι οποίες και δοκιμάστηκαν είναι δύο πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 5.734Da (βοοειδούς) και 6.511,51Da αντίστοιχα, ίδιας τάξης μοριακού βάρους δηλαδή με την ηπατιδίνη που θέλουμε να απομονώσουμε. Η κατασκευαστική εταιρεία της στήλης εμφανίζει την απροτινίνη ως παράδειγμα πρωτεΐνης μεσαίου M.B. ως προς την ικανότητα διαχωρισμού της στήλης, ο όγκος δε στον οποίο εκλούστηκε ήταν 12,5mL. Τοποθετήσαμε στη στήλη 500μL απροτινίνης συγκέντρωσης 400μg/mL με κινητή φάση στήλης NaPB με 150mM NaCl. Επιλέχθηκε το διάλυμα αυτό ως κινητή φάση, διότι με αυτό γίνεται και η απομόνωση του Her-His. Ανάλογα χρησιμοποιήσαμε και 500μL ινσουλίνης συγκέντρωσης 400μg/mL. Τέλος χρησιμοποιήσαμε 500μL μείγματος των δύο πρωτεϊνών σε συγκέντρωση για την καθεμία 400μg/mL.

Η τριτοταγής δομή της απροτινίνης είναι σφαιρική. Ο όγκος έκλουσής της από την στήλη ήταν 12mL, όπως αναμενόταν (**σχήμα 4.15.a**). Για την ινσουλίνη όμως παρατηρείται ότι αν και μικρότερη από την απροτινίνη εκλούστηκε πριν από αυτή σχηματίζοντας περισσότερες από μία κορυφές (**σχήμα 4.15.b**). Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο πεπτίδια, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο διαφορετικός όγκος έκλουσης μπορεί να οφείλεται στην δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε

μόρια ινσουλίνης και στον σχηματισμό πολυμερών διαφόρων μοριακών βαρών, επειδή το σκεύασμα ήταν παλιό. Είναι γνωστό ότι γι'αυτό η ινσουλίνη δεν αποθηκεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το χρωματογράφημα μείγματος απροτινίνης και ινσουλίνης εμφάνισε τρεις κορυφές στα 8, 10 και 12mL (**σχήμα 4.15.c**). Οι όγκοι έκλουσης της κάθε πρωτεΐνης παρέμειναν στο μείγμα τους ίδιοι με αυτούς των μεμονωμένων πρωτεϊνών. Ο έλεγχος πρέπει να επαναληφθεί με φρέσκο σκεύασμα ινσουλίνης για να διαπιστωθεί τελικά αν η στήλη διαχωρίζει ικανοποιητικά.



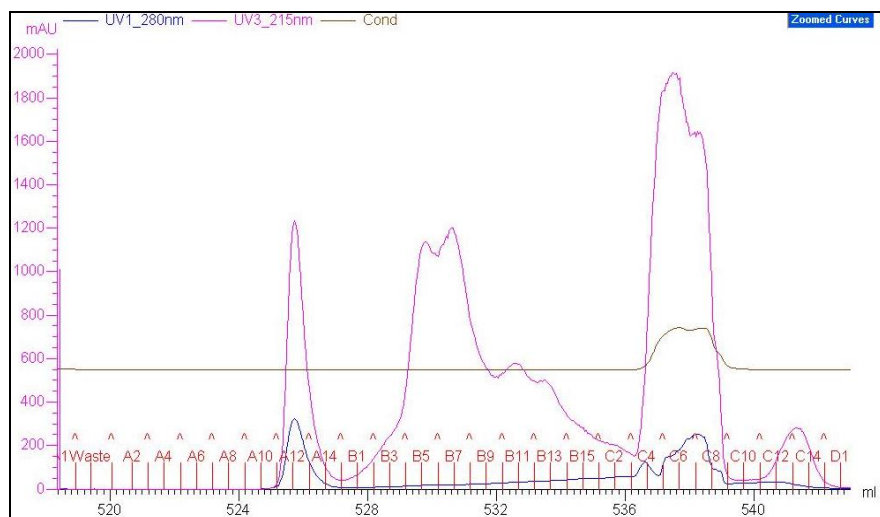
Σχήμα 4.15: Χρωματογραφήματα πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα δείγματα σε συγκέντρωση 400μg/mL. Κινητή φάση: διάλυμα φωσφορικού νατρίου 20mM και 150mM χλωριούχου νατρίου.

a: απροτινίνη, **b:** ινσουλίνη, **c:** απροτινίνη και ινσουλίνη.

4.1.2.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για την απομόνωση της Her25 με κινητή φάση υψηλής αλατότητας

Αφού η στήλη χρωματογραφίας είχε ως ένα βαθμό ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα, προσπαθήσαμε να βελτιστοποιήσουμε την απόδοση του καθαρισμού και να μειώσουμε τις απώλειες του πεπτιδίου στην διαδικασία αυτή, χρησιμοποιώντας διαφορετική κινητή φάση κατά των διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Εάν η χαμηλή συγκέντρωση του πεπτιδίου ήταν ο λόγος, ο οποίος δεν διακρίναμε το πεπτίδιο σε πηκτή ηλεκτροφόρησης και δεν διαχωριζόταν στην χρωματογραφία μοριακής διήθησης με την γλυκίνη, που είχε υψηλή συγκέντρωση, τότε έπρεπε να μειώσουμε τις απώλειες του παραγόμενου πεπτιδίου. Με την προσθήκη ανόργανων αλάτων, όπως φωσφορικού νατρίου και χλωριούχου νατρίου μειώνονται οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σφαιριδίων της στήλης και του πεπτιδίου και η επακόλουθη κατακράτησή μέρους του μέσα στην στήλη. Το υλικό από νέα καλλιέργεια Her25 καθαρίστηκε αρχικά με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας. Στη συνέχεια επιλέχτηκαν τα κλάσματα με βάση την απορρόφησή τους, λυοφιλοποιήθηκαν, έγινε επαναδιάλυση σε 500μL dd-H₂O και το δείγμα πέρασε από στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης σε σύστημα FPLC-Amersham (**σχήμα 4.16**). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 20mM και χλωριούχου νατρίου 150mM.

Στο χρωματογράφημα υπήρχαν και πάλι τρεις περιοχές κορυφών απορρόφησης, μία στα κλάσματα A11-A14 που αποδίδεται στα συσσωματώματα, μία περιοχή πολλαπλών κορυφών στα κλάσματα B3-B8 και B10-B13 που αποδίδεται σε ολιγομερή της Her25 και μία στα κλάσματα C3-C8 που αποδίδεται στην απορρόφηση της γλυκίνης.



Σχήμα 4.16: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης καθαρισμού της Hep25, όπου ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 20mM και χλωριούχου νατρίου 150mM.

Παρά την αλλαγή στην ιονική ισχύ της κινητής φάσης, δεν έγινε διακριτό το πεπτιδίδιο σε κάποιο πηκτώμα ηλεκτροφόρησης, κατά τον ποιοτικό έλεγχο των κλασμάτων, ούτε και διαχωρίστηκε από την γλυκίνη και το Tris.

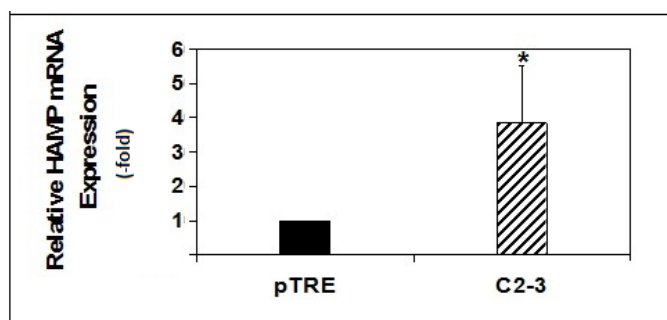
Για την απομόνωση της μονομερής μορφής του Hep25 κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί νέα στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Το χρονικό πλαίσιο της παρούσας εργασίας δεν επέτρεπε την αναμονή της νέας στήλης και το ανασυνδυασμένο μόριο ηπατιδίνης που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ηπατιδίνης στα ηπατικά κύτταρα ήταν το Hep25-His.

4.2 Μελέτη της επίδρασης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) στον σιδηρορυθμιστικό ρόλο της ηπατιδίνης

4.2.1 Η καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV επάγει την έκφραση της ηπατιδίνης

Για να διερευνήσουμε τη ρύθμιση της έκφρασης της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV χρησιμοποιήσαμε δύο TET ON σταθερές επαγόμενες κυτταρικές σειρές ηπατικών κυττάρων που έχουν κατασκευασθεί χρησιμοποιώντας την HepG2 ως αρχική κυτταρική σειρά. Αυτές είναι η pTRE ως κυτταρική σειρά ελέγχου και η C2-3 η οποία υπερεκφράζει την καψιδιακή πρωτεΐνη. Οι δύο κυτταρικές σειρές αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FCS (υλικά και μέθοδοι 3.2.11). Για την πραγματοποίηση του πειράματος απομονώσαμε και μεταφέραμε κύτταρα pTRE και C2-3 πυκνότητας 40×10^4 κυττάρων/mL σε δύο πλάκες 12 βοθρίων. Κάθε βοθρίο της πλάκας περιείχε 1mL DMEM και τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 80% της επιφάνειάς του. Η μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων έγινε με αιματοκυτόμετρο Neubauer και εν συνεχεία έγινε κατάλληλη αραίωση της αρχικής ποσότητας των κυττάρων με DMEM. Έγινε προσθήκη ορού FCS μόνο κατά 0,5% στο υλικό κυτταροκαλιέργειας, ώστε τα κύτταρα να μπορέσουν να συγχρονιστούν στην ίδια φάση, αφού χωρίς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά τα κύτταρα δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν και παραμένουν στην G₀/G₁ φάση του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα παρέμειναν σε συνθήκες στέρησης ορού για 16-18 ώρες. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το DMEM και προστέθηκε νέο υλικό, DMEM με 10% FCS. Στο υλικό των κυττάρων προστέθηκαν 1,6μL/mL Geneticin και 1μL/mL Hygromycin, αντιβιοτικά απαραίτητα για την επιλογή των κυττάρων-κλώνων που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα, καθώς επίσης και 0,1μL/mL doxycycline, η οποία είναι το μόριο επαγωγέας που χρησιμοποιείται στην TET ON σταθερή κυτταρική σειρά για την έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV από τα πλασμίδια. Οι πλάκες με τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες στους 37°C με 5% CO₂. Στη συνέχεια έγινε συλλογή των κυττάρων, αφού απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό τους, έγινε έκπλυση με PBS 1x, και υπέστησαν κυτταρική λύση με την χρήση 300μL ανά βοθρίο RNazol B (υλικά και μέθοδοι 3.2.12).

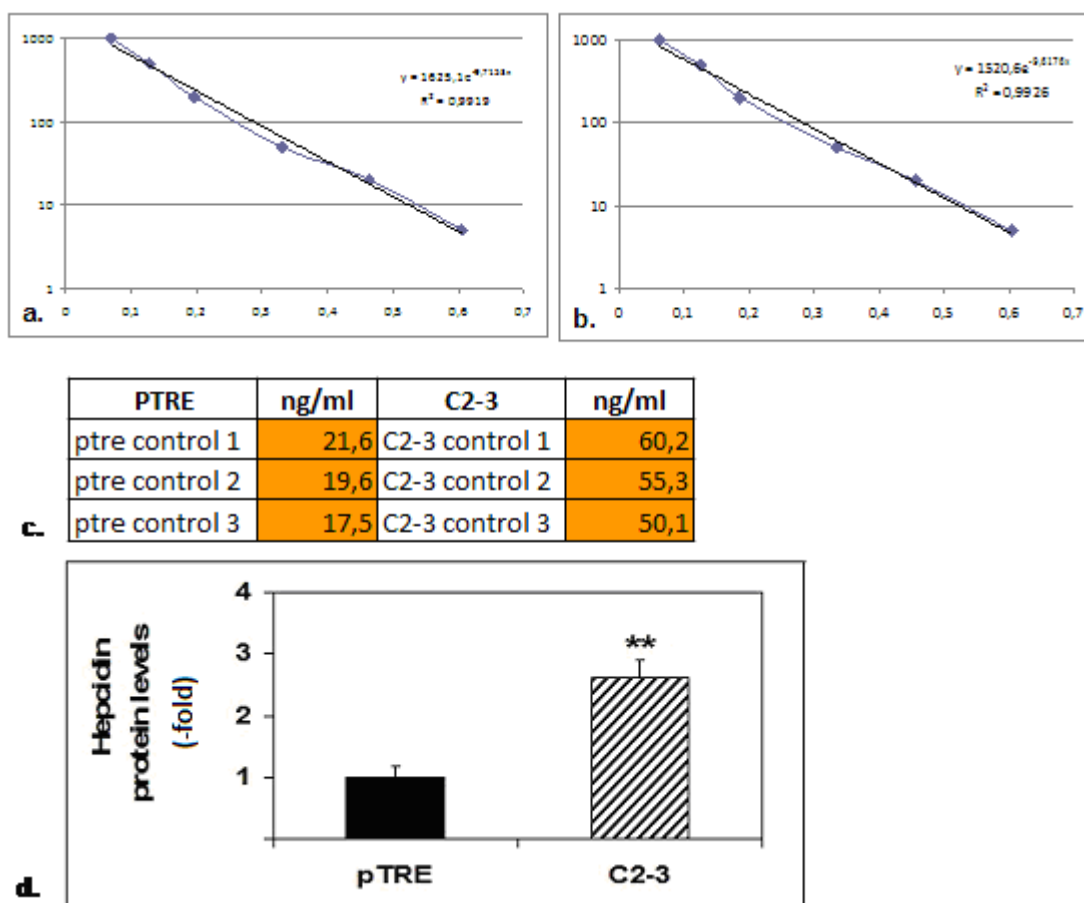
Εν συνεχεία, έγινε απομόνωση του RNA και μέτρηση της συγκέντρωσής του σε συσκευή nanodrop, χρησιμοποιώντας 1μL δείγματος. Χρησιμοποιήθηκε 1μg από το κάθε δείγμα για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (υλικά και μέθοδοι 3.2.14), ώστε να μετατραπεί το ολικό mRNA σε cDNA και ύστερα από αυτό να ενισχυθεί το επιλεγμένο cDNA. Η έκφραση του γονιδίου *hamp* ελέγχθηκε με την μέθοδο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με χρήση εκκινητών ειδικών για το γονίδιο *hamp* (υλικά και μέθοδοι 3.2.15). Για κάθε δείγμα η αντίδραση έγινε εις τριπλούν, χρησιμοποιήθηκαν δε 10μL cDNA από το κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* στα ηπατικά κύτταρα C2-3 παρουσία της καψιδιακής πρωτεΐνης κατά 3-4 φορές (σχήμα 4.17).



Σχήμα 4.17: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* με qPCR.

Ταυτόχρονα έγινε μέτρηση του υπερκείμενου υλικού της κυτταροκαλλιέργειας, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του εκκρινόμενου πεπτιδίου της ηπατιδίνης, με την μέθοδο ELISA. Για τον σκοπό αυτό, μεταφέρθηκαν σε δύο πλάκες ELISA 96 βοθρίων δείγματα από υπερκείμενα κυτταροκαλλιιεργειών pTRE στην μία πλάκα και C2-3 στην άλλη. Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανταγωνιστικού τύπου. 1μg/mL αντιγόνου Her25-His επιστρώθηκε σε κάθε βοθρίο της πλάκας και επωάστηκε ολονύκτια στους 4°C υπό ανάδευση. Ταυτόχρονα έγινε επώαση 25 μL πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της Her25-His (κατασκευασμένο στο εργαστήριο μοριακής βιολογίας και ανοσοβιοτεχνολογίας του ελληνικού ινστιτούτου παστέρ) συγκέντρωσης 0,33mg/L με 8μL υπερκείμενου υγρού καλλιέργειας για κάθε αντίδραση ή με Her25-His σε διάφορες συγκεντρώσεις για την πρότυπη καμπύλη (υλικά και

μέθοδοι 3.2.10.). Την επόμενη ημέρα έγινε προσθήκη του συμπλέγματος αντισώματος-ηπατιδίνης στις πλάκες για 1 ώρα στους 37°C, ώστε να γίνει πρόσδεση των ελεύθερων από ηπατιδίνη αντισωμάτων πάνω στην Her25-His της πλάκας. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος έναντι ανοσοσφαιρίνης ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση (goat anti-mouse IgG/HRP, Pierce Prod # 31437) σε αραίωση 1:4.000. Μετά την ανάπτυξη σήματος με το TMB kit (Thermo Scientific) έγινε ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του αντιγόνου με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης. Οι τιμές των απορροφήσεων ήταν αντιστρόφως ανάλογες των τιμών συγκέντρωσης της Her25-His. Οι πρότυπες καμπύλες, καθώς και ο μέσος όρος των τιμών από τα τετραπλά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στο **σχήμα 4.18**.



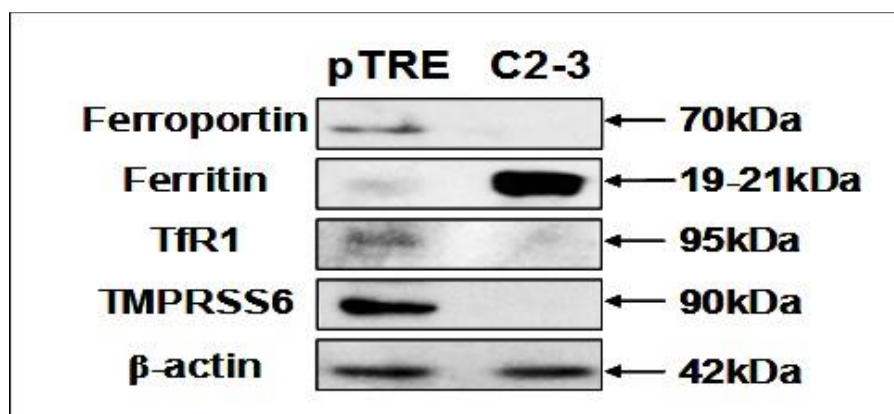
Σχήμα 4.18: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA. Πρότυπη καμπύλη των κυττάρων: pTRE (a) και C2-3 (b), Τιμές συγκέντρωσης ηπατιδίνης (c), Σύγκριση στην αύξηση

των επιπέδων ηπατιδίνης απουσία (pTRE) ή παρουσία (C2-3) της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV (d).

Το εκκρινόμενο πεπτιδίο είχε 2-3 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση στο υπερκείμενο των C2-3 κυττάρων που υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV, σε σχέση με την κυτταρική σειρά ελέγχου pTRE. Αναλυτικότερα, οι τιμές των συγκεντρώσεων ηπατιδίνης που μετρήθηκαν ήταν $18,6 \pm 3,2 \text{ ng/mL}$ για τα κύτταρα pTRE και $48,9 \pm 11,5 \text{ ng/mL}$ για τα C2-3 κύτταρα.

Η αύξηση των επιπέδων του mRNA και του εκκρινόμενου πεπτιδίου ταυτόχρονα υποδεικνύουν την μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *hamp* από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV. Επιπλέον ελέγχθηκε η συγκέντρωση και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του σιδήρου με ανάλυση κατά Western, καθώς η ηπατιδίνη είναι κεντρική πρωτεΐνη στην ρύθμιση του σιδήρου και ενδέχεται η αυξημένη έκφρασή της να επηρεάζει την έκφραση και άλλων σιδηρορυθμιστικών πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση της φερροπορτίνης, που είναι υπεύθυνη για την εξαγωγή του σιδήρου από τα κύτταρα, της φερριτίνης, υπεύθυνης για την αποθήκευση του σιδήρου στα κύτταρα, του υποδοχέα της τρανσφερρίνης τύπου 1 (TfR1), υπεύθυνου για την εισαγωγή του δεσμευμένου από την τρανσφερρίνη σιδήρου και της ματριπτάσης (TMPRSS6), η οποία είναι αρνητικός ρυθμιστής του γονιδίου *hamp*. Η ματριπτάση είναι μία πρωτεάση σερίνης, η οποία εμπλέκεται σε διαδικασίες αναδόμησης στο ήπαρ. Για την απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, 80×10^4 από κυτταροκαλλιέργειες pTRE και C2-3 καλλιεργήθηκαν σε κάθε βοθρίο σε πλάκες 6 βοθρίων. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 48 ώρες και ακολούθησε συλλογή και λύση των κυττάρων (υλικά και μέθοδοι 3.2.12). Για την ανάλυση κατά Western πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση $40 \mu\text{g}$ πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE 10% για την ανάλυση της ματριπτάσης και του TfR1 και 12% για την ανάλυση της φερριτίνης και της φερροπορτίνης και μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (υλικά και μέθοδοι 3.2.2). Τέλος, έγινε επώαση των μεμβρανών με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για την κάθε πρωτεΐνη, επώαση με 2^ο σημασμένο ειδικό αντίσωμα για κάθε μονοκλωνικό αντίσωμα, εμφάνιση

και μέτρηση του σήματος (υλικά και μέθοδοι 3.2.3). (σχήμα 4.19). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός δείκτης για την κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών.



Σχήμα 4.19: Ανάλυση κατά Western από εκχύλισμα κυττάρων pTRE και C2-3 με αντισώματα έναντι πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου.

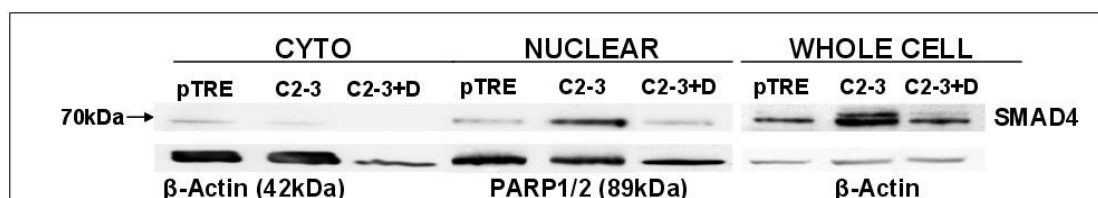
Η αυξημένη έκφραση και έκκριση της ηπατιδίνης, όπως αναμενόταν, οδήγησε σε μεγάλη μείωση της συγκέντρωσης της φερροπορτίνης που αποτελεί τον υποδοχέα της ηπατιδίνης, στην έκφραση του υποδοχέα της τρανσφερίνης τύπου 1 (TfR1), καθώς και του αρνητικού ρυθμιστή της ηπατιδίνης, την ματριπτάση (TMPRSS6). Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της φερριτίνης που αντικατροπτίζει την αύξηση του σιδήρου στο εσωτερικό των κυττάρων.

4.2.2 Τα σηματοδοτικά μονοπάτια BMP/SMAD και STAT3 εμπλέκονται στην ρύθμιση της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια BMP/SMAD και STAT3 εμπλέκονται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες. Η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα, μέσα από έναν καταρράκτη αντιδράσεων και ενεργοποίησης μορίων την επαγωγή της έκφρασης στοχευμένων γονιδίων. Για να εξετάσουμε αν η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *hamp* ρυθμίζεται μέσω της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών

μονοπατιών BMP και STAT3, προκαλέσαμε φαρμακευτική αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών, χρησιμοποιώντας την μικρή οργανική ένωση dorsomorphin (D), έναν φαρμακευτικό αναστολέα του BMP/SMADs, και τον STAT inhibitor VII (S), ο οποίος παρεμποδίζει στοχευμένα την μεταγραφή του γονιδίου *Stat3*. Για την διερεύνηση της ανάμειξης του μονοπατιού BMP/SMAD στην ρύθμιση της HAMP από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV, παρακολουθήσαμε την συμπεριφορά της SMAD4 παρουσία της πρωτεΐνης. Η SMAD4, επίσης γνωστή και ως co-SMAD, είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των σημάτων BMP/SMAD στον πυρήνα των κυττάρων μέσω ετεροδιμερισμού με τους "receptor regulated SMAD members" (R-SMADs).¹²⁵ Είναι γνωστό ότι η SMAD4 φωσφορυλιώνεται και η μεταφορά της στον πυρήνα υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού.¹²⁵

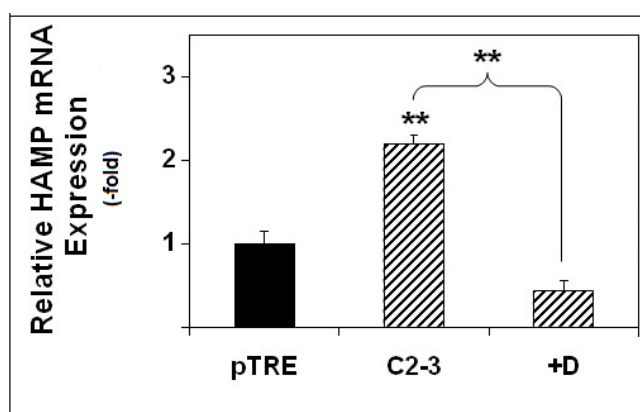
80x10⁴ κύτταρα pTRE και C2-3 μεταφέρθηκαν σε κάθε βοθρίο σε πλάκες 6 βοθρίων και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία του αναστολέα dorsomorphin (D) σε συγκέντρωση 10μM. Ύστερα από καλλιέργεια των κυττάρων για 48 ώρες πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση των κυττάρων (υλικά και μέθοδοι 3.1.3), ώστε να είναι δυνατή η ανάλυση χωριστά των πρωτεϊνών που βρίσκονται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Επίσης έγινε παραλαβή και του συνολικού εκχυλίσματος των κυττάρων (whole cell extracts). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 40μg πρωτεΐνης σε πηκτή SDS-PAGE 12% (υλικά και μέθοδοι 3.2.2) και ανάλυση κατά Western (υλικά και μέθοδοι 3.2.3) με το anti-SMAD4 πολυκλωνικό αντίσωμα (υλικά και μέθοδοι 3.1.2). Η PARP1/2 και η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικοί δείκτες κανονικοποίησης για το πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα αντίστοιχα (σχήμα 4.20).



Σχήμα 4.20: Ανάλυση κατά Western του κυτταροπλασματικού και πυρηνικού κλάσματος, καθώς και του συνολικού εκχυλίσματος των κυττάρων pTRE και C2-3 με anti-SMAD4 πολυκλωνικό αντίσωμα.

Όπως φαίνεται από το συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα, η καψιδιακή πρωτεΐνη επάγει τα επίπεδα έκφρασης της SMAD4. Επιπλέον παρατηρήθηκε μετατόπιση της SMAD4 από το κυταρόπλασμα στον πυρήνα, κάτι που σημαίνει ενεργοποίηση του μονοπατιού BMP/SMAD. Η αυξημένη έκφραση και μετατόπιση της SMAD4 στον πυρήνα παρεμποδίστηκε από τον αναστολέα dorsomorphin (D).

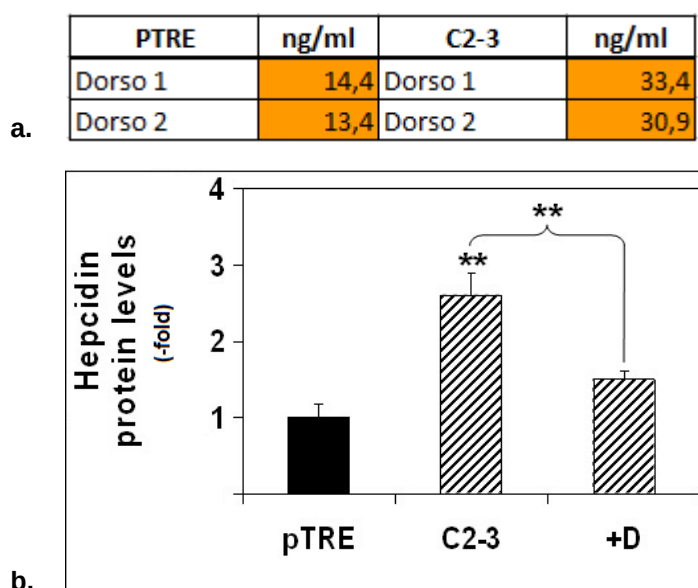
Για τον έλεγχο της έκφρασης της HAMP παρουσία του αναστολέα dorsomorphin έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με χρήση εκκινητών ειδικών για το γονίδιο *hamp*. Καλλιεργήθηκαν συγχρονισμένα κύτταρα pTRE και C2-3 πυκνότητας 40×10^4 κύτταρα/mL σε δύο πλάκες 12 βοθρίων. Μετά την επαγωγή τους για την έκφραση της καψιδιακής πρωτεΐνης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες στους 37°C με 5% CO_2 , απουσία ή παρουσία του αναστολέα dorsomorphin σε συγκέντρωση 10 μM . Στη συνέχεια έγινε συλλογή των κυττάρων και κυτταρική λύση με την χρήση 300 μL ανά βοθρίο RNAzol B (υλικά και μέθοδοι 3.2.12). Εν συνεχεία έγινε απομόνωση του mRNA και δημιουργία cDNA με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (υλικά και μέθοδοι 3.2.14). Για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) χρησιμοποιήθηκαν 10 μL cDNA από το κάθε δείγμα (υλικά και μέθοδοι 3.2.15) (σχήμα 4.21).



Σχήμα 4.21: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία και του αναστολέα dorsomorphin με qPCR.

Η παρουσία του αναστολέα dorsomorphin στα κύτταρα C2-3 που υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη, ανέστειλε πλήρως την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *hamp*. Έγινε μέτρηση του υπερκείμενου υγρού της καλλιέργειας των κυττάρων, για τον προσδιορισμό της επίδρασης του αναστολέα στην συγκέντρωση του εκκρινόμενου πεπτιδίου της ηπατιδίνης, με την μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA (υλικά και μέθοδοι 3.2.10.β). Οι πρότυπες καμπύλες είναι κοινές σε αυτή τη σειρά πειραμάτων με τα αντίστοιχα του σχήματος 4.18, καθώς οι μετρήσεις όλων των δειγμάτων έγιναν ταυτόχρονα.

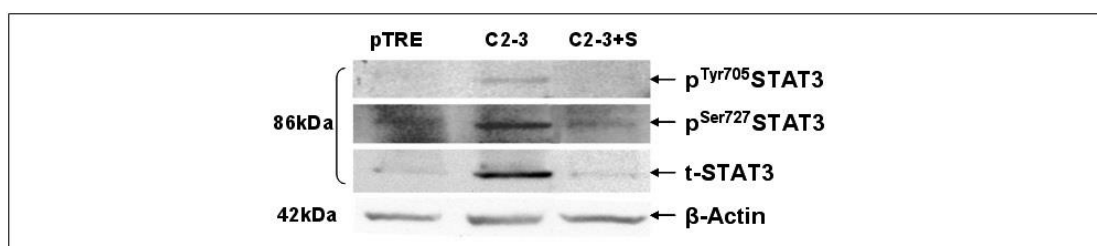
Οι μετρήσεις στα υπερκείμενα των κυττάρων έδειξαν ότι και τα επίπεδα του εκκρινόμενου πεπτιδίου της ηπατιδίνης μειώθηκαν στα επίπεδα του μάρτυρα όταν προστέθηκε ο αναστολέας dorsomorphin (σχήμα 4.22).



Σχήμα 4.22: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA. a: Τιμές συγκέντρωσης ηπατιδίνης παρουσία του αναστολέα dorsomorphin, b: Σύγκριση στην αύξηση των επιπέδων ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV παρουσία του αναστολέα dorsomorphin.

Για να εκτιμήσουμε την εμπλοκή του μονοπατιού STAT3 στη ρύθμιση της έκφρασης της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού HCV,

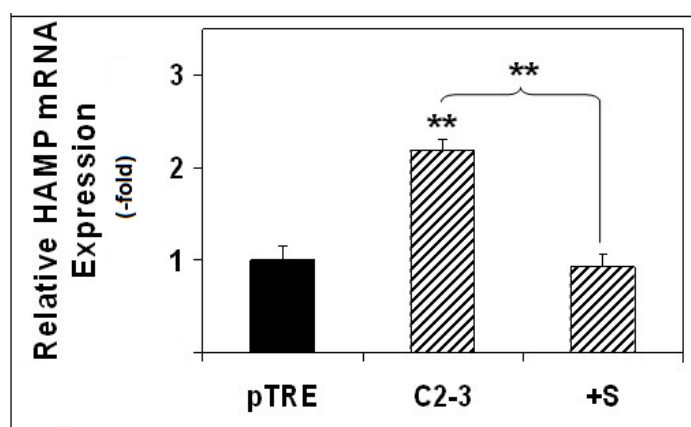
χρησιμοποιήθηκε μία παρόμοια προσέγγιση με εκείνη που περιγράφηκε για τη SMAD4. Η φωσφορυλίωση της STAT3 και η έκφρασή της παρουσία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης διερευνήθηκε με ανάλυση κατά Western σε εκχυλίσματα κυττάρων από pTRE και C2-3 κύτταρα απουσία ή παρουσία του STAT inhibitor VII (S), σε συγκέντρωση 4μM (**σχήμα 4.23**). Έγινε απομόνωση του συνολικού εκχυλίσματος των κυττάρων (whole cell extracts) και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 40μg πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-PAGE 12% (υλικά και μέθοδοι 3.2.2) και ανάλυση κατά Western (υλικά και μέθοδοι 3.2.3) με το anti-Phospho-Stat3 (Tyr705) μονοκλωνικό αντίσωμα, το anti-Phospho-Stat3 (Ser727) μονοκλωνικό αντίσωμα και το anti-Stat3 (anti-total) πολυκλωνικό αντίσωμα (υλικά και μέθοδοι 3.1.2) Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης κανονικοποίησης για το πρωτεϊνικό φορτίο.



Σχήμα 4.23: Ανάλυση κατά Western blot σε εκχύλισμα κυττάρων pTRE και C2-3 με anti-total (t) και anti-phospho (p) STAT3 αντίσωμα.

Η STAT3 βρέθηκε να φωσφορυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα, Tyr705 και Ser727, καθώς και η έκφρασή της να επάγεται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη, ενώ ο STAT3 αναστολέας κατάφερε να παρεμποδίσει την επαγωγική ρύθμιση και φωσφορυλίωση της STAT3. Για τον έλεγχο της έκφρασης της HAMP παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (S) έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με χρήση εκκινητών ειδικών για το γονίδιο *hamp*. Καλλιεργήθηκαν συγχρονισμένα κύτταρα pTRE και C2-3 πυκνότητας 40×10^4 κύτταρα/mL σε δύο πλάκες 12 βοθρίων. Μετά την επαγωγή τους για την έκφραση της πρωτεΐνης καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες στους 37°C με 5% CO₂, απουσία ή παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (S) σε συγκέντρωση 4μM. Στη

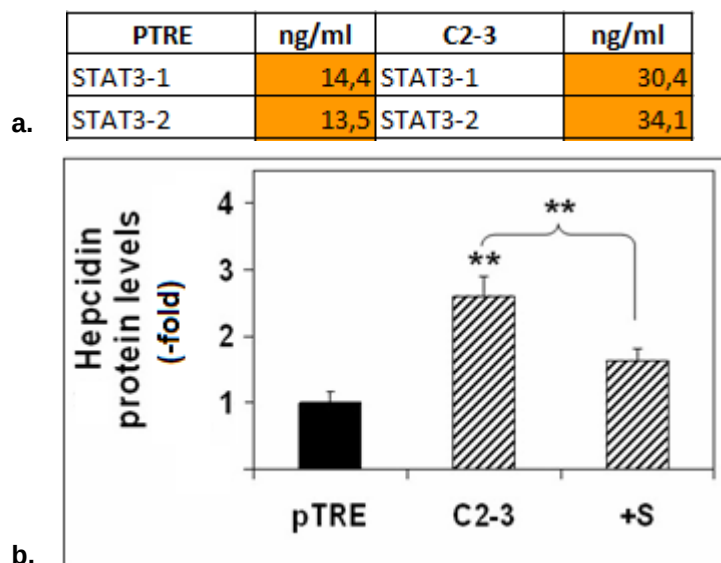
συνέχεια έγινε συλλογή των κυττάρων, και κυτταρική λύση με την χρήση 300μL ανά βοθρίο RNAzol B (υλικά και μέθοδοι 3.2.12). και απομόνωση του mRNA και δημιουργία cDNA με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (υλικά και μέθοδοι 3.2.14). Για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) χρησιμοποιήθηκαν 3μL cDNA για κάθε αντίδραση (υλικά και μέθοδοι 3.2.15) (**σχήμα 4.24**).



Σχήμα 4.24: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (S) με qPCR.

Η χρήση του αναστολέα STAT inhibitor VII παρεμπόδισε την αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *hamp* που προκαλεί η καψιδιακή πρωτεΐνη και τα επανέφερε στα φυσιολογικά επίπεδα, υποδηλώνοντας πως η πρωτεΐνη αυτή του HCV επάγει την έκφραση της ηπατιδίνης μέσω και της σηματοδότησης του μονοπατιού BMP/SMAD και της φωσφορυλίωσης της STAT3, τα οποία είναι απαραίτητο να ενεργοποιηθούν και τα δύο ταυτόχρονα. Αναστολή ενός εκ των δύο συνεπάγεται ολική αναστολή της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου *hamp*.

Ανάλυση με ανταγωνιστική ELISA έγινε στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών για την μέτρηση της εκκρινόμενης ηπατιδίνης. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της μειώθηκαν επίσης στο επίπεδο του αρνητικού μάρτυρα παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (**σχήμα 4.25**).



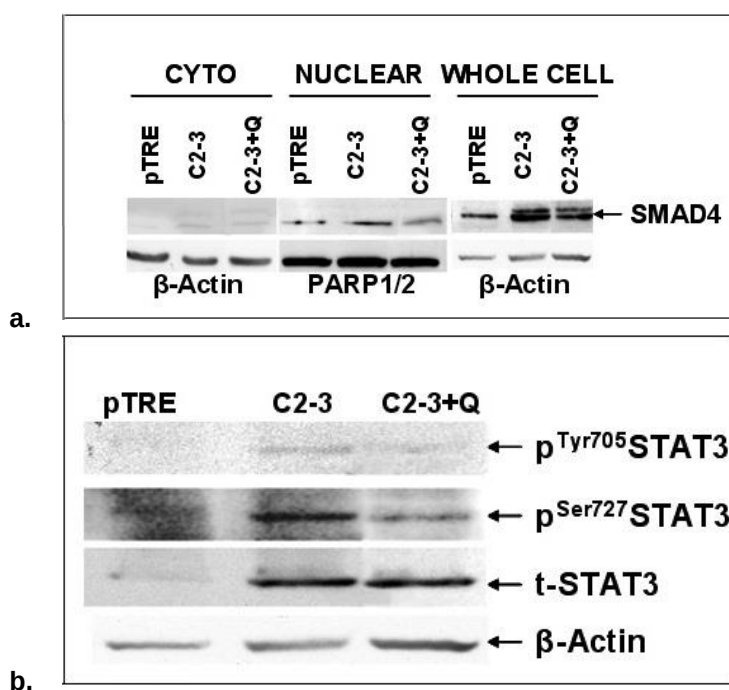
Σχήμα 4.25: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII (+S). a: Τιμές συγκέντρωσης ηπατιδίνης. b: Σύγκριση της αύξηση των επιπέδων ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV παρουσία του αναστολέα STAT inhibitor VII.

4.2.3 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV προκύπτει από την ενεργοποίηση των μονοπατιών STAT3 και BMP/SMAD, από την κινάση CK2

Η CK2 είναι μία πλειοτροπική κινάση, η οποία αλληλεπιδρά και ρυθμίζει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το JAK/STAT και το BMP/SMAD. Με σκοπό να διερευνήσουμε το μηχανισμό δράσης της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV, εξετάσαμε την εμπλοκή της CK2 στην ρύθμιση της έκφρασης της HAMP από την πρωτεΐνη και την πιθανή αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες STAT3 και SMAD4. Ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της CK2, η quinalizarin (Q) χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα με τα κύτταρα που σταθερά υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη (C2-3) και την κυτταρική σειρά ελέγχου (pTRE), ώστε να εκτιμηθεί η υποθετική ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση της STAT3 και SMAD4, καθώς και η θετική ρύθμιση του γονιδίου *hamp* παρουσία της πρωτεΐνης.

80x10⁴ κύτταρα pTRE και C2-3 μεταφέρθηκαν σε κάθε βοθρίο σε πλάκες 6 βοθρίων, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία του αναστολέα

quinalizarin (Q) σε συγκέντρωση 1μM. Ύστερα από καλλιέργεια των κυττάρων για 48 ώρες πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση των κυττάρων (υλικά και μέθοδοι 3.1.3). Επίσης έγινε παραλαβή και του συνολικού εκχυλίσματος των κυττάρων (whole cell extracts). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση 40μg πρωτεΐνης σε πηκτή SDS-PAGE 12% (υλικά και μέθοδοι 3.2.2) και ανάλυση κατά Western (υλικά και μέθοδοι 3.2.3) με το anti-SMAD4 πολυκλωνικό αντίσωμα και όλα τα anti-STAT3 (υλικά και μέθοδοι 3.1.2). Η PARP1/2 και η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικοί δείκτες κανονικοποίησης για το πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα αντίστοιχα (σχήμα 4.26).

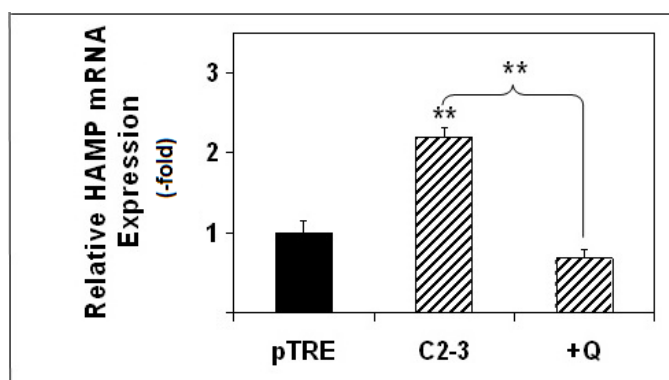


Σχήμα 4.26: Ανάλυση κατά Western a: στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, στο πυρηνικό κλάσμα και σε συνολικό εκχύλισμα κυττάρων παρουσία αναστολέα quinalizarin (Q) με anti-SMAD4 αντίσωμα, b: σε εκχύλισμα κυττάρων παρουσία αναστολέα quinalizarin (Q) με anti-total (t) και anti-phospho (p) STAT3 αντίσωμα.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών κατά Western έδειξε ότι ο αναστολέας της CK2 παρεμπόδισε την μεταφορά της SMAD4 στον πυρήνα και την αύξηση της

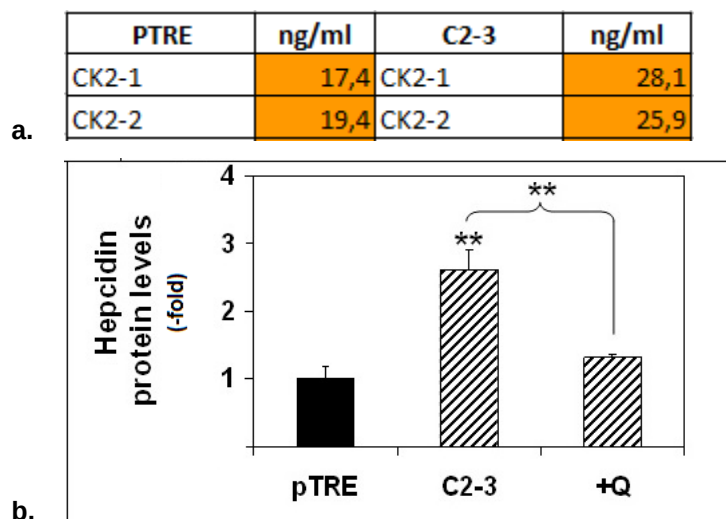
έκφρασής της από την καψιδιακή πρωτεΐνη (σχήμα 4.26.a.). Επιπλέον ανέστειλε την φωσφορυλίωση των δύο καταλοίπων Tyr και Ser της STAT3 και κατέστειλε σε κάποιο βαθμό την έκφραση της STAT3 συνολικά (σχήμα 4.26.b.).

Για τον έλεγχο της έκφρασης της HAMP παρουσία του αναστολέα quinalizarin (Q) έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) με χρήση εκκινητών ειδικών για το γονίδιο *hamp*. Καλλιεργήθηκαν συγχρονισμένα κύτταρα pTRE και C2-3 πυκνότητας 40×10^4 κύτταρα/mL σε δύο πλάκες 12 βοθρίων. Μετά την επαγωγή τους για την έκφραση της πρωτεΐνης καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες στους 37°C με 5% CO_2 , απουσία ή παρουσία του αναστολέα quinalizarin (Q) σε συγκέντρωση $1\mu\text{M}$. Στη συνέχεια έγινε συλλογή των κυττάρων, και κυτταρική λύση με την χρήση $300\mu\text{L}$ ανά βοθρίο RNazol B (υλικά και μέθοδοι 3.2.12). και απομόνωση του mRNA και δημιουργία cDNA με την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (υλικά και μέθοδοι 3.2.14). Για την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) χρησιμοποιήθηκαν $3\mu\text{L}$ cDNA για κάθε αντίδραση (υλικά και μέθοδοι 3.2.15) (σχήμα 4.27).



Σχήμα 4.27: Μέτρηση της έκφρασης του γονιδίου *hamp* παρουσία του αναστολέα της CK2 quinalizarin (Q) με qPCR.

Η χρήση του αναστολέα της CK2 quinalizarin παρεμπόδισε πλήρως την αύξηση των επιπέδων του mRNA της HAMP από την καψιδιακή πρωτεΐνη και τα επανέφερε στα αρχικά επίπεδα. Ανάλυση με ανταγωνιστική ELISA έγινε στα υπερκείμενα των καλλιεργειών για την μέτρηση της εκκρινόμενης ηπατιδίνης (σχήμα 4.28).



Σχήμα 4.28: Μέτρηση συγκέντρωσης της εκκρινόμενης ηπατιδίνης με ανταγωνιστική ELISA παρουσία του αναστολέα quinalizarin (Q).

a: Τιμές συγκέντρωσης ηπατιδίνης. b: Σύγκριση στην αύξηση των επιπέδων ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV παρουσία του αναστολέα quinalizarin (Q).

Ο αναστολέας της CK2 παρεμπόδισε την επαγωγή της έκφρασης της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Το συμπέρασμα που προκύπτει από τον συνδυασμό των παραπάνω πειραμάτων είναι πως η καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας C επάγει την έκφραση του γονιδίου *hamp* της ηπατιδίνης μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού BMP/SMAD και την φωσφορυλίωση της STAT3, στα οποία συνεισφέρει και η ενεργοποίηση της CK2. Αναστολή ενός εκ των παραπάνω παραγόντων αναστέλλει και την επαγωγή της ηπατιδίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πεπτιδική ορμόνη ηπατιδίνη είναι ένα μικρό πεπτίδιο 25 αμινοξέων, πλούσιο σε κυστεΐνες, που εκκρίνεται από ηπατοκύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό.² Συγκεκριμένα, ρυθμίζει την εξαγωγή του σιδήρου από ηπατοκύτταρα και μακροφάγα, καθώς και την απορρόφησή του από το έντερο.¹²⁶ Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η αυξομείωση των συγκεντρώσεων της ηπατιδίνης στον ορό περιλαμβάνει την πρόσδεσή της στη μεμβρανική πρωτεΐνη φερροπορτίνη, της οποίας επάγει την ενδοκυττάρωση και την αποικοδόμηση στα λυσοσώματα.²⁷

Η ηπατιδίνη συμμετέχει σημαντικά και στην παθογένεση των διαταραχών του σιδήρου στον άνθρωπο. Ανεπάρκεια ηπατιδίνης μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές μορφές νεανικής αιμοχρωμάτωσης.¹²⁷ Σε καταστάσεις χρόνιας φλεγμονής, υπερέκφραση της ηπατιδίνης συμβάλει στην αναιμία της χρόνιας νόσου.^{28,38,128} Λόγω της συμμετοχής της ηπατιδίνης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, η ορμόνη έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης, σε βιοχημικό και διαγνωστικό επίπεδο. Οι μελέτες αυτές περιορίζονται από την περιορισμένη διαθεσιμότητα ενός λειτουργικού πεπτιδίου. Χημικά συντιθέμενη ηπατιδίνη είναι εμπορικά διαθέσιμη, ωστόσο το προϊόν αυτό είναι στις περισσότερες περιπτώσεις ανενεργό σε βιολογικές δοκιμασίες, πολύ πιθανόν λόγω λανθασμένου σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών.¹²⁹ Επιπλέον, η απομόνωση του φυσικού μορίου από τα ούρα, ενώ είναι εφικτή, έχει πολύ χαμηλή απόδοση. Η ανάπτυξη ενός ετερόλογου συστήματος έκφρασης της ηπατιδίνης θα ήταν σημαντική διότι θα επέτρεπε τη συλλογή ικανοποιητικών ποσοτήτων ανασυνδυασμένης ηπατιδίνης. Προηγούμενη ερευνητική προσπάθεια του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Ανοσοβιοτεχνολογίας του ελληνικού ινστιτούτου παστέρ (EMBA) οδήγησε στην παραγωγή και καθαρισμό ανασυνδυασμένης, λειτουργικής ηπατιδίνης (Her25-His), στην αμινοξική αλληλουχία της οποίας είχαν προστεθεί 6 συνεχόμενα αμινοξέα ιστιδίνης, ικανής να ρυθμίζει το μεταβολισμό του

σιδήρου.¹²⁹ Για την έκφραση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *Pichia pastoris*, το οποίο συνδυάζει τη δυνατότητα να παράγει εξωκυτταρικά διαλυτές πρωτεΐνες σε υψηλή απόδοση μαζί με ευκολία στο χειρισμό του. Το ανασυνδυασμένο πεπτίδιο Her25-His διατηρεί τις ευκαρυωτικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (όπως είναι ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών) και παρουσιάζει ομοιότητα ως προς τη βιολογική δράση της φυσικής ανθρώπινης ηπατιδίνης. Επιδεικνύει βακτηριοκτόνο δράση και επιπλέον επιδρά ισχυρά στον κυτταρικό μεταβολισμό του σιδήρου μέσω πρόσδεσης με τη FPN1, προκαλώντας την ενδοκυττάρωσή της και μεταβάλλοντας με αυτό τον τρόπο την ενδοκυττάρια κατάσταση του σιδήρου.¹²⁹ Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε μία μέθοδος ποσοτικοποίησης της ηπατιδίνης στον ανθρώπινου ορού του αίματος με την μέθοδο της ανταγωνιστικής ELISA με τη χρήση της Her25-His και πολυκλωνικού ορού έναντι αυτού.¹³⁰

Στην παρούσα διατριβή, στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, απομονώθηκε το ανασυνδυασμένο μόριο ηπατιδίνης Her25-His, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της ηπατιδίνης σε ηπατικά κύτταρα κατά το δεύτερο μέρος της εργασίας. Κατά την παραγωγή του ανασυνδυασμένου μορίου Her25-His δημιουργούνται μεγάλα συσσωματώματα, τα οποία μειώνουν την απόδοση σε μονομερές μόριο. Είναι γνωστό ότι το μόριο των 25 αμινοξέων εμπεριέχει οχτώ κυστεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους τέσσερεις δισουλφιδικούς δεσμούς.^{14,15} Σε μόρια με πολλαπλούς δισουλφιδικούς δεσμούς η τριτοταγής δομή μπορεί αρκετές φορές να μην εμφανίζεται σταθερή. Μελέτες περιέγραψαν λεπτομερώς και επιβεβαίωσαν μερικά από τα προβλήματα που παρουσιάζονται σε σχέση με τη σταθερότητα του μορίου της ηπατιδίνης. Πιο συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας (5-37°C) και οι διαφορετικές τιμές pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται η ηπατιδίνη μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στο μόριο, καθώς μπορεί να αλλοιωθεί η αντιγονική του δομή, να σχηματιστούν διάφορα συσσωματώματα (πιθανόν και από τη δημιουργία δια-αλυσιδικών δισουλφιδικών δεσμών), ενώ συχνά το μόριο εμφανίζει την τάση να προσκολλάται σε πλαστικές επιφάνειες.¹⁶ Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε αν η

λυοφιλοποίηση, λόγω των χαμηλών θερμοκρασιών, ενέχεται στον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Σύγκριση ανάμεσα σε λυοφιλοποιημένα και μη κλάσματα του πεπτιδίου δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφορά. Πιθανώς η μεγάλη συγκέντρωση του πεπτιδίου κατά την υπερέκφραση του πεπτιδίου να ευνοεί τον σχηματισμό τους. Παλαιότερες μελέτες είχαν προτείνει ότι η ηπατιδίνη θα μπορούσε να προσδένει μέταλλα, όπως ο Cu^{2+} και το Ni^{2+} , λόγω της παρουσίας του μοτίβου ATCUN στο αμινοτελικό της άκρο¹⁷ και ότι η πρόσδεση του μετάλλου μπορεί να σταθεροποιήσει την δομή του μορίου αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Μελέτη με φασματοσκοπία μάζας ICP έδειξε, χρησιμοποιώντας φυσική ανθρώπινη ηπατιδίνη εκχυλισμένη από δείγματα ούρων, συναπομόνωση της ηπατιδίνης με ένα τουλάχιστον μόριο σιδήρου.¹⁸ Ο λόγος για τον οποίο η ηπατιδίνη μπορεί να προσδένει σίδηρο δεν είναι γνωστός, εικάζεται, όμως, ότι μπορεί είτε να παίζει κάποιο λειτουργικό ρόλο στην ωρίμανση της, είτε να αποτελεί τον συνδετικό κρίκο κατά την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα της.¹⁹

Με την χρήση του μορίου Her25-His έχουν παραχθεί στο εργαστήριο μέσω της διαδικασίας παραγωγής υβιδωμάτων σε ποντίκια, μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στην παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια καθαρισμού του ανασυνδιασμένου μορίου της ηπατιδίνης, απαλλαγμένου από τα έξι κατάλοιπα ιστιδινών (Her25), με χρωματογραφία ανοσοσυγγένειας, η οποία περιείχε μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της Her25-His (mAb10G7, mAb6A5 και mAb7G3). Και σε αυτήν την περίπτωση υπήρχε σχηματισμός συσσωματωμάτων και για την απομόνωση της μονομερούς μορφής έγινε χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Κατά τον ποιοτικό έλεγχο του μονομερούς πεπτιδίου μέσω ηλεκτροφόρησης δεν βρέθηκε ζώνη στο μοριακό βάρος της Her25, πιθανώς λόγω χαμηλής συγκέντρωσης του μορίου. Παρατηρήθηκε επίσης ότι από την στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης δεν είχε διαχωριστεί η μονομερής μορφή από τη γλυκίνη και το Tris. Η ύπαρξη Her25 επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις ELISA, καθώς από προηγούμενες μελέτες ήταν γνωστό ότι το mAb10G7 αναγνωρίζει την μονομερή Her25. Το mAb5H10 δεν την αναγνωρίζει, ενώ αναγνωρίζει τα συσσωματώματα της Her25.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η διαχωριστική ικανότητα της στήλης με διαθέσιμες πρωτεΐνες γνωστών μοριακών βαρών ως προτύπων. Ο όγκος έκλουσης της απροτινίνης από την στήλη ήταν 12 mL, όπως αναμενόταν. Για την ινσουλίνη όμως παρατηρείται ότι αν και μικρότερη από την απροτινίνη εκλούστηκε πριν από αυτή σχηματίζοντας περισσότερες από μία κορυφές. Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο πεπτίδια, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο διαφορετικός όγκος έκλουσης μπορεί να οφείλεται στην δημιουργία διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε μόρια ινσουλίνης και στον σχηματισμό πολυμερών διαφόρων μοριακών βαρών, επειδή το σκεύασμα ήταν παλιό. Θεωρήθηκε αρχικά ότι η διαχωριστική της στήλης ήταν επαρκής. Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τρόποι για να βελτιωθεί η διαχωριστική ικανότητα της στήλης και να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες απομόνωσης. Δοκιμάστηκε η αλλαγή κινητής φάσης στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, χωρίς όμως να επιτευχθεί διαχωρισμός των ενώσεων, γεγονός που διατηρεί υπό διερεύνηση την ποιότητα της στήλης.

Το δεύτερο μέρος της διατριβής περιλαμβάνει τη μελέτη της ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας. Ο ιός της ηπατίτιδας C επηρεάζει την ομοιόσταση του σιδήρου στον οργανισμό του ξενιστή ρυθμίζοντας την μεταγραφή του γονιδίου της ηπατιδίνης. Ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C έχουν σχετικά χαμηλή συγκέντρωση ηπατιδίνης ορού,^{113,114,131} ενώ δεν έχουν διασαφηνιστεί τα επίπεδα έκφρασής της κατά την οξεία φάση της μόλυνση. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, τα οποία εκφράζουν την πολυπρωτεΐνη του HCV είχαν μειωμένη έκφραση ηπατιδίνης.¹¹⁰ Επίσης καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων Huh7.5 μετασχηματισμένων με φορέα κλωνοποίησης αδενοϊού, ο οποίος μπορούσε να εκφράσει την καψιδιακή πρωτεΐνη, είχαν χαμηλότερα επίπεδα εκκρινόμενης ηπατιδίνης από τα κύτταρα ελέγχου.¹¹¹ Αντίθετα, σε άλλες μελέτες με διαγονιδιακά ποντίκια¹³² και μετασχηματισμένα κύτταρα Huh7 που υπερεκφράζουν την καψιδιακή πρωτεΐνη¹³³ δείχθηκαν αυξημένα επίπεδα mRNA. Τα παραπάνω αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά κυτταρικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν ή άλλους κυτταρικούς και ιικούς παράγοντες που πιθανά διέπουν την ρύθμιση της ηπατιδίνης κατά την ιική μόλυνση.

Στα πειράματα της παρούσας εργασίας, αρχικά εξετάστηκε η πιθανή επίδραση της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV στη ρύθμιση της ηπατιδίνης σε μεταγραφικό και σε μεταφραστικό επίπεδο. Στα ηπατικά κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη, παρατηρήθηκε αύξηση τόσο του mRNA της HAMP, όσο και της εκκρινόμενης ηπατιδίνης. Παράλληλα, εξετάστηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης σημαντικών πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στην ομοιόσταση του σιδήρου. Έτσι η έκφραση της φερροπορτίνης, του υποδοχέα της τρανσφερρίνης τύπου 1 και της ματριπτάσης μειώθηκαν, ενώ της φερριτίνης αυξήθηκαν, όπως αναμενόταν με την αύξηση της ηπατιδίνης. Η αναμενόμενη συσσώρευση του σιδήρου εντός του κυττάρου, η οποία προκαλείται από την αύξηση της ηπατιδίνης, ενεργοποιεί το ρυθμιστικό σύστημα IRP/IRE και επακόλουθες μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των γονιδίων τους, ώστε να προσαρμοστεί ο οργανισμός στις αλλαγές των επιπέδων του σιδήρου.¹³⁴⁻¹³⁷

Ακολούθως, διερευνήθηκε ο κυτταρικός σηματοδοτικός μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη. Επιλέξαμε να εξετάσουμε πιθανά μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην ρύθμιση της ηπατιδίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες, όπως π.χ. το BMP/SMAD.^{41,138-141} Έτσι, έγινε υποκυτταρική κλασμάτωση και εξετάστηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης και ο κυτταρικός εντοπισμός της SMAD4. Σε κύτταρα C2-3 που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη, βρέθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της SMAD4, ενώ είχε μετατοπιστεί το μεγαλύτερο μέρος της στον πυρήνα, επιβεβαιώνοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η επαγωγή της έκφρασης της HAMP μέσω της SMAD4 επιβεβαιώθηκε με την προσθήκη του αναστολέα του SMAD4, dorsomorphin, στα κύτταρα C2-3, παρουσία του οποίου το mRNA της HAMP και η εκκρινόμενη ηπατιδίνη μειώθηκε στα επίπεδα των κυττάρων ελέγχου (pTRE). Και άλλες μελέτες έχουν αναφέρει την σπουδαιότητα της SMAD4 στην ρύθμιση έκφρασης της HAMP. Σε ηπατοκύτταρα με έλλειψη της SMAD4 δεν είναι δυνατή η επαγωγή της έκφρασης της HAMP από εξωκυτταρικά σήματα, όπως την IL-6 και BMP αλλά και ο σίδηρος.⁴¹ Παράλληλα, και ο ιός HCV αλληλεπιδρά με το μονοπάτι

BMP/SMAD δεδομένου ότι η ιική αντιγραφή παρεμποδίζεται από τον TGF- β και το BMP7 με εξαρτώμενο από τις SMAD τρόπο.^{142,143}

Στη συνέχεια εξετάσαμε αν η STAT3 εμπλέκεται στον μηχανισμό ρύθμισης της ηπατιδίνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV. Γενικά, είναι γνωστό πως η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης της STAT3.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Επίσης, η κυτταροκίνη IL-6 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *hamp* σε περιπτώσεις φλεγμονής μέσω φωσφορυλίωσης της STAT3 σε κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Έτσι, η πρωτεϊνική έκφραση της φωσφορυλιωμένης και ολικής STAT3 βρέθηκε αυξημένη στα κύτταρα C2-3 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Με προσθήκη του αναστολέα του STAT3, STAT inhibitor VII στα κύτταρα C2-3, το mRNA της HAMP και η εκκρινόμενη ηπατιδίνη μειώθηκαν στα επίπεδα των pTRE, καταδεικνύοντας την συμμετοχή της STAT3 στην εξαρτώμενη από την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού ρύθμιση της ηπατιδίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι το πρόδρομο μόριο της ηπατιδίνης, η προ-ηπατιδίνη είναι υπεύθυνη για την αυτορύθμιση της ηπατιδίνης μέσω της μεταφοράς της στον πυρήνα και τη δέσμευσή της στον υποκινητή του γονιδίου *hamp*, στην περιοχή δέσμευσης της STAT3.¹⁵¹ Τέλος, σε κατάσταση υποξίας η STAT3 και ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP α εκτοπίζονται από τον υποκινητή του *hamp*, μειώνοντας την έκφρασή του,^{38,152} ενώ αντίθετα η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε εμμένουσα φλεγμονή αυξάνει την ηπατιδίνη μέσω της STAT3.¹⁵³ Φαίνεται λοιπόν, ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας C επάγει την έκφραση της ηπατιδίνης σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης μέσω της ενεργοποίησης και της SMAD4 και της STAT3 ταυτόχρονα. Παρεμπόδιση της ενεργοποίησης ενός εκ των δύο μορίων, καταστρέφει τελείως την επαγωγή αυτή, γεγονός που υποδηλώνει πως υπάρχουν κοινά στοιχεία για την ενεργοποίηση των δύο μορίων κατά τη μεταγωγή του σήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι αναστολή της SMAD4 και του μονοπατιού BMP/SMAD παρεμποδίζει την ρύθμιση της ηπατιδίνης από την IL-6,^{66,154-156} πιθανώς γιατί η SMAD4 συμμετέχει σε μηχανισμούς χαλάρωσης πυκνών δομών χρωματίνης για να μπορέσει η STAT3 να έχει πρόσβαση στον υποκινητή του *hamp*.⁴¹

Τέλος εξετάσαμε τον πιθανό ρόλο της πρωτεϊνικής κινάσης CK2 στον μηχανισμό ρύθμισης της HAMP από την καψιδιακή πρωτεΐνη, ως

«σηματοδοτικό σύνδεσμο» ανάμεσα στα μονοπάτια BMP/SMAD και STAT3. Η CK2 είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ανθρώπου. Έχει δομή τετραμερούς, με δύο καταλυτικές υπομονάδες (CK2α και CK2α') και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες (CK2β). Έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφρασή της σε πολλά είδη καρκίνων, μεταξύ των οποίων και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα HCC,¹⁵⁷ ενώ συνδέεται και με πολλές ιικές πρωτεΐνες, όπως οι μη δομικές πρωτεΐνες NS2 και NS5A του HCV, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από την CK2 ώστε να διεξάγουν αποδοτικά την αντιγραφή και άλλες λειτουργίες του ιού.^{158,159} Συνήθως, η CK2 προάγει την ενεργοποίηση της STAT3 μέσω της φωσφορυλίωσης του JAK2,¹⁶⁰ ενώ η χρήση αναστολέων της CK2 οδηγεί σε παρεμπόδιση της ενεργοποίησης της STAT3.^{161,162} Ομοίως, οι αναστολείς της CK2 παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση των SMAD, πιθανώς εμπλέκοντάς την στην ρύθμιση του μονοπατιού BMP/SMAD.¹⁶³ Με βάση τα παραπάνω, υποθέσαμε ότι η CK2 είναι πιθανώς ο συνδετικός κρίκος μεταξύ των μονοπατιών STAT3 και BMP/SMAD που χρησιμοποιεί η πρωτεΐνη του ιού για να ρυθμίσει την έκφραση της HAMP. Πράγματι, η παρουσία του αναστολέα της CK2 στα κύτταρα που την υπερεκφράζουν παρεμπόδισε την ενεργοποίηση και την έκφραση και της STAT3 και της SMAD4 και παράλληλα ανέστειλε τη θετική ρύθμιση της HAMP σε επίπεδο mRNA, αλλά και πρωτεΐνης από την καψιδιακή πρωτεΐνη.

Συμπερασματικά, από αυτήν την εργασία προκύπτει ότι ο κύριος ρυθμιστής της ομοιόστασης του σιδήρου, η ηπατιδίνη, υπόκειται σε θετική ρύθμιση από την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού HCV μέσω ενός πολύπλοκου δικτύου μεταγωγής σήματος, το οποίο χρησιμοποιεί την αύξηση της έκφρασης και την ενεργοποίηση των STAT3, SMAD4 και CK2. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και της CK2 πιθανώς περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια ρύθμισης των υπομονάδων της CK2 και πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, ειδικά όταν η εμπλοκή της στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα την καθιστά ως ένα ενδιαφέροντα θεραπευτικό στόχο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide (Ηπατιδίνη Αντιμικροβιακό Πεπτίδιο)
HCV	Hepatitis C Virus (Ιός της Ηπατίτιδας C)
SMAD	Sma Mothers Against Decapentaplegic
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription (Μεταγωγείς Σήματος και Ενεργοποιητές της Μεταγραφής)
BMP	Bone Morphogenetics Proteins (Μορφογενετικές Πρωτεΐνες των Οστών)
TGF-β	Transforming Growth Factor beta (Αυξητικός Παράγοντας Μετασχηματισμού βήτα)
CK2	Casein Kinase 2 (Κινάση Καζεΐνης 2)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Δοκιμασία Ένζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης)
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου)
IRP/IRE	Iron-Regulatory Proteins/Iron-Responsive Elements (Σιδηρο-ρυθμιστικές Πρωτεΐνες/Στοιχεία απόκρισης στον Σίδηρο)
Tyr	Tyrosine (Τυροσίνη)
Ser	Serine (Σερίνη)
Phospho-	Phosphorylated (Φωσφορυλιωμένο)
IL-6	Interleukine 6 (Ιντερλευκίνη 6)
TfR1	Transferin Receptor 1 (Υποδοχέας Τρανσφερρίνης Τύπου 1)
TMPRSS6	Transmembrane Protease Serine 6 (Διαμεμβρική Πρωτεάση Σερίνης 6)
PARP1/2	Poly ADP-ribose Polymerase 1 and 2 (Πολυ- ADP-ριβόζη Πολυμεράση 1 και 2)
C/EBPα	CCAAT-Enhancer Binding Proteins alpha (CCAAT-Ενισχυτής Πρωτεϊνών Δέσμευσης Άλφα)

HRP	Horseradish Peroxidase (Υπεροξειδάση Χρένου)
His	Histidine (Ιστιδίνη)
RNA	Ribonucleic Acid (Ριβονουκλεϊκό Οξύ)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Δεόξυ-ριβονουκλεϊκό Οξύ)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Τροποποιημένο Μέσο Αετού του Dulbecco)
TET ON	Tetracycline (control transcriptional activation) (Έλεγχος Ενεργοποίησης Μεταγραφής με Τετρακυκλίνη)
FCS	Fetal Calf Serum (Ορός εμβρύου Μόσχου)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Δωδέκυλο-Θειϊκό Νάτριο)
PAGE	Polyacrylamide Gel (Πηκτή Πολυακρυλαμιδίου)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Ταχεία Υγρή Χρωματογραφία Πρωτεΐνης)
IgG	Immunoglobulin G (Ανοσοσφαιρίνη G)
DTT	Dithiothreitol (Διθειοθρεϊτόλη)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Διάλυμα Φωσφορικού Άλατος)
SEC	Size Exclusive Chromatography (Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού)
LEAP-1	Liver-Expressed Antimicrobial Peptide (Ήπατο-εκφραζόμενο Αντιμικροβιακό Πεπτίδιο)
dNTP	Deoxyribose Nucleoside Triphosphate (Τριφωσφορικό-δεόξυ-ριβόζη Νουκλεοτίδιο)
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus (Ιός της Λευχαιμίας Ποντικού του Moloney)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide (Διμέθυλο-Σουλφοξειδίο)
NaPB	Sodium Phosphate Buffer (Διάλυμα Φωσφορικού Νατρίου)
JAK	Janus Kinase (Κινάση Ιανός)
mAb	Monoclonal Antibody (Μονοκλωνικό Αντίσωμα)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Krause A., Neitz S., Mägert H.J., et al., LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett*, 2000. 480(2-3): p. 147-50.
2. Park C.H., Valore E.V., Waring A.J. and Ganz T., Hecpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 7806-10.
3. Ganz T., Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab*, 2008. 7(4): p. 288-90.
4. Sow F.B., Florence W.C., Satoskar A.R., et al., Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol*, 2007. 82(4): p. 934-45.
5. Liu X.B., Nguyen N.B., Marquess K.D., et al., Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol Dis*, 2005. 35(1): p. 47-56.
6. Kulaksiz H., Fein E., Redecker P., et al., Pancreatic beta-cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. *J Endocrinol*, 2008. 197(2): p. 241-9.
7. Merle U., Fein E., Gehrke S.G., et al., The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology*, 2007. 148(6): p. 2663-8.
8. Kulaksiz H., Theilig F., Bachmann S., et al., The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol*, 2005. 184(2): p. 361-70.
9. Hadziahmetovic M., Song Y., Ponnuru P., et al., Age-dependent retinal iron accumulation and degeneration in hepcidin knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. 52(1): p. 109-18.
10. Kemna E.H., Tjalsma H., Podust V.N. and Swinkels D.W., Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem*, 2007. 53(4): p. 620-8.

11. Valore E.V. and Ganz T., Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. 40(1): p. 132-8.
12. Shi J. and Camus A.C., Hepcidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *Dev Comp Immunol*, 2006. 30(9): p. 746-55.
13. Fehlbauer P., Bulet P., Michaut L., et al., Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem*, 1994. 269(52): p. 33159-63.
14. Hunter H.N., Fulton D.B., Ganz T. and Vogel H.J., The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem*, 2002. 277(40): p. 37597-603.
15. Jordan J.B., Poppe L., Haniu M., et al., Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem*, 2009. 284(36): p. 24155-67.
16. Scarano S., Vestri A., Ermini M.L. and Minunni M., SPR detection of human hepcidin-25: a critical approach by immuno- and biomimetic-based biosensing. *Biosens Bioelectron*, 2013. 40(1): p. 135-40.
17. Melino S., Garlando L., Patamia M., et al., A metal-binding site is present in the amino terminal region of the bioactive iron regulator hepcidin-25. *J Pept Res*, 2005. 66 Suppl 1: p. 65-71.
18. Farnaud S., Patel A. and Evans R.W., Modelling of a metal-containing hepcidin. *Biomaterials*, 2006. 19(5): p. 527-33.
19. Farnaud S., Rapisarda C., Bui T., et al., Identification of an iron-hepcidin complex. *Biochem J*, 2008. 413(3): p. 553-7.
20. Gangaidzo I.T., Moyo V.M., Mvundura E., et al., Association of pulmonary tuberculosis with increased dietary iron. *J Infect Dis*, 2001. 184(7): p. 936-9.
21. Braun V. and Killmann H., Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci*, 1999. 24(3): p. 104-9.
22. Jurado R.L., Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis*, 1997. 25(4): p. 888-95.

23. Collins H.L., The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunol Lett*, 2003. 85(2): p. 193-5.
24. Ganz T., Heparidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 2003. 102(3): p. 783-8.
25. Dey R. and Datta S.C., Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase. *Biochem J*, 1994. 301 (Pt 2): p. 317-9.
26. Zhang Y., Lathigra R., Garbe T., et al., Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol*, 1991. 5(2): p. 381-91.
27. Nemeth E. and Ganz T., Regulation of iron metabolism by heparidin. *Annu Rev Nutr*, 2006. 26: p. 323-42.
28. Nemeth E., Valore E.V., Territo M., et al., Heparidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, 2003. 101(7): p. 2461-3.
29. Fleming M.D. and Andrews N.C., Mammalian iron transport: an unexpected link between metal homeostasis and host defense. *J Lab Clin Med*, 1998. 132(6): p. 464-8.
30. Fleming, M.D., Trenor C.C. 3rd, Su M.A., et al., Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 1997. 16(4): p. 383-6.
31. Andrews N.C., Metal transporters and disease. *Curr Opin Chem Biol*, 2002. 6(2): p. 181-6.
32. Andrews N.C., Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*, 1999. 341(26): p. 1986-95.
33. Ganz T., Heparidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006: p. 29-35, 507.
34. Nicolas G., Bennoun M., Porteu A., et al., Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver heparidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(7): p. 4596-601.
35. Fleming, R.E. and Sly W.S., Heparidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(15): p. 8160-2.

36. Singh P.K., Parsek M.R., Greenberg E.P. and Welsh M.J., A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 2002. 417(6888): p. 552-5.
37. Finch C., Regulators of iron balance in humans. *Blood*, 1994. 84(6): p. 1697-702.
38. Nicolas G., Chauvet C., Viatte L., et al., The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*, 2002. 110(7): p. 1037-44.
39. Parrow N.L. and Fleming R.E., Bone morphogenetic proteins as regulators of iron metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2014. 34: p. 77–94
40. Kemna E.H., Tjalsma H., Willems H.L. and Swinkels D.W., Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *haematologica*, 2008. 93(1): p. 90-7
41. Wang R.H., Li C., Xu X., et al., A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*, 2005. 2(6): p. 399-409.
42. Babitt J.L., Huang F.W., Xia Y., et al., Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J Clin Invest*, 2007. 117(7): p. 1933-9
43. Meynard D., Kautz L., Darnaud V., et al., Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet*, 2009. 41(4): p. 478-81.
44. Papanikolaou G., Samuels M.E., Ludwig E.H., et al., Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004. 36(1): p. 77-82.
45. Lin L., Goldberg Y.P. and Ganz T., Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2884-9.
46. Kuninger D., Kuns-Hashimoto R., Kuzmickas R., et al., Complex biosynthesis of the muscle-enriched iron regulator RGMc. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 16): p. 3273-83.
47. Zhang A. S., West A.P. Jr., Wyman A.E., et al., Interaction of hemojuvelin with neogenin results in iron accumulation in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem*, 2005. 280(40): p. 33885-94.

48. Rodriguez A., Pan P., and Parkkila S., Expression studies of neogenin and its ligand hemojuvelin in mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, 2007. 55: p. 85-96.
49. Zhang A.S., Anderson S.A., Meyers K.R., et al., Evidence that inhibition of hemojuvelin shedding in response to iron is mediated through neogenin. *J Biol Chem*, 2007. 282: p. 12547-56.
50. Silvestri L., Pagani A., Nai A., et al., The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab*, 2008. 8: p. 502-11.
51. Melis M.A., Cau M., Congiu R., et al., A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*, 2008. 93(10): p. 1473-9.
52. Finberg K.E., Heeney M.M., Campagna D.R., et al., Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet*, 2008. 40(5): p. 569-71.
53. Goswami T. and Andrews N.C., Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem*, 2006. 281: p. 28494-8.
54. Robb A., and Wessling-Resnick M., Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood*, 2004. 104: 4294-9.
55. Johnson M.B., Chen J., Murchison N., et al., Transferrin receptor 2: evidence for ligand-induced stabilization and redirection to a recycling pathway. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(3): p. 743-54.
56. Nemeth E., Roetto A., Garozzo G., et al., Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*, 2005. 105(4): p. 1803-6.
57. Piperno A., Girelli D., Nemeth E., et al., Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood*, 2007. 110(12): p. 4096-100.
58. Giannetti A.M., and Bjorkman P.J., HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface. *J Biol Chem*, 2004. 279: p. 25866-75.

59. Schmidt P.J., Toran P.T., Giannetti A.M., et al., The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*, 2008. 7(3): p. 205-14.
60. Johnson M.B. and Enns C.A., Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood*, 2004. 104: p. 4287-93.
61. Nemeth E., Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 2008. 15: p. 169-75.
62. Peyssonnaud C., Zinkernagel A.S., Datta V., et al., TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3727-32.
63. Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., et al., Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, 1999. 162(7): p. 3749-52.
64. Constante M., Jiang W., Wang D., et al., Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 291(2): p. G229-37.
65. Yu H., Lee H., Herrmann A., et al., Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(11): p. 736–746
66. Yu P.B., Hong C.C., Sachidanandan C., et al., Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*, 2008. 4: p. 33-41.
67. Mayeur C., Lohmeyer L.K., Leyton P., et al., The type I BMP receptor, Alk3, is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood*, 2014. 123(14): p. 2261–2268.
68. Frazer D.M., Inglis H.R., Wilkins S.J., et al., Delayed hepcidin response explains the lag period in iron absorption following a stimulus to increase erythropoiesis. *Gut*, 2004. 53(10): p. 1509-15.
69. Vokurka M., Krijt J., Sulc K. and Necas E., Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*, 2006. 55(6): p. 667-74.
70. Pak M., Lopez M.A., Gabayan V., et al., Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*, 2006. 108(12): p. 3730-5.

71. Origa R., Galanello R., Ganz T., et al., Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica*, 2007. 92(5): p. 583-8.
72. Kearney S.L., Nemeth E., Neufeld E.J., et al., Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer*, 2007. 48(1): p. 57-63.
73. Bondi A., Valentino P., Daraio F., et al., Hepatic expression of hemochromatosis genes in two mouse strains after phlebotomy and iron overload. *Haematologica*, 2005. 90(9): p. 1161-7.
74. Ashby D.R., Gale D.P., Busbridge M., et al., Erythropoietin administration in humans causes a marked and prolonged reduction in circulating hepcidin. *Haematologica*, 2010. 95(3): p. 505–508
75. Sasaki Y., Noguchi-Sasaki M., Yasuno H., et al., Erythropoietin stimulation decreases hepcidin expression through hematopoietic activity on bone marrow cells in mice. *Int J Hematol*, 2012. 96(6): p. 692–700
76. Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A., et al., High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*, 2007. 13(9): p. 1096-101.
77. Kautz L., Jung G., Valore E.V., et al., Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet*, 2014. 46(7): p. 678-684
78. Tanno T., Porayette P., Sripichai O., et al., Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*, 2009. 114(1): p. 181-186.
79. Greer S.N., Metcalf J.L., Wang Y., et al., The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*, 2012. 31(11): p. 2448–2460.
80. Peyssonnaud C., Zinkernagel A.S., Schuepbach R.A., et al., Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin Invest*, 2007. 117(7): p. 1926–1932.
81. Volke M., Gale D.P., Maegdefrau U., et al., Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS One*, 2009. 4(11): e7875.
82. Lakhal S., Schödel J., Townsend A.R., et al., Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible

- factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis. *J. Biol. Chem*, 2011. 286(6): p . 4090–4097
83. McMahon S., Grondin F., McDonald P.P., et al., Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem*, 2005. 280(8): p. 6561–6569
 84. Wrighting D.M. and Andrews N.C., Iron homeostasis and erythropoiesis. *Curr Top Dev Biol*, 2008. 82: p. 141-67.
 85. Ganz T. and Nemeth E., Heparidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1823(9): p. 1434-43.
 86. Fernandes A., Preza G.C., Phung Y., et al., The molecular basis of heparidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood*, 2009. 114(2): p. 437-43.
 87. Shamsian B.S., Rezaei N., Arzanian M.T., et al., Severe hypochromic microcytic anemia in a patient with congenital atransferrinemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 2009. 26(5): p. 356-62.
 88. Du X., She E., Gelbart T., et al., The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*, 2008. 320(5879): p. 1088-92.
 89. Ganz T. and Nemeth E., The heparidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011: p. 538-42.
 90. Zaritsky J., Young B., Wang H.J., et al., Heparidin--a potential novel biomarker for iron status in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. 4(6): p. 1051-6.
 91. Means R.T., Heparidin and cytokines in anaemia. *Hematology*, 2004. 9(5-6): p. 357-62.
 92. Weiss G. and Goodnough L.T., Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*, 2005. 352(10): p. 1011-23.
 93. Singh B., Arora S., Agrawal P. and Gupta S.K., Heparidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism. *Clin Chim Acta.*, 2011. 412(11-12): p. 823-30.
 94. Olynyk J.K. and Bacon B.R., Hepatitis C. Recent advances in understanding and management. *Postgrad Med*, 1995. 98(1): p. 79-81, 86-7, 91-4.

95. Trinder D., Ayonrinde O.T., and Olynyk J.K., HCV, iron, and oxidative stress: the new choreography of hepcidin. *Gastroenterology*, 2008. 134(1): p. 348-51.
96. Reed K.E. and Rice C.M., Overview of hepatitis C genome structure, polyprotein processing and protein properties. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 242: p. 75-84.
97. Lindenbach B.D. and Rice C.M., Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005. 436: p. 933-8.
98. Rice C.M., HCV life cycle and targets for drug development. *Hepatitis Annual Update*, 2003. 123-142.
99. Penin F., Dibuisson J., Rey F.A., et al., Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004. 39: p. 5-19.
100. Varaklioti A., Vassilaki N., Georgopoulou U. and Mavromara P., Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J Biol Chem*, 2002. 277(20): p. 17713-21.
101. Wang C., Sarnow P. and Siddiqui A., Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol*, 1993. 67: p. 3338-44.
102. Beinker N.K., Voigt M.D., Arendse M., et al., Threshold effect of liver iron content on hepatic inflammation and fibrosis in hepatitis B and C. *J Hepatol*, 1996. 25: p. 633–638
103. Chapoutot C., Esslimani M., Joomaye Z., et al., Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on viral C cirrhosis. *Gut*, 2000. 46(5): p. 711–714
104. Angelucci E., Muretto P., Nicolucci A., et al., Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood*, 2002. 100(1): p. 17–21
105. Olynyk J.K., Reddy K.R., Di Bisceglie A.M., et al., Hepatic iron concentration as a predictor of response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 1995. 108(4): p. 1104–1109
106. Fontana R.J., Israel J., LeClair P., et al., Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology*, 2000. 31(3): p. 730–736

107. Piperno A., Iron stores, response to alpha-interferon therapy, and effects of iron depletion in chronic hepatitis C. *Liver*, 1996. 16: p. 248–254
108. Fargion S., Fracanzani A.L., Rossini A., et al., Iron reduction and sustained response to interferon-alpha therapy in patients with chronic hepatitis C: results of an Italian multicenter randomized study. *Am J Gastroenterol*, 2002. 97(5): p. 204–1210
109. Kato J., Kobune M., Nakamura T., et al., Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-20-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res*, 2001. 61(24): p. 8697–8702
110. Nishina S., Hino K., Korenaga M., et al., Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*, 2008. 134(1): p. 226-38.
111. Miura K., Taura K., Kodama Y., et al., Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*, 2008. 48(5): p. 1420-9.
112. Girelli D., Pasino M., Goodnough J.B., et al., Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 2009. 51(5): p. 845–852.
113. Tsochatzis E., Papatheodoridis G.V., Koliarakis V., et al., Serum hepcidin levels are related to the severity of liver histological lesions in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*, 2010. 17(11): p. 800-6.
114. Fujita N., Sugimoto R., Takeo M., et al., Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med*, 2007. 13(1-2): p. 97-104.
115. Verga-Gérard A., Porcherot M., Meyniel-Schicklin L., et al., Hepatitis C virus/human interactome identifies SMURF2 and the viral protease as critical elements for the control of TGF- β signaling. *FASEB J*, 2013. 27(10): p. 4027-40.
116. Feng D.Y., Sun Y., Cheng RX., et al., Effect of hepatitis C virus nonstructural protein NS3 on proliferation and MAPK phosphorylation of normal hepatocyte line. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(14): p. 2157-61.

117. Weizer-Stern O., Adamsky K., Margalit O., et al., Hepcidin, a key regulator of iron metabolism, is transcriptionally activated by p53. *Br J Haematol*, 2007. 138(2): p. 253-62.
118. Sarcar B., Ghosh A.K., Steele R., et al., Hepatitis C virus NS5A mediated STAT3 activation requires co-operation of Jak1 kinase. *Virology*, 2004. 322(1): p. 51-60.
119. Choi S.H. and Hwang S.B., Modulation of the transforming growth factor-beta signal transduction pathway by hepatitis C virus nonstructural 5A protein. *J Biol Chem*, 2006. 281: p. 7468-78.
120. Zhao L.J., Wang L., Ren H., et al., Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res*, 2005. 305(1): p. 23-32.
121. Yoshida T., Hanada T., Tokuhisa T., et al., Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med*, 2002. 196(5): p. 641-53.
122. Lin W., Choe W.H., Hiasa Y., et al., Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology*, 2005. 128(4): p. 1034-41.
123. Taniguchi H., Kato N., Otsuka M., et al., Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factorbeta 1 transcription. *J Med Virol*, 2004. 72(1): p. 52-9
124. Hayashi J., Aoki H., Kajino K., et al., Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology*, 2000. 32(5): p. 958-61.
125. Nakao A., Imamura T., Souchelnyskyi S., et al., TGFbeta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J*, 1997. 16(17): p. 5353-62.
126. Rishi G., Wallace D.F., Subramaniam V.N., Hepcidin: regulation of the master iron regulator. *Biosciences Reports*, 2015. 35(3). ppi: e00192
127. Roetto A., Daraio F., Porporato P., et al, Screening hepcidin for mutations in juvenile hemochromatosis: identification of a new mutation (C70R). *Blood*, 2004. 103: p. 2407-2409

128. Nemeth E., Rivera S., Gabayan V., et al., IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*, 2004. 113(9): p. 1271-6.
129. Koliaraki V., Marinou M., Samiotaki M., et al., Iron regulatory and bactericidal properties of human recombinant hepcidin expressed in *Pichia pastoris*. *Biochimie* 2008. 90(5): p. 726-35.
130. Koliaraki V., Marinou M., Vassilakopoulos T.P., et al., A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One*, 2009. 4(2): e4581.
131. Nagashima M., Kudo M., Chung H., et al., Regulatory failure of serum prohepcidin levels in patients with hepatitis C. *Hepatol Res*, 2006. 36: 288-93.
132. Moriya K., Miyoshi H., Shinzawa S., et al., Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. *J Med Virol*, 2010. 82: p. 776-92.
133. Miyachi H., Kobayashi Y., Relja B., et al., Effect of suppressor of cytokine signaling on hepcidin production in hepatitis C virus replicon cells. *Hepatol Res*, 2011. 41: p. 364-74.
134. Aydemir F., Jenkitkasemwong S., Gulec S. and Knutson M.D. Iron loading increases ferroportin heterogeneous nuclear RNA and mRNA levels in murine J774 macrophages. *J Nutr*, 2009. 139: p. 434-8.
135. Kato J., Kobune M., Ohkubo S., et al., Iron/IRP-1-dependent regulation of mRNA expression for transferrin receptor, DMT1 and ferritin during human erythroid differentiation. *Exp Hematol*, 2007. 35: p. 879-87.
136. Ramsay A.J., Hooper J.D., Folgueras A.R., et al., Matriptase-2 (TMPRSS6): a proteolytic regulator of iron homeostasis. *Haematologica*, 2009. 94: p. 840-9.
137. Zhang A.S., Anderson S.A., Wang J., et al., Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood*, 2011. 117: p. 1687-99.
138. Andriopoulos B., Jr Corradini E., Xia Y., et al., BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet*, 2009. 41: p. 482-7.

139. Corradini E., Meynard D., Wu Q., et al., Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*, 2011. 54: p. 273-84.
140. Truksa J., Peng H., Lee P. and Beutler E., Bone morphogenetic proteins 2, 4, and 9 stimulate murine hepcidin 1 expression independently of Hfe, transferrin receptor 2 (Tfr2), and IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103: p. 10289-93.
141. Babitt J.L., Huang F.W., Wrighting D.M., et al., Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*, 2006. 38: p. 531-9.
142. Murata T., Ohshima T., Yamaji M., et al., Suppression of hepatitis C virus replicon by TGF-beta. *Virology*, 2005. 331: p. 407-17.
143. Sakamoto N., Yoshimura M., Kimura T., et al., Bone morphogenetic protein-7 and interferon-alpha synergistically suppress hepatitis C virus replicon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 357: p. 467-73.
144. Yan X.B., Chen Z. and Brechot C. Associations among Genotype 1b Hepatitis C Virus Core Protein, Protein Kinase R, and Signal Transducer and Activator of Transcription 3. *Hepat*, 2010. 10: p. 275-84.
145. Tacke R.S., Tosello-Tramont A., Nguyen V., et al., Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J Biol Chem*, 2011. 286: p. 10847-55.
146. Yoshida T., Hanada T., Tokuhisa T., et al., Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med*, 2002. 196: p. 641-53.
147. Verga Falzacappa M.V., Vujic Spasic M., Kessler R., et al., STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*, 2007. 109: p. 353-8.
148. Truksa J., Lee P. and Beutler E. The role of STAT, AP-1, E-box and TIEG motifs in the regulation of hepcidin by IL-6 and BMP-9: lessons from human HAMP and murine Hamp1 and Hamp2 gene promoters. *Blood Cells Mol Dis*, 2007. 39: p. 255-62.
149. Wrighting D.M. and Andrews N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, 2006. 108: p. 3204-9.

150. Schuringa J.J., Jonk L.J., Dokter W.H., et al., Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components. *Biochem J*, 2000. 347: p. 89-96.
151. Pandur E., Sipos K., Grama L., et al., Prohepcidin binds to the HAMP promoter and autoregulates its own expression. *Biochem J*, 2013. 451: p. 301-11.
152. Choi S.O., Cho Y.S., Kim H.L. and Park J.W. ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBPalpha and STAT-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 356: p. 312-7.
153. Millonig G., Ganzleben I., Peccerella T., et al., Sustained submicromolar H₂O₂ levels induce hepcidin via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *J Biol Chem*, 2012. 287: p. 37472-82.
154. Huang H., Constante M., Layoun A. and Santos M.M. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*, 2009. 113: p. 3593-9.
155. Sun C.C., Vaja V., Babitt J.L. and Lin H.Y. Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am J Hematol*, 2012. 87: p. 392-400.
156. Fleming R.E., Hepcidin activation during inflammation: make it STAT. *Gastroenterology*, 2007. 132: p. 447-9.
157. Sass G., Klinger N., Sirma H., et al., Inhibition of experimental HCC growth in mice by use of the kinase inhibitor DMAT. *Int J Oncol*, 2011. 39: p. 433-42.
158. Bretana N.A., Lu C.T., Chiang C.Y., et al., Identifying protein phosphorylation sites with kinase substrate specificity on human viruses. *PLoS One*, 2012. 7: p. 23.
159. Franck N., Seyec J.L., Guguen-Guillouzo C. and Erdtmann L., Hepatitis C Virus NS2 Protein Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 and Targeted for Degradation to the Proteasome. *J Virol*, 2005. 79(5): p. 2700–2708

160. Zheng Y., Qin H., Frank S.J., et al., A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway. *Blood*, 2011. 118: p. 156-66.
161. Lin Y.C., Hung M.S., Lin C.K., et al., CK2 inhibitors enhance the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells through inhibition of stat3 activation. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011. 26: p. 381-8.
162. Piazza F.A., Ruzzene M., Gurrieri C., et al., Multiple myeloma cell survival relies on high activity of protein kinase CK2. *Blood*, 2006. 108: p. 1698-707.
163. Chaverneff F. and Barrett J. Casein kinase II contributes to the synergistic effects of BMP7 and BDNF on Smad 1/5/8 phosphorylation in septal neurons under hypoglycemic stress. *J Neurochem*, 2009. 109: p. 733-43.