



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD1 ΣΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ ΤΗΣ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C»**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD1 ΚΑΤΑ ΤΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΟ ΤΗΣ
ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C»**

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Γεωργοπούλου Ουρανία, Υπεύθυνη Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Γεωργοπούλου Ουρανία, Υπεύθυνη Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
- Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
Κεφάλαιο 1: Ο ιός της ηπατίτιδας C.....	2
1.1 Ιστορικά στοιχεία	2
1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	3
1.3 Φυσική ιστορία της ηπατίτιδας C.....	4
1.4 Τροπισμός του HCV	7
1.5 Διάγνωση.....	7
1.6 Θεραπεία.....	8
1.7 Πρόληψη	9
Κεφάλαιο 2: Μοριακή Βιολογία του HCV	10
2.1 Ταξινόμηση-δομή	10
2.2 Το γονιδίωμα του HCV	11
2.1.1 Οι ιικές πρωτεΐνες	13
2.1.2 Οι μη κωδικές περιοχές.....	17
2.3 Ο κύκλος ζωής του HCV.....	19
2.4 Γονότυποι	24
2.5 Συστήματα μελέτης του HCV.....	26
Κεφάλαιο 3. Επιγενετικές τροποποιήσεις.....	28
3.1 Η μεθυλίωση του DNA	29
3.2 Τα miRNAs	30
3.3 Οι τροποποιήσεις των ιστονών	31
3.4 Ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών	32
3.5 Οι απομεθυλάσες των ιστονών.....	34
Κεφάλαιο 4. Η πρωτεΐνη LSD1	34
4.1 Γενικά στοιχεία της LSD1.....	35
4.2 Στόχοι της LSD1.....	35
4.3 Η δομή της LSD1	36
4.4 Η ενζυμική λειτουργία της LSD1.....	37
4.5 Ο βιολογικός ρόλος της LSD1	39
Στόχος	41
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1 Απομόνωση του γονιδίου της LSD1	43
2.2 Πέψη DNA και δημιουργία κατάλληλων άκρων	43

2.3 Ηλεκτροφόρηση	47
2.3.1 Προετοιμασία του DNA μάρτυρα (marker).....	49
2.3.2 Η ηλεκτροφόρηση	50
2.4 Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	51
2.5 Κλωνοποίηση.....	53
2.5.1 τεχνητή σύνδεση DNA μορίων (ligation).....	54
2.5.2 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών στελεχών <i>Escherichia coli</i> με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA (transformation)	56
2.5.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	59
2.6 Καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxi preparation).....	64
2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (maxi preparation)	64
2.7.1 Αλκαλική λύση.....	64
2.7.2 Καθαρισμός με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG8000)	65
2.7.3 Καθαρισμός με διαβάθμιση καισίου (CsCl)	66
2.8 Κυτταροκαλλιέργειες.....	67
2.8.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	69
2.9 Διαμόλυνση κυττάρων πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου jetPEI (transfection). 69	
2.10 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών Huh-7.5 και HepG2 που εκφράζουν LSD1	71
2.11 Απομόνωση των κλώνων.....	71
2.12 Μόλυνση κυττάρων με μολυσματικά στελέχη του HCV ιού.....	73
2.13 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση του διαλύματος RIPA.....	74
2.14 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων (nuclear extracts) ευκαρυωτικών κυττάρων	75
2.15 Μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford	77
2.16 Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	79
2.17 Ανοσοσύτρωση τύπου Western.....	82
2.18 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών.....	83
2.19 Απομόνωση RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.....	86
2.20 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription)	88
2.21 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	90
2.21.1 PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR).....	92
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
3.1 Κατασκευή του DNA μάρτυρα (DNA marker) pRB2017.....	97
3.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψων.....	97
3.3 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pLSD1	99

3.4 Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων	100
3.5 Έλεγχος της ακεραιότητας του πλασμιδιακού DNA με χαρτογράφηση περιορισμού και αλληλούχηση	101
3.6 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με το pLSD1 και έλεγχος της έκφρασης	103
3.7 Κατασκευή κυτταροσειρών σταθερών ως προς την υπερέκφραση της LSD1 και έλεγχος της έκφρασης των κλώνων	105
3.7.1 Έλεγχος της έκφρασης με χρήση της μεθόδου Western blot	105
3.7.2 Έλεγχος της έκφρασης των κλώνων με χρήση της μεθόδου RT-qPCR	107
3.8 Μόλυνση κυττάρων HuH7.5 που υπερεκφράζουν την LSD1 με μολυσματικά στελέχη του HCV ιού, JFH1 και 3a, και παρακολούθηση των επιπέδων της NS3 ιικής πρωτεΐνης	110
3.8.1 Επίπεδα της LSD1 κατά τη λοίμωξη με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού	113
3.8.2 Μόλυνση του κλώνου Hu1b με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού	114
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	119
4.1. LSD1 και HKK	119
4.2 Επίδραση του HCV ιού στην LSD1	122
4.3 Επίδραση της LSD1 στον HCV ιό	125
4.4 Συμπεράσματα-μελλοντικοί στόχοι	127
Βιβλιογραφία	130
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	150
ABSTRACT	152

Πίνακας συντμήσεων		
Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
3'UTR	3' untranslated region	3' μη μεταφραζόμενη περιοχή
5'UTR	3' untranslated region	3' μη μεταφραζόμενη περιοχή
AO	Amino-oxidase	Αμινο-οξειδάση
ApoB	Apolipoprotein a	Απολιποπρωτεΐνη Α
APS	Ammonium persulfate	Υπερθειικό αμμώνιο
ARFP	Alternative Reading Frame Protein	Πρωτεΐνη εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Bp	Base pairs	Ζεύγη βάσεων
BSA	Bovine serum albumin	Αλβουμίνη ορού βοός
CD	Cluster of differentiation	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase	Αλκαλική φωσφατάση εντέρου βοός
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector B	-
CK2	Casein kinase-2	Κινάση καζεΐνης-2
CLDN1	Claudin 1	Κλωδίνη 1
CMV	Cytomegalovirus	Κυτταρομεγαλοϊός
CoREST	REST co-repressor	-
CRE	Cis-acting element	Cis-δρων στοιχείο
DAA	Direct-acting antivirals	Άμεσης δράσης αντιικά
ddNTP	di-deoxynucleoside triphosphate	Τριφωσφορικοί διδεοξυριβονουκλεοζίτης

DDR	DNA damage response	Απάντηση σε DNA βλάβη
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's medium	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας
DNA	Deoxyribonucleotide acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNMT	DNA (deoxyribonucleic acid) methyltransferases	Μεθυλομεταφοράσες του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	Τριφωσφορικός δεοξυριβονουκλεοζίτης
DTT	Dithiothreitol	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
eIF3	Eukaryotic initiation factor 3	Ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης 3
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Ενζυμική ανοσοπροσοφητική δοκιμασία
EphA2	Ephrin receptor A2	Υποδοχέας εφρίνης A2
ER	Endoplasmic reticulum	Ενδοπλασματικό δίκτυο
FAD	Flavin adenine dinucleotide	Φλαβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο
FAS	Fatty acid synthase	Συνθάση λιπαρού οξέος
FCS	Fetal calf serum	Ορός εμβρύου βοός
GFP	Green fluorescent protein	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GTP	Guanosine triphosphate	Τριφωσφορική γουανοσίνη
HAT	Histone acetyltransferase	Ακετυλομεταφοράση ιστονών
HBV	Hepatitis B virus	Ιός της ηπατίτιδας B

HCC	Hepatocellular carcinoma	(ΗΚΚ) ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
HCV	Hepatitis C virus	Ιός της ηπατίτιδας C
HCVpp	Hepatitis C virus pseudoparticles	Ψευδοσωμάτια του ιού της ηπατίτιδας C
HDAC	Histone deacetylase	Αποακετυλάση των ιστονών
HGP	Human genome project	Πρόγραμμα αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος
HIV	Human immunodeficiency virus	Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HMT	Histone methyltransferase	Μεθυλομεταφοράση των ιστονών
HOTAIR	HOX transcript antisense intergenic RNA	-
HRP	Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του αγριοράπανου
HSV	Herpes simplex virus	Ιός του απλού έρπητα
HVR	Hyper-variable region	Υπερμεταβλητή περιοχή
IAV	Influenza A virus	Ιός της γρίπης τύπου A
IFITM	Interferon-inducible transmembrane gene family	Οικογένεια διαμεμβρανικών γονιδίων που ενεργοποιούνται από ιντερφερόνη
INF	Interferon	Ιντερφερόνη
IRES	Internal ribosome entry site	Εσωτερική θέση πρόσδεσης ριβοσώματος
ISDR	Interferon-α sensitivity-determining region	περιοχή καθορισμού ευαισθησίας σε ιντερφερόνη-α
JFH1	Hapanese fulminant jepatitis 1	-

Kb	Kilobase	Κιλοβάση
KDa	KiloDalton	Κιλοντάτον, μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους
LB	Luria-Bertani broth	Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani
LCS	Low Complexity Sequences	αλληλουχίες χαμηλής πολυπλοκότητας
LD	Lipid droplets	Λιποσταγονίδια
LDL	Low density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LDLR	Low density lipoprotein receptor	Υποδοχέας λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
lncRNA	Long non-coding RNA	-
LP	Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη
LSD1	Lysine-specific demethylase 1	Απομεθυλάση λυσίνης 1
LSD2	Lysine-specific demethylase 2	Απομεθυλάση λυσίνης 2
m.o.i.	Multiplicity of infection	Πολλαπλασιασμός της λοίμωξης
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Μιτογόνο-επαγόμενη πρωτεϊνική κινάση
MHC	Major Histocompatibility Complex	Μείζον συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας
miRNA	Micro-ribonucleic acid	Μίκρο-ριβονουκλεϊκό οξύ
M-MLV	Moloney-Murine leukemia virus	-
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Μεταφορικό ριβονουκλεϊκό οξύ
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver	Μη-αλκοολική λιπώδη

	disease	ηπατική νόσο
NANBH	Non-a, non-B hepatitis	Μη-A, μη-B ηπατίτιδα
NEAA	Non essential aminoacids	Μη απαραίτητα αμινοξέα
NS2	Non-structural protein 2	Μη-δομική πρωτεΐνη 2
NS3	Non-structural protein 3	Μη-δομική πρωτεΐνη 3
NS4A	Non-structural protein 4A	Μη-δομική πρωτεΐνη 4A
NS4B	Non-structural protein 4B	Μη-δομική πρωτεΐνη 4B
NS5A	Non-structural protein 5A	Μη-δομική πρωτεΐνη 5A
NS5B	Non-structural protein 5B	Μη-δομική πρωτεΐνη 5B
NuRD	Nucleosome remodeling deacetylase	Αποακετυλάση αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων
OCLN	occludin	Οκλουδίνη
ORF	Open reading frame	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
PBS	Phosphate buffer saline	Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
PCR	Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PD-1	Programmed cell death-1	Υποδοχέας προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
PEG	Polyethylene glycol	Πολυαιθυλαινογλυκόλη
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	-
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase	Κινάση της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PKR	Protein kinase R	Πρωτεϊνική κινάση R

PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride	Φθοριούχο φαινυλομεθανοσουλφονύλιο
PRMT	Protein arginine methyltransferase	Πρωτεΐνες μεθυλάσες αργινίνης
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
RBV	Ribavirin	ΡΙΜΠΑΒΙΡΙΝΗ
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
Real-time PCR	Real-time polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
RISC	RNA-induced silencing complex	Σύμπλοκο αποσίωπησης επαγόμενο από RNA
RNA	Ribonucleic acid	ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟ ΟΞΥ
RNAi	RNA interference	RNA παρεμβολή
RNasin	RNase inhibitor	Αναστολέας RNAσών
ROS	Reactive oxygen species	Αντιδραστικά προϊόντα οξυγόνου
rRNA	Ribosome ribonucleic acid	ΡΙΒΟΣΩΜΙΚΟ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟ ΟΞΥ
RT	Reverse transcription	Αντίστροφη μεταγραφή
RTK	Receptor tyrosine kinases	υποδοχείς κινάσες τυροσίνης
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
SET	Suvar3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax	-
siRNA	Small interfering RNA	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA
SIRT1	Silent information regulator 1	

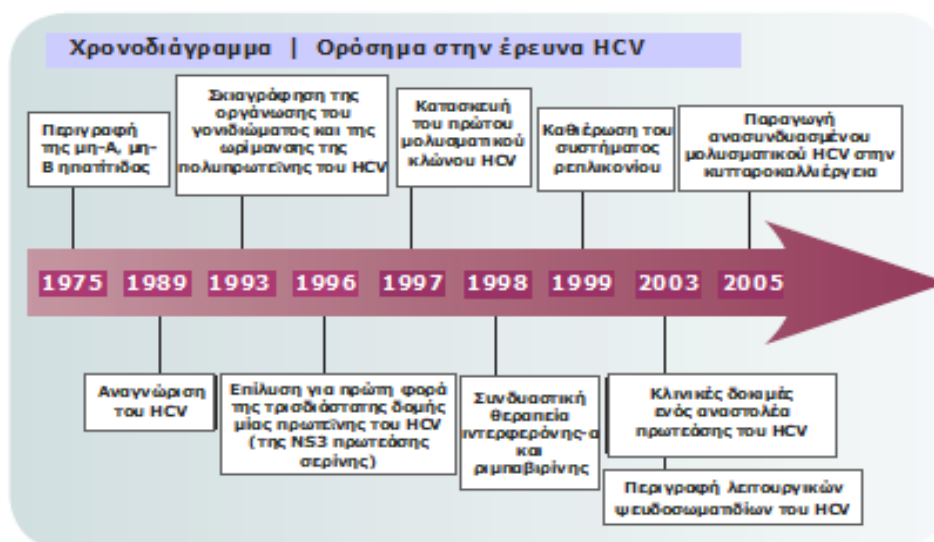
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein	Πρωτεΐνη δέσμευσης ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης
SVR	Sustained virological response	Παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση
SWIRM	Swi3p, Rsc8p and Moira	-
TBE	Tris, boric acid and EDTA	Tris, βορικό οξύ και EDTA
TBS	Tris buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris
TBST	TBS with Tween20	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με προσθήκη Tween20
TE buffer	Tris-EDTA buffer	Διάλυμα με Tris και EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine	N,N,N,N-τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη
Tm	Melting temperature	Θερμοκρασία τήξης
UV	Ultra-violet	Υπεριώδης
VLDL	Very low density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
WFI	Water for injection	Νερό για ένεση
WHO	World health organization	Παγκόσμιος οργανισμός υγείας

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κεφάλαιο 1: Ο ιός της ηπατίτιδας C

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η ηπατίτιδα C είναι ιογενής νόσος που προσβάλλει κυρίως το ήπαρ και οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus, HCV). Ο ιός περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975 από τον Harvey J. Alter, αφού είχαν σημειωθεί πολλές περιπτώσεις ηπατίτιδας μετά από μετάγγιση αίματος, που όμως δεν οφείλονταν στους ιούς ηπατίτιδας A (HAV) ή ηπατίτιδας B (HBV). Έτσι του δόθηκε η ονομασία ιός της ηπατίτιδας μη-A μη-B (non-A non-B Hepatitis, NANBH). Ωστόσο, την επόμενη δεκαετία ακολούθησαν πολλές αποτυχημένες προσπάθειες αναγνώρισης του ιού, ώσπου, το 1987 χρησιμοποιήθηκε μια νέα μέθοδος μοριακής κλωνοποίησης του ιού και έτσι, ένα χρόνο μετά, το 1988, επιβεβαιώθηκε η παρουσία του σε δείγματα ασθενών με ηπατίτιδα, που δεν ανήκαν στην ηπατίτιδα A ή στην ηπατίτιδα B (Alter, H.J., et al., 1975, Prince, A.M., et al., 1974). Τέλος, το 1989 η ομάδα του Houghton κατόρθωσε να κλωνοποιήσει και ταυτοποιήσει το γονιδίωμα του ιού (Houghton, M. 2009). Συγκεκριμένα, με τη χρήση αντισωμάτων ασθενούς με μη-A μη-B ηπατίτιδα, απομονώθηκε ένας cDNA κλώνος που κωδικοποιούσε έναν επίτοπο που βρίσκεται μέσα στην μη δομική πρωτεΐνη 4 (non structural 4, NS4) του ιού. Επίσης παρατηρήθηκε ότι ο κλώνος μπορούσε να υβριδοποιηθεί με ένα μονόκλωνο μόριο RNA μήκους περίπου 10.000 βάσεων, που βρέθηκε σε όλα τα δείγματα μη-A μη-B ηπατίτιδας (Choo QL et al., 1989).

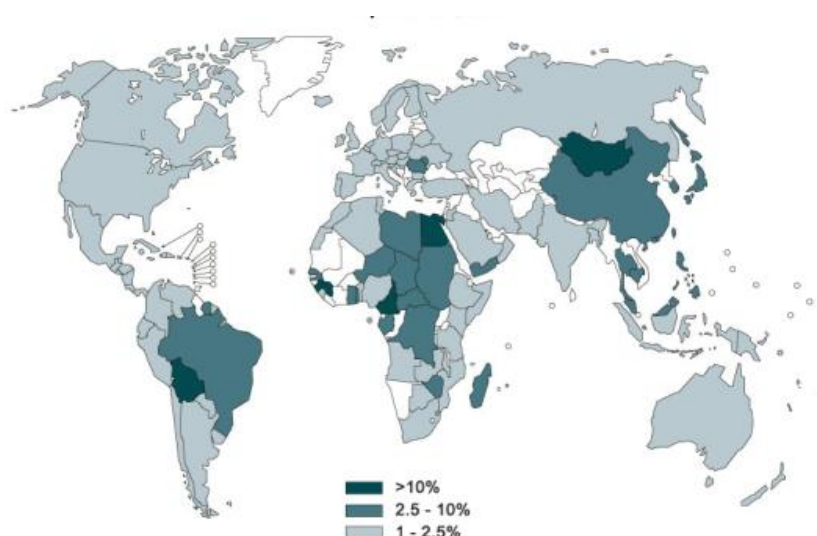


Εικόνα 1: Χρονοδιάγραμμα της έρευνας του ιού της ηπατίτιδας C.

1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία

Υπολογίζεται ότι σήμερα 130.000.000-170.000.000, δηλαδή το 3% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού, έχουν εκτεθεί στον ιό της ηπατίτιδας C (Hagan LM και Schinazi RF, 2013, Lee MH et al., 2014). Ο επιπολασμός της νόσου ποικίλλει ανά περιοχή, από 0,01%-0,1% σε ορισμένες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, έως και 15%-20% στην Αίγυπτο (Alter MJ 2007, Guerra J et al., 2012). Ωστόσο, τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να μην ανταποκρίνονται και στα πραγματικά, λόγω της ασυμπτωματικής φύσης της νόσου, αλλά και λόγω ελλειπών υποδομών επιτήρησης σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες (8). Τέλος, στην Ελλάδα, με βάση επιδημιολογικές μελέτες, ο επιπολασμός της νόσου υπολογίζεται σε 0,5%-2% (Gogos CA et al., Koulentaki M et al., 2001, Raptopoulou M et al. 2011, 2003, Sypsa V et al., 2004). Πράγματι, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν παρουσιάζονται συμπτώματα. Για το λόγο αυτό, σε κάποιες περιοχές, πολλοί από αυτούς που είναι θετικοί στον ιό της ηπατίτιδας C, ποσοστό 75%-90%, δε γνωρίζουν ότι έχουν εκτεθεί και παραμένουν φορείς της νόσου (Hatzakis A et al., 2011).

Υπολογίζεται ότι το 15%-30% των ασθενών με ηπατίτιδα C θα αναπτύξει κίρρωση ήπατος σε 20-30 χρόνια. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C ανέρχονται σε πάνω από 170 εκατομύρια και αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ΗΚΚ (Lee MH et al., 2014). Το 27% των περιστατικών κίρρωσης του ήπατος, καθώς και το 25% των περιστατικών ΗΚΚ οφείλονται σε έκθεση στον ιό της ηπατίτιδας C. Έχουν σημειωθεί περισσότεροι από 300.000 θάνατοι από ηπατίτιδα C, οι περισσότεροι λόγω κίρρωσης και ΗΚΚ. (Averhoff FM et al., 2012, Perz JF et al., 2006). Τέλος, το κόστος για το παγκόσμιο σύστημα υγείας που οφείλεται στην ηπατίτιδα C υπολογίζεται στα 5 δισεκατομμύρια USD (Leigh JP et al., 2001).

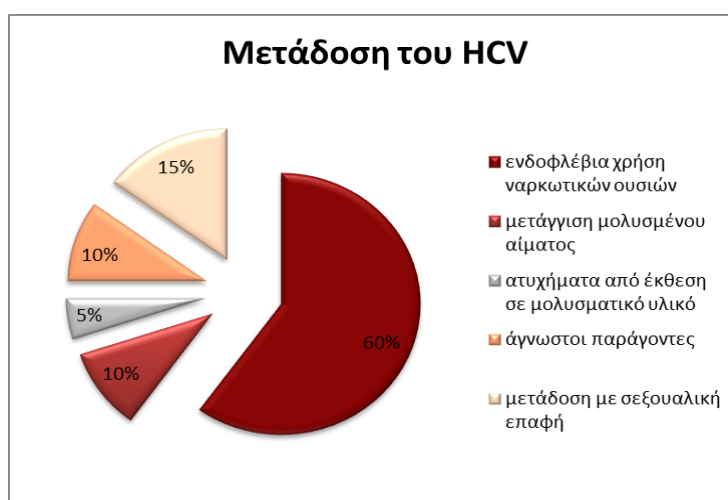


Εικόνα 2: Παγκόσμια επικράτεια της λοίμωξης από τον HCV. Πηγή: WHO

1.3 Φυσική ιστορία της ηπατίτιδας C

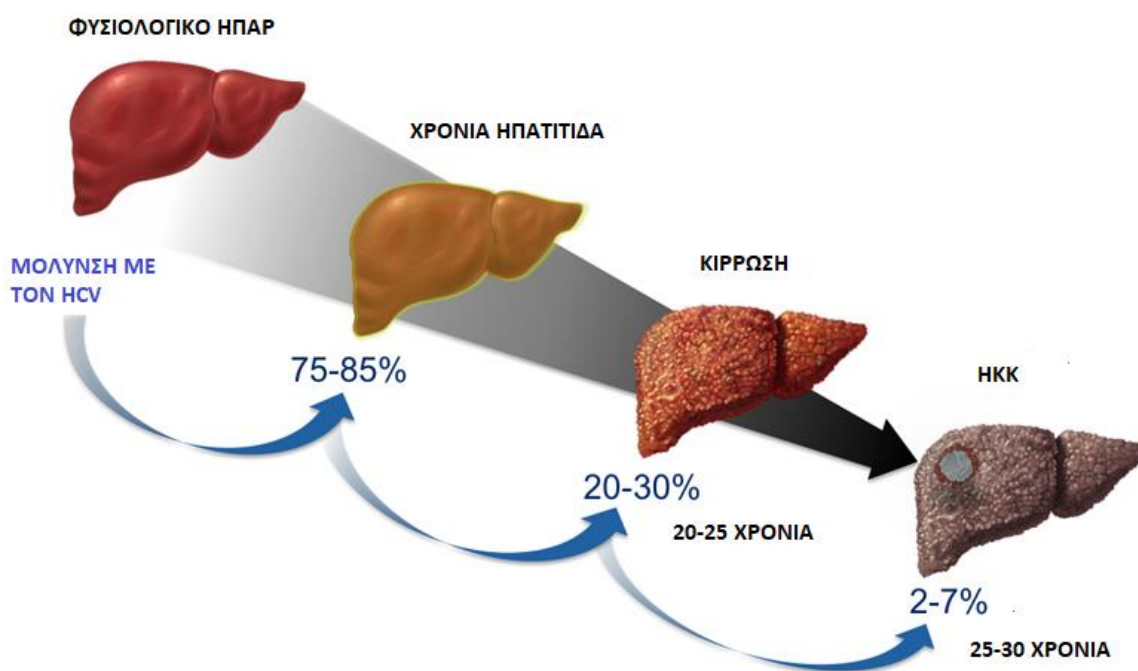
Ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί να προκαλέσει τόσο οξεία όσο και χρόνια ηπατίτιδα. Τα συμπτώματα της οξείας ηπατίτιδας συνήθως εμφανίζονται περίπου 7 εβδομάδες μετά την έκθεση στον ιό και διαρκεί από 2 έως και 12 εβδομάδες (Marcellin P, 1993). Πάνω από τα δύο τρίτα των ασθενών δεν παρουσιάζουν ποτέ συμπτώματα. Ωστόσο, σε ασθενείς που εκδηλώνουν συμπτώματα, τα συνηθέστερα από αυτά είναι ίκτερος, σκούρα ούρα ή αχολικά κόπρανα, ναυτία και πόνος στην κοιλιακή χώρα (Gerlach JT et al., 2003). Σπάνια σε ασθενείς με ηπατίτιδα C μπορεί να εκδηλωθεί φλεγμονώδης ηπατική ανεπάρκεια, ωστόσο ο κίνδυνος είναι υψηλότερος όταν αυτοί είναι μολυσμένοι ταυτόχρονα με τον ιό της ηπατίτιδας B (Hepatitis B virus, HBV) (Chu CM et al., 1999). Όσον αφορά το βιοχημικό τους προφίλ, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν υψηλά επίπεδα αμινοτρανσφερασών ορού (10-20 φορές πάνω από το φυσιολογικό), όπως επίσης και αυξημένη χολερυθρίνη (3-4 φορές πάνω από το φυσιολογικό) (Maheshwari A et al., 2008).

Μετά από οξύ επεισόδιο ηπατίτιδας C, ο κίνδυνος για χρόνια ηπατίτιδα C είναι υψηλότερος, αφού το 80%-100% των περιπτώσεων παραμένει θετικό σε HCV RNA και στο 60%-80% τα επίπεδα αμινοτρανσφερασών ορού παραμένουν υψηλά για μεγάλο χρονικό διάστημα (Barrera JM et al., 1995). Οι περισσότεροι ασθενείς που θα αναπτύξουν χρόνια ηπατίτιδα C, είτε δε θα εκδηλώσουν συμπτώματα, είτε θα εκδηλώσουν ήπια και μη ειδικά συμπτώματα, με πιο συνηθισμένη την κόπωση. Άλλα συμπτώματα που περιγράφηκαν είναι η ναυτία, η ανορεξία, η αρθραλγία, η μυαλγία, η αδυναμία και η ανορεξία. Τα συμπτώματα αυτά είναι πιο έντονα από τη στιγμή που θα αναπτυχθεί κίρρωση του ήπατος (Merican I et al., 1993, Shakil AO et al., 1995). Τέλος, παροξυσμός της οξείας νόσου μπορεί να εμφανιστεί στο 10% περίπου των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα C, για άγνωστους ακόμα λόγους (Alter MJ et al., 1992).

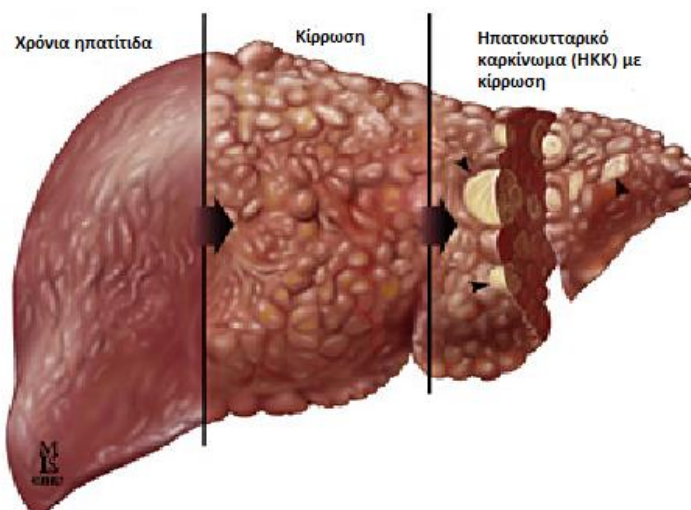


Εικόνα 3: Τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C. Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης του ιού είναι μέσω ενδοφλέβιας χρήσης ναρκωτικών ουσιών, κατατάσσοντας έτσι τους χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών σε ομάδα υψηλού κινδύνου.

Η φυσική ιστορία της χρόνιας ηπατίτιδας C είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί, καθώς η έκβασή της είναι ιδιαίτερος αργή. Σύμφωνα με μια ανασκόπηση από 111 μελέτες, ο χρόνος που θα εκδηλωθεί κίρρωση υπολογίζεται στα 20 χρόνια από τη στιγμή της μόλυνσης στο 16% των περιπτώσεων (Villano SA et al., 1999). Όπως όλοι οι ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα C δε θα αναπτύξουν κίρρωση, έτσι και όλοι οι ασθενείς που θα αναπτύξουν κίρρωση δε θα έχουν απαραίτητα επιπλοκές. Σε μια μελέτη με 200 ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C και κίρρωση, οι κυριότερες επιπλοκές που καταγράφηκαν ήταν ασκίτης (48%), γαστρεντερική αιμορραγία (32,5%), σοβαρή βακτηριακή μόλυνση (14,5%) και εγκεφαλοπάθεια (5%) (Planas R et al., 2004). Τα άτομα που θα αναπτύξουν κίρρωση έχουν 20 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν από καρκίνο του ήπατος, σε ποσοστό 1%-3% ετησίως (Alter MJ et al., 2014, Rosen HR, 2011, Wilkins T et al., 2010). Από τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα θα αναπτυχθεί σχεδόν αποκλειστικά σε αυτούς που έχουν αναπτύξει κίρρωση. Από τη στιγμή που θα αναπτυχθεί κίρρωση, ο κίνδυνος για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ανέρχεται σε 0%-3% κάθε χρόνο (Fattovich G et al., 1997, Hu KQ και Tong MJ, 1999).



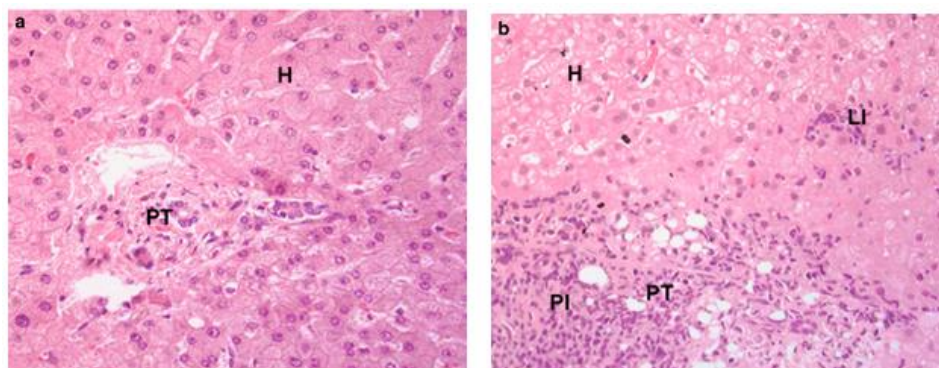
Εικόνα 4: Φυσική ιστορία που ακολουθεί τη μόλυνση από τον HCV. Μετά την αρχική μόλυνση με τον HCV, 75-85% των ασθενών αναπτύσσει χρόνια νόσο. Από τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, το 20-30% αναπτύσσουν κίρρωση μετά από 20-25 χρόνια από την αρχική μόλυνση. Τέλος, από τους ασθενείς με κίρρωση που σχετίζεται με τον HCV, το 2-7% αναπτύσσει ΗΚΚ (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα).



Εικόνα 5: Απεικόνιση ήπατος στην περίπτωση χρόνιας ηπατίτιδας C, κίρρωσης του ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Τέλος ο ιός έχει συνδεθεί με διάφορες άλλες διαταραχές, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, αιματολογικές διαταραχές, σακχαρώδη διαβήτη, παθήσεις του δέρματος και του θυρεοειδούς και με λεμφοϋπερπλασίες (Ozaras R και Tahan V, 2009, Zignego AL et al., 2007).

Πολλοί ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες σχετίζονται με την ικανότητα του ξενιστή να απομακρύνει τον ιό. Κάποιοι από αυτούς είναι η ηλικία, το φύλο και η φυσική κατάσταση, όπως το βάρος, η στεάτωση ήπατος, η κατανάλωση αλκοόλ και η ταυτόχρονη μόλυνση με HBV ή/και HIV (Chin M et al., 2016). Στην πρόοδο της χρόνιας ηπατίτιδας C συμβάλλουν παράγοντες τόσο του ξενιστή όσο και του ιού. Γρηγορότερη ανάπτυξη ηπατικής νόσου παρατηρείται σε ασθενείς αρσενικού φύλου, σε ασθενείς που μολύνονται με τον ιό σε μεγαλύτερη ηλικία, καθώς και σε ασθενείς με υψηλό δείκτη μάζας σώματος (Hourigan LF et al., 1999). Οι εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνουν την κατανάλωση αλκοόλ, έστω και σε μικρή ποσότητα (Ostapowicz et al., 1998, Pessione et al., 1998), καθώς και η καθημερινή χρήση μαριχουάνας, η οποία ενδεχομένως διεγείρει ενδογενείς ηπατικούς καναβινοειδείς υποδοχείς και προκαλεί ίνωση (Hezode et al., 2008). Άλλος ένας παράγοντας που επηρεάζει τη σοβαρότητα της νόσου είναι το ανοσοποιητικό σύστημα του κυττάρου του ξενιστή. Έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ των γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) με τη σοβαρότητα της νόσου. Επίσης, η δράση της TGF 1B και της αγγειοτενσίνης II φαίνεται ότι σχετίζεται άμεσα με την ηπατική ίνωση (Asti M et al., 1999, Powell EE et al., 2000). Ο ρόλος που παίζουν ιικοί παράγοντες δεν είναι ξεκάθαρος, υπάρχουν ωστόσο μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι ο γονότυπος 1b του HCV εμφανίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με κίρρωση και HCC (Hatzakis A et al., 1996, Noursbaum JB et al., 1995). Επίσης, η ταυτόχρονη μόλυνση με περισσότερους από ένα γονότυπους του HCV, καθώς και με HBV ή/και HIV, συνδέεται με γρηγορότερη πρόοδο της νόσου (Cacciola I et al., 1999, Benvegna L et al., 1997, Bonis PA et al., 1999).



Εικόνα 6: Ιστολογικές τομές ήπατος με χρώσεις αιματοξυλίνης-εωσίνης. Στην εικόνα α απεικονίζεται η ιστολογική τομή φυσιολογικού ήπατος και στην εικόνα b απεικονίζεται η ιστολογική τομή ήπατος ασθενούς με HCV λοίμωξη. Η: ηπατοκύτταρα PT: πυλαία περιοχή LI: λοίμωξη στους λοβούς του ήπατος PI: λοίμωξη στη πυλαία περιοχή.

1.4 Τροπισμός του HCV

Το κύριο όργανο-στόχος του HCV είναι το ήπαρ. Το 25-73% των ηπατικών κυττάρων μπορεί να υποστηρίξει την αντιγραφή του. Επίσης, ιικό γενετικό υλικό έχει εντοπιστεί σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού συστήματος, πολυμορφοπύρρηνα, λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα (παγκρέατος, θυρεοειδή, επινεφριδίων, σπλήνα, χοληφόρων), κύτταρα στοματικού βλεννογόνου, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), χωρίς όμως να είναι επιβεβαιωμένη πάντα η ικανότητα αντιγραφής του ιού στα κύτταρα αυτά (Forton DM et al., 2002, Isaguliantz MG, 2003, Poenisch M και Bartenschlager R, 2010).

1.5 Διάγνωση

Η διάγνωση του HCV είναι πολύ σημαντική, διότι αν η μόλυνση με τον ιό διαγνωστεί εγκαίρως, η θεραπεία μπορεί να χορηγηθεί σε πολύ αρχικό στάδιο κι έτσι η θεραπεία να είναι πολύ πιο αποτελεσματική (Hayasi N και Takehara T, 2006). Υπάρχουν διάφορες εργαστηριακές δοκιμασίες για την ανίχνευση του ιού, οι οποίες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ανοσολογικές μεθόδους, οι οποίες διακρίνονται σε άμεσες, που βασίζονται στην ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό αντιγόνων (HCV RNA και πρωτεΐνη core) και σε έμμεσες, που βασίζονται στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει μοριακές μεθόδους ανίχνευσης του ιικού RNA, που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Gupta et al., 2014).

Τα αντι-HCV αντισώματα εμφανίζονται στον ορό του ασθενούς 6-8 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση. Τα επίπεδα των αντισωμάτων μπορεί να παραμείνουν υψηλά για μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να εμφανίσουν μικρή ελάττωση, ή ακόμη και να εξαλειφθούν προοδευτικά. Σε ασθενείς στους οποίους η νόσος εξελίσσεται σε χρόνια, τα επίπεδα αυτά παραμένουν υψηλά, εκτός από περιπτώσεις

ασθενών με αιμοδιάλυση ή ανοσοανεπάρκεια (Lefrere JJ et al., 1997). Τα αντισώματα ανιχνεύονται με μεθόδους ELISA. Από το 1989 έχουν αναπτυχθεί τρεις γενιές ELISA. Οι δοκιμασίες πρώτης γενιάς αφορούν το επίτοπο c100-3 της περιοχής NS4, οι δεύτερης γενιάς ενσωματώνουν επιπλέον τους επιτόπους c22-3 και c33c των περιοχών core και NS3. Τέλος, οι δοκιμασίες τρίτης γενιάς περιλαμβάνουν αναδιαμορφωμένα αντιγόνα των core και NS3, και επιπλέον ενσωματώνουν ένα αντιγόνο από την περιοχή NS5 (Colin C et al., 2001, Hayasi N και Takehara T, 2006).

Οι μοριακές τεχνικές ανίχνευσης του HCV RNA παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και στην παρακολούθηση της μόλυνσης για δύο βασικούς λόγους. Πρώτον, η καλλιέργεια του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια είναι εξαιρετικά δύσκολη και δεύτερον, πρόκειται για μεθόδους οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν τον ιό μόλις μία εβδομάδα μετά τη μόλυνση, δηλαδή τουλάχιστον 4-6 εβδομάδες πιο γρήγορα σε σχέση με τις ανοσολογικές μεθόδους. Η διάγνωση του HCV γίνεται ως εξής: αρχικά με ανίχνευση αντισωμάτων και στη συνέχεια ακολουθεί η ανίχνευση του ιικού RNA για επιβεβαίωση, καθώς και για την παρακολούθηση της προόδου στη θεραπεία (Hayasi N και Takehara T, 2006). Μια ακόμη προσέγγιση είναι με τη μέτρηση των ηπατικών ενζύμων στον ορό, ωστόσο με τη μέθοδο αυτή δε μπορεί να διαχωριστεί η χρόνια από την οξεία νόσο. Τέλος, η ηπατική βιοψία μπορεί να μας δείξει το βαθμό ηπατικής βλάβης ή/και να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου πριν τη θεραπεία ή μετά την αποτυχία θεραπείας (Schiff ER et al., 1999).

1.6 Θεραπεία

Για να θεωρείται επιτυχημένη μια θεραπεία για τον HCV πρέπει να επιτευχθεί «παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση» (sustained virological response, SVR), κατάσταση δηλαδή στην οποία το ιικό RNA είναι μη ανιχνεύσιμο (<50IU/ml) 24 εβδομάδες μετά τη διακοπή της θεραπείας. SVR συνήθως επιτυγχάνεται σε ασθενείς που δεν έχουν αναπτύξει κίρρωση, ενώ οι ασθενείς με κίρρωση παραμένουν σε κίνδυνο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μπορεί να αναπτύξουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) ακόμη και μετά από την εκρίζωση του ιού (EASL Clinical Practice Guidelines, 2011). Σε γενικές γραμμές, το 99% των ατόμων που θα πετύχουν SVR έχουν για πολλά χρόνια μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, γεγονός που καθιστά το SVR24 μια καλή ένδειξη θεραπείας (Swain et al., 2011). Η πιο αξιόπιστη κλινική ένδειξη πρόγνωσης της νόσου είναι τα επίπεδα φλεγμονής και ίνωσης σε βιοψία ήπατος. Ασθενείς με ήπια φλεγμονή και καθόλου ίνωση είχαν μόλις 1,2% ανά έτος κίνδυνο για ανάπτυξη ίνωσης. Αντιθέτως, οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα έχουν 4,6% ανά έτος κίνδυνο να αναπτύξουν κίρρωση (Yano M et al., 1996).

Η θεραπεία και η εξάλειψη του HCV σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας είναι πολύ πιο περίπλοκη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο ιικός γονότυπος, η ηλικία του ασθενούς, το φύλο, η φυλή,

γενετικοί παράγοντες, το στάδιο της ίνωσης και η συνυπάρχουσα μόλυνση με HIV ή/και HBV (Chin M et al., 2016, Ge D et al., 2009).

Παρόλο που με την καθιερωμένη θεραπεία με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-α και ριμπαβιρίνη (PEG-IFN with RBV) για 24 εβδομάδες επιτυγχάνεται SVR σε περισσότερους από 75% των ασθενών που έχουν μολυνθεί από τους γονότυπους 2 και 3, τα ποσοστά SVR των ασθενών που έχουν μολυνθεί από τον γονότυπο 1 είναι μόλις 40%-50%, παρά την εκτενέστερη θεραπεία διάρκειας 48 εβδομάδων. Η PEG-IFN δε στοχεύει απευθείας τον ιό, αλλά ενεργοποιεί ανοσολογικούς μηχανισμούς κατά του ιού. Ο τρόπος δράσης αυτός της PEG-IFN ωστόσο, προκαλεί μια σειρά από παρενέργειες, όπως συμπτώματα γρίπης, κατάθλιψη και αιμολυτική αναιμία, κι έτσι δημιουργείται η ανάγκη για μια πιο αποτελεσματική θεραπεία για τη χρόνια ηπατίτιδα C, που να περιλαμβάνουν φάρμακα που στοχεύουν αποκλειστικά τον ιό. Οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό του ιού αποτελούν τον κύριο στόχο νέων θεραπειών για την ηπατίτιδα C, καθώς και το έναυσμα της εποχής των άμεσης δράσης αντιικών (direct-acting antivirals, DAAs), με απώτερο σκοπό τη δημιουργία φαρμάκων χωρίς ιντερφερόνη, που να λαμβάνονται από το στόμα μία φορά την ημέρα και για μικρότερο χρονικό διάστημα (Bartenschlager R et al., 2013, Sadler MD και Lee SS, 2015)

Υπάρχει μια πληθώρα DAAs από τα οποία άλλα έχουν εγκριθεί τα τελευταία τρία χρόνια και άλλα αναμένεται να εγκριθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τα νεότερα DAAs στα οποία έχει δοθεί έγκριση είναι το sofosbuvir (SOF), το οποίο είναι ένα νουκλεοτιδικό ανάλογο αναστολέας της HCV NS5B RNA-δεσαρτώμενης RNA πολυμεράσης, και το simeprevir, το οποίο είναι αναστολέας της NS3/NS4A πρωτεάσης (Sadler MD και Lee SS, 2015). Τέλος, υπάρχουν και αναστολείς που στοχεύουν κυτταρικούς παράγοντες, όπως είναι οι κυκλοφιλίνες και το miR122 (Bartenschlager R et al., 2013).

1.7 Πρόληψη

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο εμβόλιο για την ηπατίτιδα C, ούτε για πρόληψη ούτε για θεραπεία. Αυτό συμβαίνει λόγω της γενετικής ετερογένειας που παρουσιάζει ο ιός (7 γονότυποι και πάνω από 100 υπότυποι), της εξέλιξης και ύπαρξης τυχόν ειδών (quasispecies) σε έναν ξενιστή και αδυναμίας καλλιέργειας του ιού για την απομόνωσή του. Παρόλα αυτά, υπάρχουν εμβόλια που βρίσκονται σε διάφορα στάδια δοκιμών (Hagan H et al., 2011).

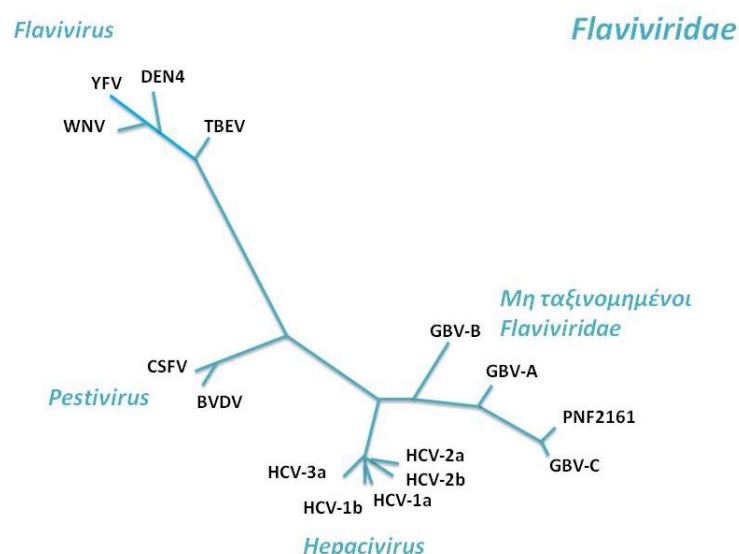
Για να αποφευχθεί η εξάπλωση του HCV είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν κάποια προληπτικά μέτρα. Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C θα πρέπει να εμβολιαστούν για την ηπατίτιδα A και B, καθώς και να αποφεύγουν ουσίες τοξικές για το ήπαρ όπως αλκοόλ και φάρμακα και οι ασθενείς με κίρρωση να υποβάλλονται σε εξέταση με υπερήχους για τον καρκίνο του ήπατος. Οι άνθρωποι με επιβεβαιωμένη

λοίμωξη από HCV θα πρέπει να υποβάλλονται σε θεραπεία (Wilkins T et al., 2010). Άλλα προληπτικά μέτρα είναι τα προγράμματα ανταλλαγής βελονών στους χρήστες ναρκωτικών ουσιών, καθώς και οι θεραπείες απεξάρτησης, οι οποίες φαίνεται να μειώνουν τον κίνδυνο από ηπατίτιδα C κατά 75% ανάμεσα στους χρήστες. Τέλος, όσον αφορά τα συστήματα υγείας, θα πρέπει ο έλεγχος των αιμοδοτών να είναι επαρκής και τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης να προτιμούν να χορηγούν φάρμακα δια του στόματος αντί ενέσιμα, όπου η παροχή συριγγών είναι ανεπαρκής (Alter MJ, 2007).

Κεφάλαιο 2: Μοριακή Βιολογία του HCV

2.1 Ταξινόμηση-δομή

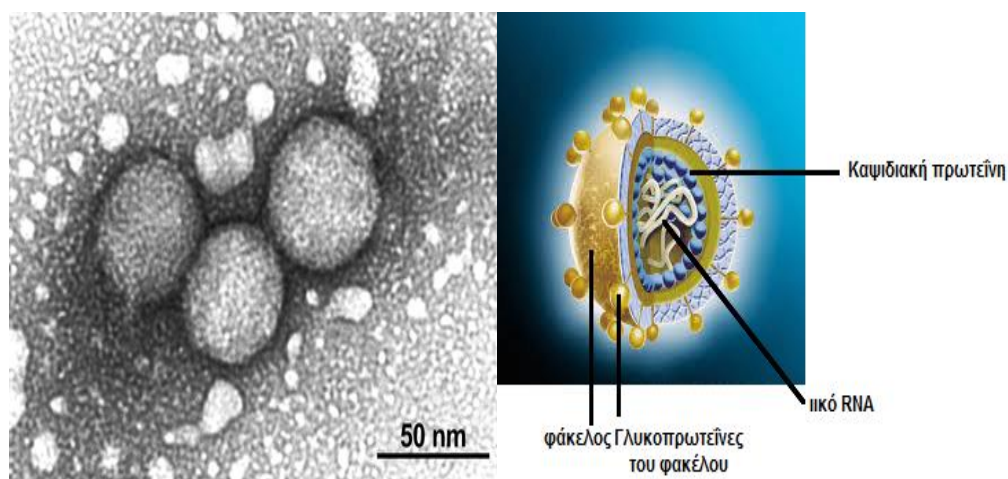
Ο HCV ανήκει στο γένος *Hepacivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο το μοναδικό μέλος αυτού του γένους μέχρι που ανακαλύφθηκαν και άλλα μέλη σε μολυσμένους σκύλους και άλογα (Karoor A et al., 2011). Η οικογένεια *Flaviviridae* περιλαμβάνει τρία γένη: *flavivirus*, *pestivirus* και *hepacivirus* (Lindenbach BD και Rice CM, 2001). Τα μέλη της μοιράζονται κάποια κοινά μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 7: Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας *Flaviviridae*. WNV: ιός Δυτικού Νείλου, YFV: ιός κίτρινου πυρετού, DEN4: ιός δάγγειου πυρετού-τύπου 4, TBEV: ιός κρωτογενούς εγκεφαλίτιδας, CSFV: ιός κλασικού πυρετού των χοίρων, BVDV: ιός ιογενούς διάρροιας των βοειδών, HCV: ιός της ηπατίτιδας C, PNF2161: στέλεχος ιού της ηπατίτιδας G.

Το μέγεθος του ιού στο παρελθόν είχε υπολογιστεί με υπερφυγοκέντρωση στα 80 nm περίπου, ενώ σήμερα, με σύγχρονες μεθόδους ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υπολογίζεται στα 30-60 nm (Gastaminza P et

al., 2010). Το ιικό σωματίδιο αποτελείται από ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας μόριο RNA μήκους 10 Kb περίπου, που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικής σύστασης περίβλημα με εικοσαεδρική (σφαιρική), το καψίδιο (Shimoike T et al., 1999). Οι δύο πρωτεΐνες του καψιδίου, οι E1 και E2, που κωδικοποιούνται από το RNA του ιού, δημιουργούν E1E2 ετεροδιμερή μέσω μη ομοιοπολικής σύνδεσης, για να σχηματίσουν το νουκλεοκαψίδιο (Cocquerel L et al., 2002). Το καψίδιο με τη σειρά του περικλείεται από ένα λιποπρωτεϊνικής σύστασης περίβλημα, το έλυτρο. Το έλυτρο είναι μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία ενσωματώνονται οι πρωτεΐνες του φακέλου και έχει αποδειχθεί ότι είναι κυτταρικής προέλευσης και προέρχεται από κάποια εσωτερική μεμβράνη του ξενιστή (Shimoike T et al., 1999).



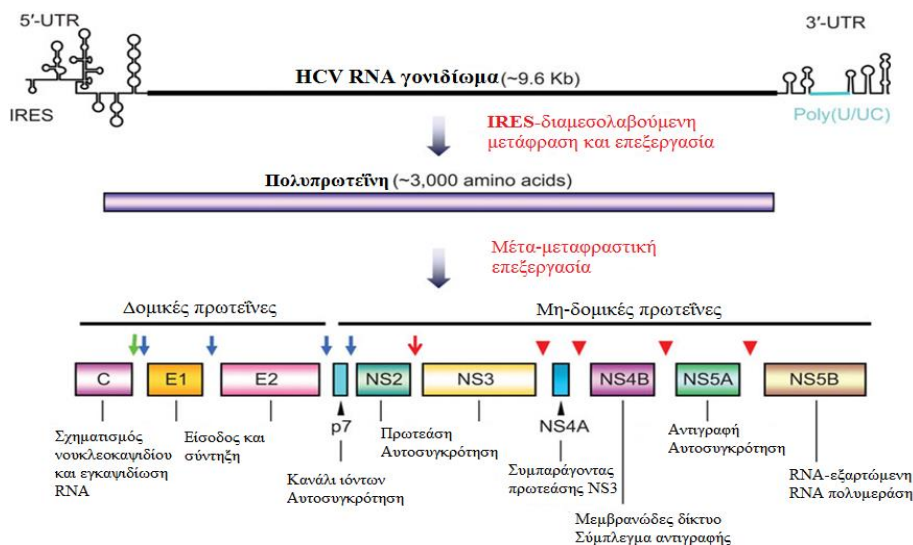
Εικόνα 8: Αριστερά: απεικόνιση ικών σωματιδίων του HCV σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 105,000X). Δεξιά: Αναπαράσταση της δομής του HCV σωματιδίου.

2.2 Το γονιδίωμα του HCV

Το γονιδίωμα του HCV, όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας και μήκους 9.600 βάσεων, το οποίο κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μήκους 3000 αμινοξέων. Το γονιδίωμα περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) το οποίο μεταφράζεται μέσω μιας εσωτερικής θέσης πρόσδεσης ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) στο 5' άκρο, και περιβάλλεται από τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions, UTRs) (Lindenbach BD και Rice CM, 2005). Η πολυπρωτεΐνη που προκύπτει στη συνέχεια ωριμάζει μέσω πρωτεολύσεων τόσο από ικές όσο και από κυτταρικές πρωτεάσες και παράγονται οι δομικές πρωτεΐνες, δηλαδή οι core, E1 και E2, και οι μη δομικές πρωτεΐνες, δηλαδή οι p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B (Gottwein JM και Bukh J, 2008, Penin F et al., 2004).

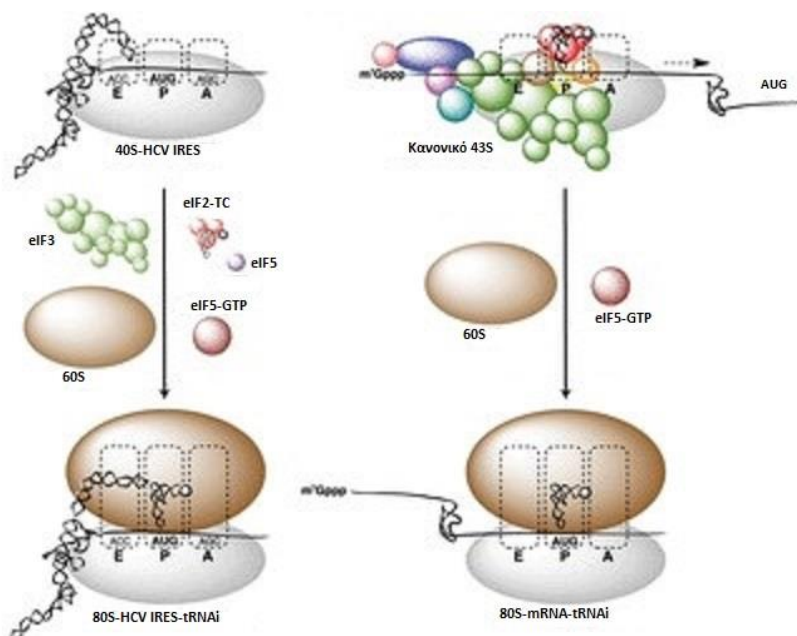
Το γονιδίωμα του ιού έχει διάφορες λειτουργίες. Πρώτον, ως αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) για τη μετάφραση των ικών πρωτεϊνών, δεύτερον, ως μήτρα για την αντιγραφή του γονιδιώματος

του ιού και τέλος ως νεοσυσταθέν γενετικό υλικό το οποίο πακετάρεται προς δημιουργία νέων ιικών σωματιδίων (Lindenbach BD και Rice CM, 2005).



Εικόνα 9: Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας C. Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας C αποτελείται από ~9.6 και στο οποίο φαίνεται η δομή των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών (untranslated regions, NTRs). Μέσω της IRES-διαμεσολαβούμενης μετάφρασης και επεξεργασίας του γονιδιώματος προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη ~3000 αμινοξέων. Στη συνέχεια μέσω πρωτεολύσεων της πολυπρωτεΐνης ποκύπτουν οι ιικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν διάφορους ρόλους στην αναπαραγωγή του ιού της ηπατίτιδας C (Moradpour D et al., 2007).

Το γονιδίωμα του HCV δε διαθέτει 5' καλύπτρα, η οποία μεταξύ άλλων προωθεί τη μετάφραση του RNA. Έτσι, η μετάφραση του γονιδιώματος του HCV, εξαρτάται από την αλληλουχία IRES που βρίσκεται στην 5' NTR, η οποία δεσμεύεται απευθείας και ισχυρά στην υπομονάδα 40S του ριβοσώματος, παρακάμπτοντας με αυτό τον τρόπο προ-εναρκτήριους παράγοντες που είναι απαραίτητοι για την έναρξη της μετάφρασης. Το σύμπλοκο IRES-40S έπειτα στρατολογεί τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) και το τριαδικό σύμπλοκο Met-tRNA-eIF2-GTP προς τη δημιουργία ενός μη κανονικού 48S ενδιαμέσου. Το ενδιαμέσο αυτό μόριο στη συνέχεια, μέσω μιας αργής κινητικής μεταπίπτει στο μεταφραστικά ενεργό σύμπλοκο 80S και το HC γονιδίωμα μεταφράζεται κανονικά. Από τη μετάφραση παράγεται μια πολυπρωτεΐνη η οποία κόβεται πρωτεολυτικά προς την παραγωγή 10 ικών πρωτεϊνών. Το αμινοτελικό τρίτο της πολυπρωτεΐνης κωδικοποιεί τις τρεις δομικές πρωτεΐνες: τη βασική πρωτεΐνη core (C) και τις γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2. Μετά τη δομική περιοχή ακολουθεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η p7, που λειτουργεί ως ιοντικό κανάλι. Το υπόλοιπο γονιδίωμα κωδικοποιεί τις μη δομικές (NS) πρωτεΐνες NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B, οι οποίες συντονίζουν τις ενδοκυττάρειες διεργασίες του κύκλου ζωής του ιού. Από αυτές έχει δειχθεί η περιοχή που ξεκινά από την NS3 και φτάνει ως την NS5B είναι απαραίτητη και επαρκής για τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA, καθώς σχηματίζουν τη ρεπλικάση, ενώ η περιοχή Core έως NS2 έχει το δομικό ρόλο. Παρόλα αυτά, σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί ότι και οι μη δομικές πρωτεΐνες έχουν κάποιες δομικές λειτουργίες (Lohmann V et al., 1999, Moradpour D και Penin F, 2013).



Εικόνα 10: Η λειτουργία του IRES. Απεικονίζεται η έναρξη της μετάφρασης με την πρόσδεση του mRNA στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα μέσω IRES (αριστερά) και φυσιολογικά (δεξιά). Στα αριστερά φαίνεται ότι η IRES-διαμεσολαβούμενη μετάφραση απαιτεί τη δράση ελάχιστων παραγόντων σε σχέση με τη φυσιολογική μετάφραση στα δεξιά, η οποία απαιτεί τη δράση μεγάλου αριθμού παραγόντων.

2.1.1 Οι ιικές πρωτεΐνες

Η πρώτη πρωτεΐνη που μεταφράζεται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) είναι η Core, που αποτελείται από 191 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος ίσο με 21 kDa και ρόλος της είναι ο σχηματισμός του νουκλεοκαψιδίου (Santolini E et al., 1994). Η ώριμη πρωτεΐνη είναι μια διμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη που σταθεροποιείται μέσω ενός Cys128 δισουλφιδικού δεσμού (Boulant S et al., 2005). Με τη δράση πεπτιδάσης που κόβει στη σηματοδοτική αλληλουχία ανάμεσα στις Core και E1, προκύπτει ένα πρώιμο πεπτίδιο 191 αμινοξέων. Περαιτέρω κατεργασία του C-τελικού άκρου από την πρωτεάση SPP (Signal Peptide Peptidase) οδηγεί στην παραγωγή της ώριμης Core πρωτεΐνης (McLauchlan J et al., 2002). Πειράματα μεταλλαξιγένεσης δείχνουν ότι απαιτούνται τουλάχιστον 177 αμινοξέα της πρωτεΐνης για την παραγωγή μολυσματικών σωματιδίων (Korpp M et al., 2010).

Στην περιοχή της πρωτεΐνης core υπάρχει ένα δεύτερο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF), το οποίο κωδικοποιεί για μια άλλη πρωτεΐνη, που ονομάζεται ARFP (alternative reading frame protein), ή πρωτεΐνη F (frameshift), ή core+1 (Li HC et al., 2014). Η πρωτεΐνη αυτή παράγεται μέσω μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου από το ριβόσωμα μέσα στην περιοχή της core (Jackson RJ et al., 2012). Πιστεύεται ότι η core+1 συμμετέχει σε κάποιες λειτουργίες, διότι η core είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη (Niepmann M, 2013). Ωστόσο, δεν είναι γνωστή η συμβολή της στην αντιγραφή του ιού.

Οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου, E1 και E2, είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μια N-τελική εξωτερική επικράτεια 160 και 360 αμινοξέων αντίστοιχα και μια μικρή διαμεμβρανική επικράτεια 30 αμινοξέων (Cocquerel L et al., 2002). Οι διαμεμβρανικές επικράτειες συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στις λειτουργίες των E1 και E2, όπως η αγκυροβόληση στη μεμβράνη, η διατήρηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η μη ομοιοπολική σύνδεση των E1-E2 ετεροδιμερών προς το σχηματισμό του φακέλου (Voisset C και Dubuisson J, 2004).

Η p7 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 63 αμινοξέων που περιλαμβάνει δύο διαμεμβρανικές α-έλικες που ενώνονται μέσω μιας θετικά φορτισμένης κυτταροπλασματικής θηλιάς, ενώ τα N- και C-τελικά άκρα προσανατολίζονται προς το ενδοπλασματικό δίκτυο. Σχηματίζει εξαμερή ή επταμερή και έχει δράση καναλιού κατιόντων (Carrere-Kremer S et al., 2002). Η p7 δεν είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA, αλλά είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση των μολυσματικών ιικών σωματιδίων *in vitro*, αλλά και για την αποτελεσματική μόλυνση *in vivo* (Steinmann E και Pietschmann T, 2010).

Μια πρωτεάση κυστεΐνης που κωδικοποιείται από την NS2 και της οποίας η δράση ενισχύεται από το N-τελικό ένα τρίτο της NS3, κόβει την πρόδρομη πολυπρωτεΐνη στον σύνδεσμο NS2/NS3 (Schregel V et al., 2009). Η NS2 μόνη της μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA, ωστόσο το χώρισμα του δεσμού NS2/NS3 είναι απαραίτητο για την παραγωγή πλήρως λειτουργικής NS3 και συνεπώς για την επιτυχή αντιγραφή του RNA. Το C-τελικό μισό είναι αυτό που διαθέτει την καταλυτική δράση, ενώ το N-τελικό μισό αποτελεί μια μεμβρανική επικράτεια με 3 διαμεμβρανικά τμήματα (Jirasko V et al., 2008). Η NS2 παίζει σημαντικό οργανωτικό ρόλο στη συναρμολόγηση του ιικού σωματίου, που είναι ανεξάρτητος της δράσης πρωτεάσης, μέσω αλληλεπίδρασης με τις υπόλοιπες ικές πρωτεΐνες (Ma Y et al., 2011, Popescu CI et al., 2011).

Οι NS3 και NS4A σχηματίζουν ένα μη ομοιοπολικό σύμπλοκο όπου η δεύτερη δρα ως συμπαράγοντας της πρώτης. Η NS3 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη 70 kD, της οποίας το N-τελικό ένα τρίτο (αμινοξέα 1-180) έχει δράση πρωτεάσης σερίνης και τα υπόλοιπα δύο τρίτα (αμινοξέα 181-631) έχουν δράση NTPάσης/RNA ελικάσης (Morikawa K et al., 2011). Παρόλο που η NS3 διαθέτει από μόνη της εξαιρετική πρωτεολυτική ικανότητα, η πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης καταλύεται αποτελεσματικά με τη δράση του συμπαράγοντα NS4A. Πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο μόλις 54 αμινοξέων, το οποίο έχει πολλαπλούς ρόλους, όπως: πρώτον, να αγκυροβολεί την πρωτεάση σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, μέσω ενός N-τελικού διαμεμβρανικού τμήματος που διαθέτει, δεύτερον παραχωρεί μια *β-strand* στη N-τελική πρωτεάση, συμμετέχοντας έτσι στην τελική δομή της, τρίτον σταθεροποιεί την πρωτεάση έναντι πρωτεολυτικής αποικοδόμησης και τέλος ενεργοποιεί τη δράση πρωτεάσης αλλάζοντας τη συμμετρία του ενεργού της

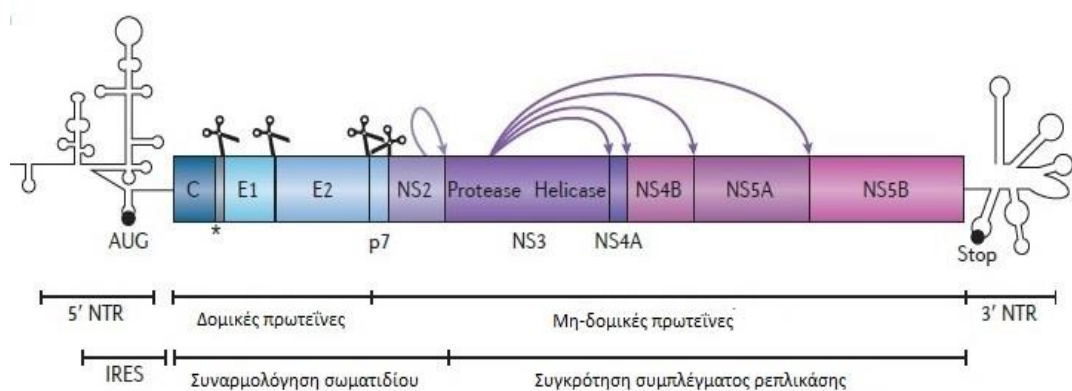
κέντρου (Appw N et al., 2006). Τα 400 αμινοξέα που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο της NS3 σχηματίζουν μια RNA ελικάση η οποία ξεδιπλώνει τις RNA δομές, με μια ATP-εξαρτώμενη δράση (Tai CL et al., 1996).

Η NS4B είναι μια εξαιρετικά υδρόφοβη πρωτεΐνη που περιλαμβάνει 4 διαμεμβρανικές περιοχές και ένα N-τελικό άκρο που συμβάλλει στη στόχευση της πρωτεΐνης στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες (Lundin M et al., 2003). Η υπερέκφραση της NS4B σε κυτταροκαλλιέργεια μπορεί να επάγει μεμβρανικές αλλοιώσεις. Αυτό μας δείχνει ότι ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι η δημιουργία μεμβρανικών δομών που θα αποτελούν ικρίωμα για τη δημιουργία του ρεπλικοσώματος (Egger D et al., 2002). Ωστόσο, η δομή των μεμβρανικών αυτών αλλοιώσεων είναι μορφολογικά ξεχωριστή από το μεμβρανικό δίκτυο και αυτό μας δείχνει ότι ένα ή περισσότερα κυτταρικά και ιικά συστατικά συμβάλλουν για να σχηματιστεί το ρεπλικόσωμα. Έχει βρεθεί ότι η NS4B διαθέτει ένα μοτίβο που δεσμεύει τη νουκλεοτιδική αλληλουχία GX₄GK κι έτσι σε μελέτη έχει δειχθεί ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-NS4B όταν εκφράζεται σε κυτταροκαλλιέργεια μπορεί να δεσμεύσει GTP. Επίσης η ανασυνδυασμένη NS4B διαθέτει δράση GTPάσης (Einav S et al., 2004). Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες οι οποίες δείχνουν ότι μεταλλαγές οι οποίες μεταβάλλουν το συγκεκριμένο μοτίβο, όχι μόνο δε μειώνουν την αντιγραφή του RNA, αλλά την αυξάνουν (Bartenschlager R et al., 2004).

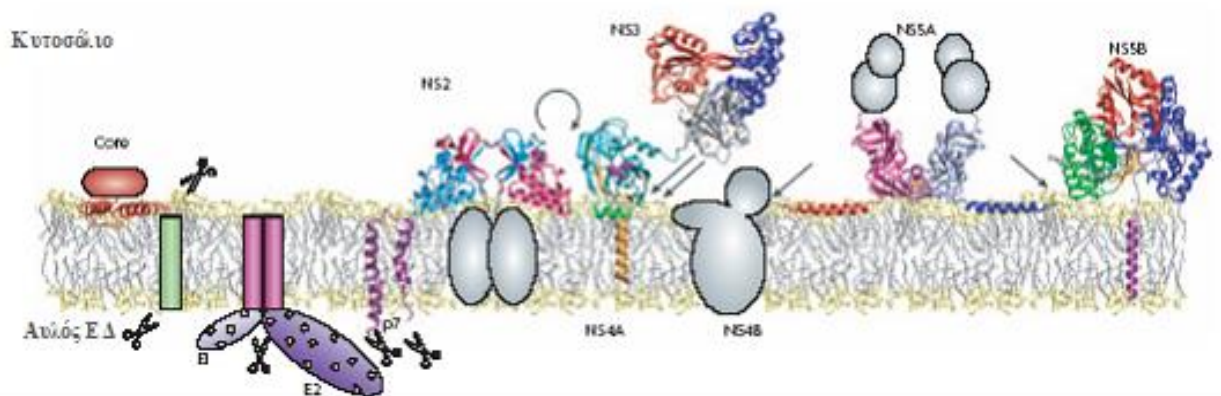
Η NS5A συντίθεται από μια N-τελική αμφιπαθή α-έλικα που αγκυροβολείται στη μεμβράνη και τρεις διακριτές επικράτειες που διαχωρίζονται μεταξύ τους από τις αλληλουχίες χαμηλής πολυπλοκότητας (Low Complexity Sequences, LCSs) I και II (Penin F et al., 2004, Tellinghuisen TL et al., 2004). Η N-τελική α-έλικα είναι μια μεμβρανική άγκυρα η οποία περιλαμβάνει μια υδρόφοβη περιοχή πλούσια σε τρυπτοφάνη που είναι ενσωματωμένη στην κυτταροπλασματική πλευρά της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας και μια ιδιαίτερα συντηρημένη πολική πλευρά που χρησιμεύει ως πλατφόρμα για τη συγκρότηση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αντιγραφή του RNA (Brass V et al., 2002, Penin F et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε, το πολικό τμήμα της πρωτεΐνης αποτελείται από τρεις διακριτές επικράτειες. Η επικράτεια I (αμινοξέα 36-213) από ανάλυση κρυσταλλικής δομής της φαίνεται να αποτελείται από μια βασική αμινοτελική υποεπικράτεια IA και μια όξινη καρβοξυτελική υποεπικράτεια IB (Tellinghuisen TL et al., 2005). Φαίνεται πως στην υποεπικράτεια IA ένα ιόν ψευδαργύρου συντονίζεται από ένα μοναδικό μοτίβο τεσσάρων εξαιρετικά συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης τα οποία είναι απολύτως απαραίτητα για την αντιγραφή του RNA (Tellinghuisen TL et al., 2005). Η επικράτεια II βρέθηκε ότι περιέχει μια περιοχή που προσδίδει αντοχή του ιού στη θεραπεία με ιντερφερόνη και ονομάζεται περιοχή καθορισμού ευαισθησίας σε ιντερφερόνη-α (interferon-α sensitivity-determining region, ISDR), η οποία βρέθηκε αργότερα να αλληλεπιδρά άμεσα με ένα προϊόν γονιδίου που διεγείρεται από IFN-α, αυτό της PKR πρωτεϊνικής κινάσης (Gale M et al., 1998). Επίσης, η NS5A έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς μπορεί να ρυθμίζει τα τρία κύρια MAPK μονοπάτια που εμπλέκονται στη μιτογόνο σηματοδότηση και άρα ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την ενεργοποίηση, μέσω προ- ή αντι-αποπτωτικών μηχανισμών. Τέλος,

πιστεύεται πως συμμετέχει σε μονοπάτια ROS καθώς και σε μονοπάτια της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K), η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μετασχηματισμό των ηπατοκυττάρων (Macdonald A et al., 2004). Για παράδειγμα, έρευνα του εργαστηρίου μας έδειξε ότι η NS5A ενεργοποιεί την PP2A (Protein Phosphatase 2A), μια φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ρυθμίζει τη φωσφορύλωση πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση (Georgoroulou et al., 2006).

Η NS5B είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) και επομένως το καταλυτικό κέντρο του ρεπλικοσώματος. Το ένζυμο μπορεί να καταλύσει τη σύνθεση του RNA *de novo*, τουλάχιστον *in vitro*, αλλά πιστεύεται ότι αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει και *in vivo* (Bartenschlager R et al, 2004). Η δράση του ενζύμου φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω αλληλεπίδρασης με τις ιικές πρωτεΐνες NS3 και NS4A, καθώς και με την κυκλοφιλίνη B. Μελέτη της κρυσταλλικής δομής της NS5B δείχνει μία δομή όμοια με αυτή όλων των πολυμερασών, με τις υποπεριοχές με οργάνωση δεξιού χεριού (παλάμης, δακτύλου και αντίχειρα) (Bressanelli S et al., 199). Η δέσμευση της RNA μήτρας και η έναρξη της αντιγραφής πιστεύεται ότι ελέγχεται από μια εύκαμπτη δομή φουρκέτας, που βρίσκεται στην υποπεριοχή του αντίχειρα και δείχνει προς το ενεργό κέντρο (Bressanelli S et al., 2002, Lesburg CA et al., 1999). Αυτή η δομή ενδέχεται να αντιστοιχεί σε μια κλειστή διαμόρφωση του ενζύμου που υιοθετείται για την έναρξη της σύνθεσης του RNA με βάση τον *de novo* μηχανισμό. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η φουρκέτα εμπλέκεται άμεσα στον σχηματισμό του πρώτου εναρκτήριου δινουκλεοτιδίου (Harrus D et al., 2010). Η μετα-μεταφραστική πρόσδεση στη μεμβράνη γίνεται μέσω των 21 καταλοίπων του καρβοξυτελικού άκρου, με αποτέλεσμα την αναπόσπαστη ένωση με την μεμβράνη και τον προσανατολισμό της καταλυτικής περιοχής προς το κυτταρόπλασμα (Schmidt-Mende et al., 2001). Η μεμβρανική άγκυρα της NS5B δεν είναι απαραίτητη για την δραστικότητα πολυμεράσης *in vitro* αλλά είναι απολύτως απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA στα κύτταρα (Moradpour D et al., 2004).



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας των πρωτεολύσεων της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C προς απελευθέρωση των ιικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 12: Δομές και σύνδεση των πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας C στις μεμβράνες του κυττάρου-ξενιστή. Τα ψαλίδια αναπαριστούν την πέψη των ιικών πρωτεϊνών από κυτταρικές και ικές πρωτεάσες. Το κυκλικό τόξο δείχνει το πρωτεολυτικό κόψιμο από την πρωτεάση NS2-3. Τα μαύρα τόξα υποδεικνύουν την επεξεργασία από το σύμπλεγμα πρωτεασών NS3-4A.

Πρωτεΐνη	Μοριακή μάζα (όπως εκτιμήθηκε από ανάλυση σε SDS-PAGE)	Λειτουργία
Core	21 kDa	Πρόσδεση RNA, σχηματισμός του νουκλεοκαψιδίου
E1	31-35 kDa	Γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου, σύνδεση με την E2
E2	70 kDa	Γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου, πρόσδεση στον υποδοχέα, σύνδεση με την E1
p7	7 kDa	Κανάλι ιόντων
NS2	21 kDa	Συστατικό της πρωτεΐνάσης NS2-3
NS3	69 kDa	Αμινοτελική περιοχή: πρωτεΐνάση, καρβοξυτελική: NTPάση/ελικάση
NS4A	6 kDa	Συμπαράγοντας της πρωτεΐνάσης NS3-4A
NS4B	27 kDa	Επάγει μεμβρανικές αλλαγές
NS5A	56-58 kDa	Φωσφοπρωτεΐνη
NS5B	68 kDa	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση

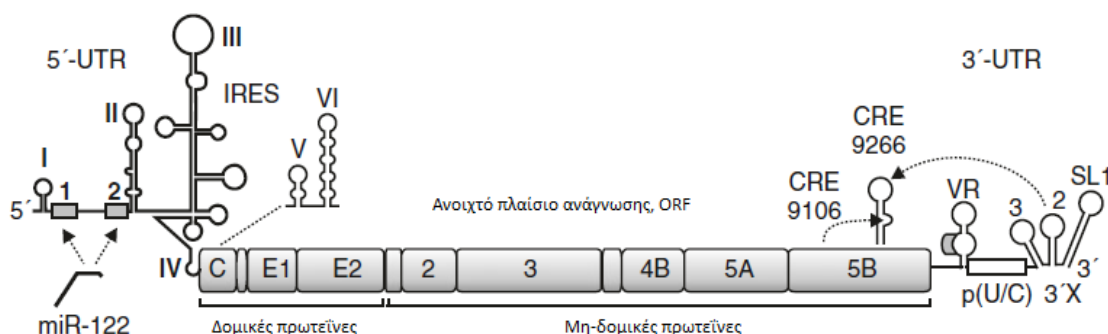
Πίνακας 1: Οι ικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C. Συνοπτικά τα χαρακτηριστικά τους.

2.1.2 Οι μη κωδικές περιοχές

Οι 5' και 3' μη κωδικές περιοχές (nontranslated regions, NTRs) των ιών περιέχουν cis-acting στοιχεία (cis-acting elements, CREs) που είναι απαραίτητα για την επιτυχή μετάφραση και τον πολλαπλασιασμό του ιού.

Η 3' NTR αποτελείται από μια μεταβλητή περιοχή, η οποία αποτελείται από περίπου 40 βάσεις και έχει μια σταθερή δομή στελέχους-θηλιάς, ακολουθεί μια polyU/UC ακολουθία πλούσια σε πυριμιδίνες και τέλος καταλήγει σε μια συντηρητική ουρά μήκους 98 νουκλεοτιδίων (98X) (Blight KJ et al., 1997, Kolykhalov AA et al., 1996, Tanaka T et al., 1995). Οι δομές αυτές φαίνεται πως είναι σημαντικές για την έναρξη της σύνθεσης του RNA αρνητικής πολικότητας. Η μεταβλητή περιοχή δεν είναι απολύτως απαραίτητη, αν και διαγραφή της μειώνει την ικανότητα αντιγραφής (Friebe P και Bartenschlager R, 2002). Ωστόσο, η polyU/UC ακολουθία καθώς και η 98X ουρά είναι απαραίτητες για την αντιγραφή (Yi M και SM Lemon, 2003). Έχει δειχθεί ότι για την επιτυχή αντιγραφή του RNA σε κυτταροκαλλιέργεια απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός 26 U (Friebe P και Bartenschlager R, 2002). Η 98X ουρά διαθέτει τρεις εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές, τις SL1, SL2 και SL3, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του RNA (Yi M και SM Lemon, 2003). Σχετικά πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι πρωτεΐνες οι οποίες διμερίζονται, αλληλεπιδρούν τόσο με την 98X ουρά όσο και με την περιοχή IRES, φέρνοντάς τες κοντά, κι έτσι η 98X ουρά συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής, μιας και αποτελεί τη θέση εισόδου της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του RNA του ιού (Spangberg K et al., 2001, Yi M και SM Lemon, 2003). Τέλος, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη core, συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης, αυξάνοντας τα επίπεδά της 3-5 φορές (Cristofari G et al., 2004).

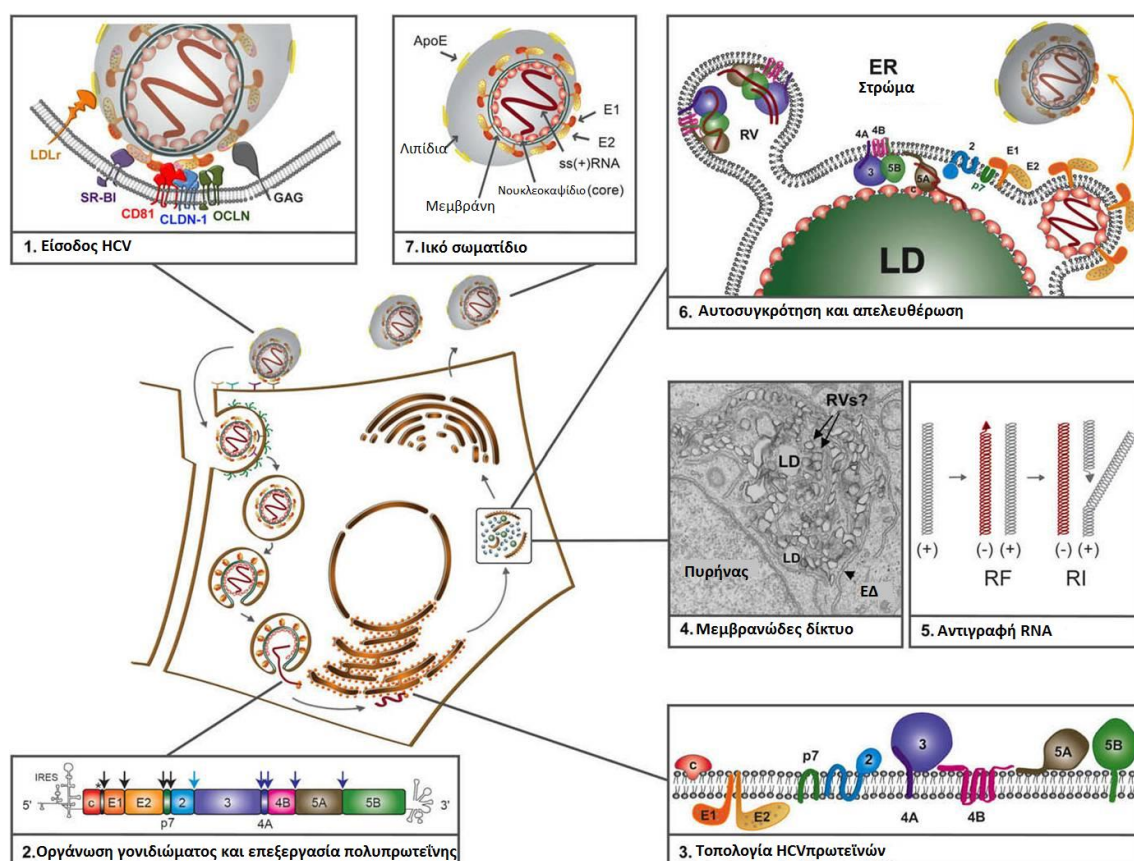
Η μετάφραση της πολυπρωτεΐνης του HCV ξεκινά από την 5' NTR. Η 5' NTR αποτελείται από 341 νουκλεοτίδια και είναι μια από τις δύο πιο συντηρητικές περιοχές του γονιδιώματος του HCV. Διαθέτει μια περιοχή εσωτερικής πρόσδεσης ριβοσωμάτων (Internal Ribosome Entry Site, IRES), η οποία περιλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα της 5' NTR καθώς και τις πρώτες 44 βάσεις της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης core (Rijnbrand RC και Lemon SM, 2000). Η 5' NTR διαθέτει σύνθετη δευτεροταγή δομή με 4 διακριτές RNA δομές στελέχους-θηλιάς, καθώς και τριτοταγή δομή που περιλαμβάνει ένα ψευδόκομβο.



Εικόνα 13: Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C, όπου φαίνεται αναλυτικότερα η δομή των 5' και 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών.

2.3 Ο κύκλος ζωής του HCV

Η αναπαραγωγή του ιού πραγματοποιείται μέσα από διάφορα στάδια, κυρίως στα ηπατοκύτταρα, όπου εκτιμάται ότι σε οξεία φάση κάθε μολυσμένο με τον ιό κύτταρο μπορεί να παράγει έως και 50 ιικά σωματίδια. Ο ιός επίσης έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται στα μονοπύρρηνα περιφερικά κύτταρα, γεγονός που εξηγεί τις ανοσολογικές διαταραχές σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη HCV (Bartenschlager R και Lohmann V, 2000). Ο ιός HCV κυκλοφορεί στο αίμα συνδεδεμένος με πρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (Low- and Very Low Density Lipoproteins, LDL and VLDL). Τα σύμπλοκα αυτά είναι ετερογενή, με αυτά με τη χαμηλότερη πυκνότητα να είναι τα πλέον μολυσματικά. Οι λιποπρωτεΐνες φαίνεται να έχουν διάφορους ρόλους, όπως η συγκρότηση των σωματιδίων, η είσοδος στα κύτταρα, καθώς και η αποφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα (Rice CM, 2011).

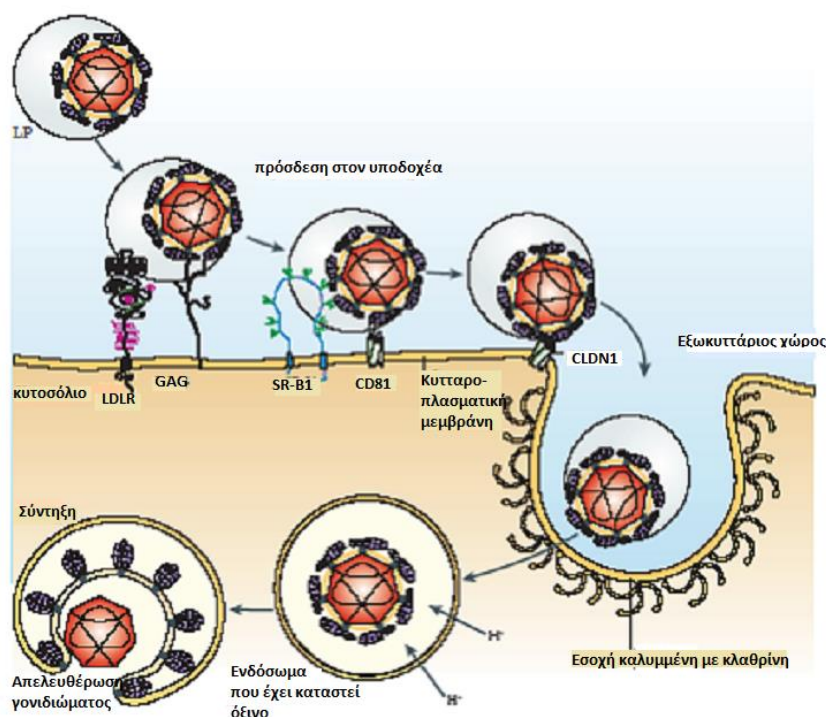


Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C. Ο κύκλος ζωής του HCV είναι όμοιος με αυτό όλων των μελών της οικογένειας Flaviviridae. Αρχικά το ιικό σωματίδιο αλληλεπιδρά με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου (1) και υπόκειται σε ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Μετά από σύντηξη των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου με τη μεμβράνη, το ιικό γονιδίωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται στα ριβοσώματα, παράγοντας μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη (2). Η πολυπρωτεΐνη έπειτα πρωτεολύεται σε 10 ώριμες πρωτεΐνες (3) που συνδέονται σε μια μεμβρανική δομή η οποία μοιάζει με το ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά παράγεται από τον ιό και ονομάζεται μεμβρανώδες δίκτυο (4). Οι ώριμες πρωτεΐνες του HCV αντιγράφουν το γονιδιωματικό RNA μέσω ενός αντιγραφικού ενδιάμεσου μορίου αρνητικής πολικότητας για την παραγωγή απογόνων-θυγατρικών μορίων RNA (5). Ένα μέρος από αυτά τα παραχθέντα μόρια πακετάρεται σε νουκλεοκαψίδια και συνδέονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του HCV, σχηματίζοντας νέα ιικά σωματίδια που εκβλαστώνουν στο κυτταρόπλασμα(6). Τα ιικά σωματίδια τέλος, ακολουθούν το κυτταρικό εκκριτικό μονοπάτι και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο.

Ο φάκελος των ιικών σωματίων είναι πλούσιος σε λιπίδια και περιλαμβάνει τις γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 που περιγράφονται στην παραπάνω ενότητα. Η είσοδος του ιού στο κύτταρο περιλαμβάνει μια σειρά αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν πρόσδεση, είσοδο και σύντηξη (attachment, entry and fusion) . η αρχική επαφή του ιού με τους υποδοχείς του στο κύτταρο πραγματοποιείται πιθανώς μέσω της υπερ-μεταβλητής περιοχής 1 (HVR1) της E2 του HCV, διεργασία η οποία διευκολύνεται από τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης που εκφράζονται στην επιφάνεια των ηπατοκυττάρων (Albecka A et al., 2012, Owen DM et al., 2009). Μετά τη δέσμευση του HCV στους επιφανειακούς παράγοντες, ο HCV εσωτερικεύεται στο κύτταρο με μια pH-εξαρτώμενη ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης (Blanchard E et al., 2006).

Διάφοροι υποδοχείς και επιφανειακοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί, μεταξύ αυτών, ο Scavenger Receptor class B type I, SRBI και το CD81, καθώς και τις πρωτεΐνες claudin-1 (CLDN1) και occludin (OCLN) (Blanchard E et al., 2006). Κάποιοι ακόμη παράγοντες έχουν αναγνωριστεί πιο πρόσφατα, πιο συγκεκριμένα οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs), ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) και ο υποδοχέας εφρίνης A2 (Ephrin Receptor A2, EphA2). Οι δύο πρώτοι επιφανειακοί παράγοντες, SRBI και CD81, φαίνεται να δεσμεύονται με την E2 του HCV (Lupberger J et al. 2011). Η SRBI είναι μια πρωτεΐνη 509 αμινοξέων, με δράση υποδοχέα γλυκοπρωτεϊνών και είναι κύριος υποδοχέας των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoproteins, HDL). Η SRBI παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ και προωθεί την ειδική πρόσληψη των HDL εστέρων χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα (Meredith LW, 2012). Είναι η πρώτη πρωτεΐνη που συμμετέχει στην είσοδο του ιού στα κύτταρα, μέσω σύνδεσής της με την περιοχή HVR1 της E2 του ιού και φαίνεται ότι η είσοδος του HCV στο κύτταρο ενισχύεται από τις HDL (Acton S et al., 1996). Το δεύτερο μόριο στη σειρά είναι το αντιγόνο CD81. Πρόκειται για μέλος της οικογένειας των τετρασπανινών και εκφράζεται σε διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατοκυττάρων και των Β-λεμφοκυττάρων. Συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, μεταξύ αυτών στην προσκόλληση, στη διαφοροποίηση και στον πολλαπλασιασμό. Δομικά, αποτελείται από 4 διαμεμβρανικές επικράτειες, δύο κοντές ενδοκυτταρικές επικράτειες και δύο εξωκυτταρικές επικράτειες- θηλίες, μια μικρή και μια μεγάλη (Meredith LW et al., 2012, Pileri P et al., 1998). Μετά τη δράση της SRBI, το CD81 μέσω της μεγάλης θηλιάς του δεσμεύει τον HCV μέσω της πρωτεΐνης E2. Η αλληλουχία της μεγάλης θηλιάς είναι εξαιρετικά συντηρημένη στον άνθρωπο και στον χιμπατζή, τα μόνα είδη που είναι δεκτικά στον HCV (Petracca R et al., 2000). Ο υποδοχέας των LDL, LDL-R, εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα και δεν αλληλεπιδρά απευθείας με τα ιικά σωματίδια, αλλά με τις LDL του ορού που φέρουν τα ιικά σωματίδια (Rice CM, 2011). Οι CLDN1 και OCLN δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τα σωματίδια HCV, ωστόσο η πρώτη φαίνεται να αλληλεπιδρά με το CD81, ως μέλος του συμπλόκου υποδοχέα του HCV (Harris HJ et al., 2010). Μετά τη δράση των SRBI και CD81, οι δύο αυτές πρωτεΐνες συμβάλλουν στην ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης των ιικών σωματιδίων

(Blanchard E et al., 2006). Στη συνέχεια, δύο υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs) που έχουν αναγνωριστεί πιο πρόσφατα ως επιφανειακοί παράγοντες, οι EGFR και EphA2, συμμετέχουν στην είσοδο του ιού στο κύτταρο μετά την αρχική δέσμευση του ιού από τις CD81 και CLDN1. Έχει βρεθεί επίσης ότι οι δύο αυτές RTKs συμβάλλουν στη μετάδοση του HCV από κύτταρο σε κύτταρο (Lurberger J et al., 2011). Μετά την είσοδο του ιικού σωματιδίου στο κύτταρο, ο φάκελος του ιού συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη με μια εξαρτώμενη από το pH διαδικασία. Συγκεκριμένα, τα ιικά σωματίδια, μετά την ενδοκύττωση μεταφέρονται σε ενδοσώματα. Λόγω του όξινου pH, ο φάκελος συντήκεται με τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων κι έτσι το καψίδιο του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (Hsu et al., 2003).

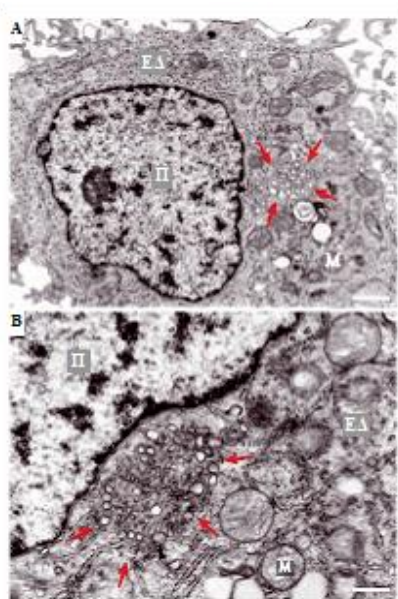


Εικόνα 15: Μοντέλο της εισόδου του ιού της ηπατίτιδας C στο κύτταρο-ξενιστή. Τα κύτταρα κυκλοφορούν στον ορό συνδεδεμένα με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (LP). Η πρόσδεση στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να περιλαμβάνει τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDLR), τις γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG), τον υποδοχέα SR τάξης B τύπου I (SR-BI), την πρωτεΐνη τετρασπανίνη CD81 και την κλαυδίνη (CLDN1). Η τελευταία εμπλέκεται σε όψιμο στάδιο της εισόδου στα κύτταρα. Η είσοδος του ιού μέσα στα κύτταρα πραγματοποιείται με ενδοκύττωση μέσω κλαθρίνης. Στη συνέχεια το ενδόσωμα που φέρει το ιικό σωματίδιο γίνεται όξινο και έτσι επάγεται η σύντηξη των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου με τη μεμβράνη του ενδοσώματος και το γονιδίωμα του ιού απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (Miyagishi Y et al., 2007).

Η πολυπρωτεΐνη του HCV μεταφράζεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, με το HCV RNA θετικής πολικότητας ως μήτρα. Η μετάφραση του γονιδιώματος του HCV, από το οποίο απουσιάζει η 5' καλύπτρα, εξαρτάται από μια «εσωτερική θέση πρόσδεσης ριβοσώματος» (internal ribosome entry site, IRES) εντός της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής (5'-UTR). Η IRES του HCV δεσμεύεται απευθείας και ισχυρά στην υπομονάδα 40S του ριβοσώματος, παρακάμπτοντας τη συμμετοχή προ-εναρκτήριων παραγόντων (Sprahn

CM et al., 2001). Το σύμπλοκο IRES-40S έπειτα στρατολογεί τους ευκαρυωτικούς παράγοντες έναρξης eIF3 (eukaryotic initiation factor 3) και το τριαδικό σύμπλοκο Met-tRNA-eIF2-GTP προς τη δημιουργία ενός μη κανονικού 48S ενδιάμεσου, το οποίο μέσω μιας αργής κινητικής μεταπίπτει στο μεταφραστικά ενεργό σύμπλοκο 80S (Otto GA και Puglisi JD, 2004). Από τη μετάφραση παράγεται μια μεγάλη πολυ-πρωτεΐνη η οποία κόβεται πρωτεολυτικά δημιουργώντας 10 ικές πρωτεΐνες. Το αμινοτελικό τρίτο της πολυ-πρωτεΐνης κωδικοποιεί τις τρεις δομικές πρωτεΐνες: τη βασική καψιδιακή πρωτεΐνη (core (C)) και τις γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2. Μετά τη δομική περιοχή ακολουθεί μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η p7, που λειτουργεί ως ιοντικό κανάλι (Griffin SD et al., 2003). Το υπόλοιπο γονιδίωμα κωδικοποιεί τις μη-δομικές (NS) πρωτεΐνες NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, οι οποίες συντονίζουν τις ενδοκυττάριας διεργασίες του κύκλου ζωής του ιού. Οι δομικές πρωτεΐνες ωριμάζουν μέσω πρωτεόλυσης από πεπτιδάση στις θέσεις C/E1, E1/E2, E2/p7. Στην NS περιοχή, η θέση πέψης από την ίδια πεπτιδάση είναι η p7/NS2. Περαιτέρω πρωτεολυτική διεργασία στην NS περιοχή πραγματοποιείται μέσω δράσης δύο ενζύμων, της NS2 αυτοπρωτεάσης, που κόβει στη θέση NS2/NS3, και της NS3-4A πρωτεάσης σερίνης, που κόβει σε όλες τις θέσεις καθοδικά. Από το γονιδίωμα του HCV τέλος, κωδικοποιείται η πρωτεΐνη F ή ARFP (Alternative Reading Frame Protein), η οποία μπορεί να παραχθεί με μετατόπιση αναγνωστικού πλαισίου στην περιοχή της core (Branch AD et al., 2005).

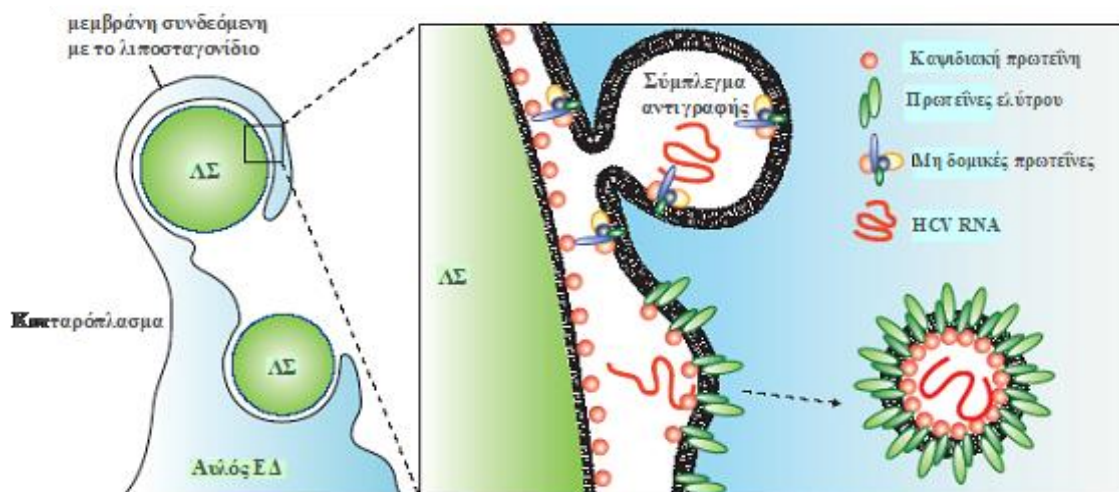
Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες του HCV φαίνεται να συνδέονται με ένα μεμβρανώδες δίκτυο που περιλαμβάνει κυστίδια από διπλή μεμβράνη και μοιάζει με το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα οποία περιβάλλουν τις μη δομικές πρωτεΐνες, το HCV RNA, μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και λιπίδια (Alvisi G et al., 2011). Η δημιουργία αυτού του μεμβρανικού δικτύου φαίνεται να επάγεται από τις NS4A NS5A (Chang WK και Chang KM, 2013).



Εικόνα 16: Σύμπλεγμα αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας C. (Α) Απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε κύτταρα HuH7. Στην παραπυρηνική περιοχή εντοπίζεται μια διακριτή μεμβρανική αλλοίωση που αποτελεί το μεμβρανώδες δίκτυο (τόξα). Η μπάρα αντιστοιχεί σε 1 μm. (Β) Το μεμβρανώδες δίκτυο σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (τόξα), που αποτελείται από μικρά κυστίδια που βρίσκονται εγκλεισμένα σε μεμβρανώδες στρώμα. Το μεμβρανώδες δίκτυο έχει στενή σχέση με το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 500 nm. Το μεμβρανώδες δίκτυο περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες του ιού, καθώς και το νεοσυντιθέμενο RNA του ιού και αντιπροσωπεύει την ενδοκυττάρια θέση της αντιγραφής του HCV. ΕΔ: ενδοπλασματικό δίκτυο. Π: πυρήνας. Μ: μιτοχόνδρια (Moradpour D et al., 2007).

Πιστεύεται ότι η αντιγραφή του RNA πραγματοποιείται σε αυτό το μεμβρανώδες δίκτυο, με το RNA(+) να αποτελεί υπόστρωμα της NS5B RdRp ώστε να παράγει ένα ενδιάμεσο μόριο RNA(-), το οποίο αποτελεί μήτρα για την αναπαραγωγή του γονιδιώματος του HCV. Τα παραχθέντα RNA(+) στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την παραγωγή νέων ιικών πρωτεϊνών, είτε ως μήτρα για την παραγωγή νέων μορίων RNA(+) είτε να πακεταριστούν προς σχηματισμό νέων ιικών σωματιδίων (Lindenbach BD και CM Rice, 2005). Πιστεύεται ότι η σύνθεση των RNA(-) γίνεται απουσία ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers). Η διαδικασία αντιγραφής του γονιδιώματος του HCV είναι επιρρεπής σε λάθη, αφού η NS5B RdRp δε διαθέτει επιδιορθωτική ικανότητα (Drazan KE, 2000). Έχει βρεθεί ότι η αντιγραφή του HCV RNA σχετίζεται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και την κυτταρική μεμβράνη. Συγκεκριμένα σε κυτταροκαλλιέργεια, φαίνεται ότι αύξηση της διαθεσιμότητας των κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων προκαλεί αύξηση της αντιγραφής, ενώ καταστολή προκαλείται από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και από αναστολείς της σύνθεσης λιπαρών οξέων (Karadia SB και Chisari FV, 2005).

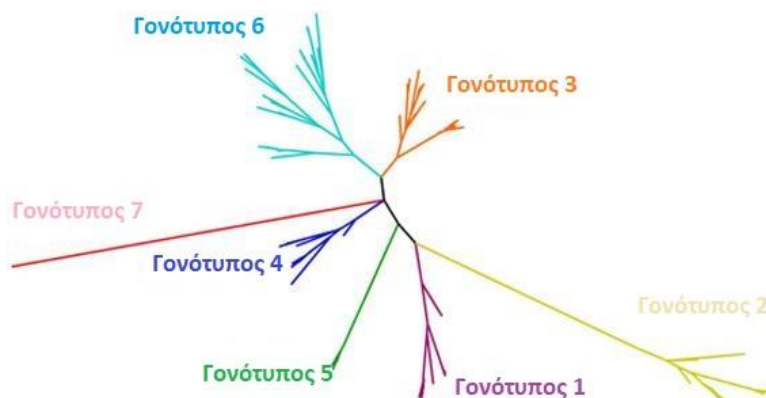
Η διαδικασία της συγκρότησης και της απελευθέρωσης των ιικών σωματιδίων δεν είναι απόλυτα γνωστή, φαίνεται όμως ότι έχει άμεση σχέση με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Η λοίμωξη του κυττάρου με τον HCV προκαλεί στο κύτταρο αλλαγές στην κατανομή των σταγονιδίων λιπιδίων (lipid droplets, LDs), με τα τελευταία να συγκεντρώνονται στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα, μαζί με τις πρωτεΐνες και το γονιδίωμα του HCV (Popescu CI et al., 2011). Κλειδί για τη διαδικασία της συναρμολόγησης είναι η πρωτεΐνη core, καθώς από μελέτες φαίνεται ότι με παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης της core με τα LDs, δεν παράγονται μολυσματικά σωματίδια (Boulant S et al., 2008). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η NS5A πιστεύεται ότι μεταφέρει το γονιδίωμα του HCV στην core και η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται στην επιφάνεια των λιπιδίων ή στο σημείο επαφής των λιπιδίων με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Λόγω των ιδιοτήτων της core το νουκλεοκαψίδιο που περικλείει το RNA τελικά περικλείεται από μια λιπιδική μονοστιβάδα, κι έτσι του επιτρέπεται η είσοδος στο εσωτερικό των λιπιδίων και των λιπο-ιικών σωματιδίων (Cristofari G et al., 2004). Το μονοπάτι έκκρισης των συναρμολογημένων σωματιδίων σχετίζεται άμεσα με το μονοπάτι των VLDL. Το ιικό σωματίδιο έχει τέτοια λιπιδική σύνθεση που μοιάζει με τις VLDL και LDL συνδεδεμένες με τις ApoE και ApoB (Gastaminza P et al., 2008). Έτσι, ο HCV χρησιμοποιώντας τον εκκριτικό αυτό μηχανισμό του κυττάρου, απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εκκριτικών κυστιδίων και επομένως η απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από το κύτταρο δεν απαιτεί τη λύση του κυττάρου, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τη χρονιότητα της νόσου (Takacs CN et al., 2017).



Εικόνα 17: Μοντέλο της παραγωγής μολυσματικού HCV. Η συγκρότηση του ιού λαμβάνει χώρα γύρω από τα λιποσωματίδια. Η ωρίμανση του ιικού σωματιδίου πραγματοποιείται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η συσσωμολόγηση πραγματοποιείται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου. Το σύμπλοκο αντιγραφής προσεγγίζει το λιποσταγονίδιο μέσω δράσης των core και NS5A με αποτέλεσμα τη μεταφορά του νεοσυντιθέμενου ιικού RNA από το σύμπλοκο αντιγραφής (RC) στα λιποσταγονίδια, τη σύνδεση του με την καψιδιακή πρωτεΐνη και την ενκαψιδίωση του στο νουκλεοκαψίδιο. Έπειτα προστίθεται ο ιικός φάκελος και σε αυτόν ενσωματώνονται οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, τα εκκολαπτόμενα ιικά σωματίδια συνδέονται με (ανώριμες λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (pre-VLDLs, που παράγονται από την αρχική λιπιδίωση της λιποπρωτεΐνης ApoB από τη πρωτεΐνη μεταφοράς μικροσωμικών τριγλυκεριδίων, MTP), με λιποσταγονίδια που βρίσκονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς και με άλλα συστατικά των λιποπρωτεϊνών, όπως apoE για την παραγωγή λιπο-ιικών σωματιδίων (Moradpour D et al., 2007).

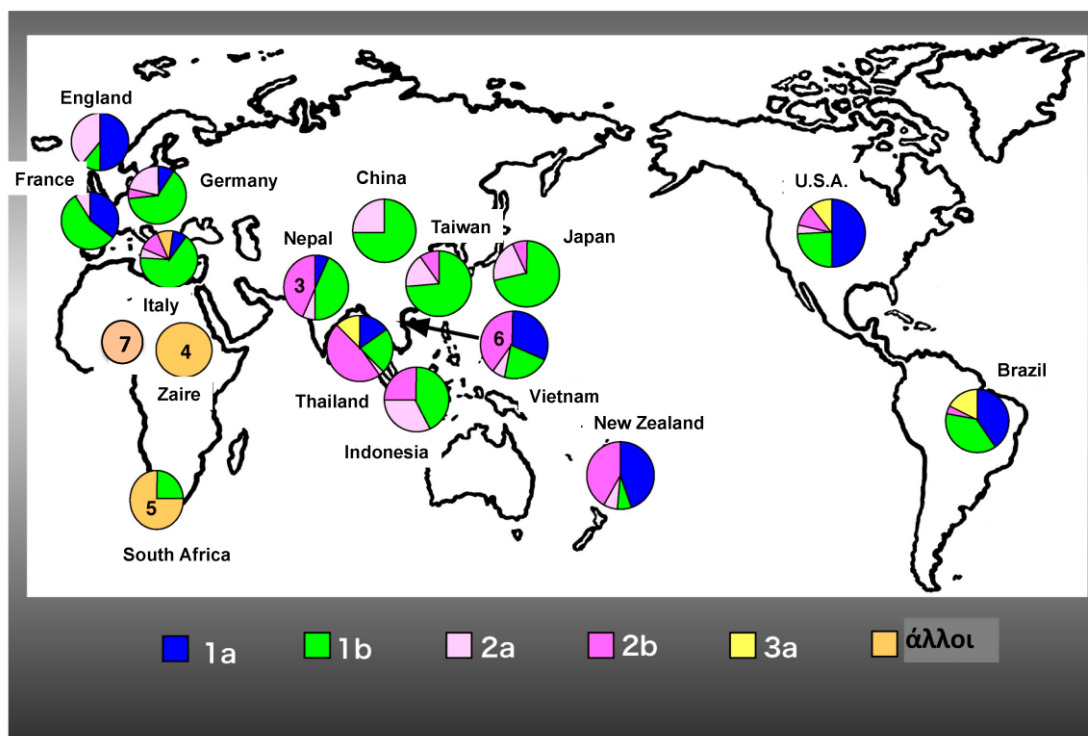
2.4 Γονότυποι

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, δεν υπάρχει προφυλακτική μέθοδος έναντι του ιού και δεν έχει αναπτυχθεί ακόμη κάποιο εμβόλιο. Αυτό οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι ο ιός παρουσιάζει μεγάλη γενετική ποικιλιότητα, που οδηγεί στο διαχωρισμό των στελεχών του HCV με βάση τις γενετικές διαφορές τους, σε επτά γονότυπους (1-7) και πάνω από 100 υπότυπους (a, b etc) (Nakano T et al., 2012). Οι διαφορετικοί γονότυποι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το γονιδίωμα τους 30-35%, ωστόσο η κατανομή τους δεν είναι ομοιόμορφη. Μεγαλύτερη συντηρητικότητα παρουσιάζουν οι NTRs και η περιοχή της core, ενώ οι HVRs της E2 παρουσιάζουν μεταβλητότητα έως και 80 % μεταξύ των γονοτύπων (Kato N et al., 1992). Επίσης διαφορές παρατηρούνται και στο μέγεθος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (open reading frame, ORF) (Walewski JL et al., 2002). Αυτή η μεγάλη ποικιλομορφία εξηγεί την ειδική για κάθε γονότυπο χυμική και κυτταρική ανοσιακή απόκριση και κατά επέκταση τη χαμηλή ανοσία σε διασταυρούμενους γονότυπους (cross-genotype immunity) (Thimme R et al., 2012).



Εικόνα 18: Φυλογενετικό δέντρο των 7 γονοτύπων και όλων των γνωστών υποτύπων του ιού της ηπατίτιδας C (Yusim K et al., 2005).

Από τους γονότυπους, ο 1 παρουσιάζει παγκόσμια εξάπλωση, προκαλώντας το 70% των περιστατικών, και ακολουθούν οι 2 και 3, με 20% και 1% των περιστατικών αντίστοιχα. Οι γονότυποι 4-7 περιορίζονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, με ποσοστό περιστατικών 1% έκαστος (Cornberg M et al., 2011).



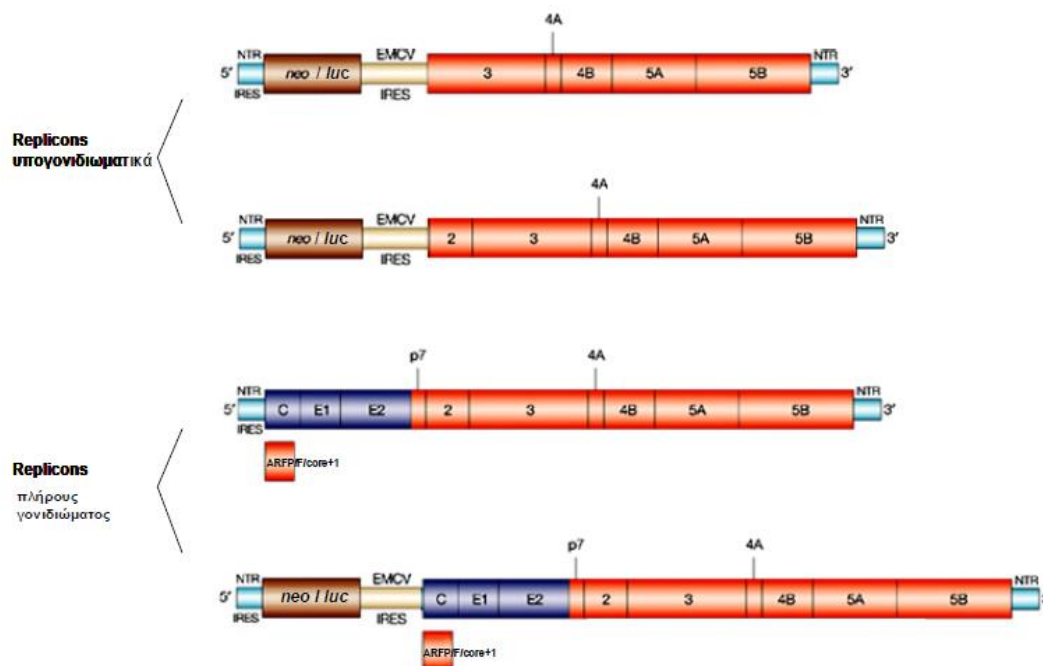
Εικόνα 19: Γεωγραφική κατανομή των γονοτύπων του ιού της ηπατίτιδας C.

2.5 Συστήματα μελέτης του HCV

Έως και πολλά χρόνια μετά την ανακάλυψη του ιού της ηπατίτιδας C, δεν υπήρχε κάποιο επαρκές σύστημα κυτταροκαλλιέργειας για τη μελέτη του ιού, όπως επίσης και κάποιο κατάλληλο μικρό πειραματόζωο που να μπορεί να μολυνθεί από τον ιό. Ως εκ τούτου, η κατανόηση του κύκλου ζωής του ιού, καθώς και η ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων είχε καθυστερήσει αρκετά.

Οι πρώτες προσπάθειες δημιουργίας συστήματος που να παράγει ικανοποιητικούς τίτλους ιού, περιελάμβαναν πρωτογενείς καλλιέργειες ή αθανатоποιημένα κύτταρα, τα οποία μολύνονταν με ορούς ασθενών και επιμόλυνση κυτταροκαλλιεργειών είτε με το RNA του ιού που παράγεται *in vitro* ή με DNA το οποίο με μεταγραφή δίνει το ιικό RNA, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες προερχόμενες από ιστούς ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV. Όλες αυτές οι προσπάθειες απέβησαν άκαρπες, αφού η μέγιστη απόδοση σε ιικό RNA ήταν ίση με μόλις ένα αντίγραφο RNA ανά 100 κύτταρα (Bartenschlager R και Lohmann V, 2001).

Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί τρεις κατηγορίες συστημάτων κυτταροκαλλιεργειών για τη μελέτη του HCV. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα ρεπλικόνια (replicons), που περιέχουν ολόκληρο το HCV γονιδίωμα, καθώς και τα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια, που περιλαμβάνουν τμήμα αυτού. Πρόκειται για συνθετικά αυτοαντιγραφόμενα μόρια RNA, τα οποία αποτελούνται από την 5' NTR, ένα γονίδιο επιλογής, όπως η firefly λουσιφεράση (παροδικά ρεπλικόνια) ή το γονίδιο φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης (σταθερά ρεπλικόνια) (Gosert R et al., 2003), μια IRES προερχόμενη από άλλο ιό, που να επιτρέπει τη μετάφραση της περιοχής των μη δομικών πρωτεϊνών (NS3-NS5B) που ακολουθούν οι δομικές) και τέλος την 3' NTR. Ουσιαστικά εκλείπει η περιοχή των δομικών πρωτεϊνών (core-NS2). Με τη βοήθεια του γονιδίου επιλογής μπορούμε να απομονώσουμε κυτταρικούς κλώνους οι οποίοι παρουσιάζουν σταθερά υψηλά επίπεδα αντιγραφής του HCV RNA, τα οποία αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη της αντιγραφής (Lohmann V et al., 1999). Έπειτα ακολούθησαν μελέτες οι οποίες οδήγησαν σε σημαντικές βελτιώσεις του μοντέλου, μέσω της αναγνώρισης μεταλλάξεων που ενισχύουν την αντιγραφή (Lohmann et al., 2001). Παρόλο που τα ρεπλικόνια βοήθησαν σημαντικά στη μελέτη της αντιγραφής και στην ανάπτυξη φαρμάκων, το μοντέλο αυτό παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα, ότι μας δίνει πληροφορίες μόνο για τις ενδοκυττάρειες διεργασίες του κύκλου ζωής του ιού (Kato et al., 2003).



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση των ρεπλικονίων. Τα ρεπλικόνια είναι συνθετικά αυτοαντιγραφόμενα μόρια HCV RNA, τα οποία περιέχουν ολόκληρο (κάτω) ή μέρος του γενετικού υλικού του ιού της ηπατίτιδας C (επάνω, υπογονιδιωματικά). Τα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια περιλαμβάνουν τις μη δομικές πρωτεΐνες, όχι όμως και τις δομικές, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται αντιγραφή του HCV RNA, αλλά όχι και παραγωγή μολυσματικών σωματιδίων. Τόσο τα πλήρη όσο και τα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια φέρουν μετά το IRES κάποιο γονίδιο επιλογής, όπως της firefly λουσιφεράσης ή της αντοχής στη νεομυκίνη.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τα HCV ψευδοσωματίδια (HCV pseudoparticles, HCVpp). Τα ψευδοσωματίδια αυτά περιέχουν ένα ρετροϊκό γονιδίωμα, το οποίο εκφράζει επίσης σε ικανοποιητικά επίπεδα μια πρωτεΐνη αναφοράς. Τα ψευδοσωματίδια περιέχουν φάκελο, επομένως μπορούν να μιμηθούν τη διαδικασία της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Το σύστημα αυτό έχει συμβάλει σε πειράματα εξουδετέρωσης του HCV από αντισώματα, στη μελέτη των πρωτεϊνών E1 και E2 και στο χαρακτηρισμό των υποδοχέων του HCV. Ωστόσο σαν εργαλείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για μελέτη στα πολύ πρώιμα στάδια του κύκλου ζωής του ιού (Bartosch B και Dubuisson J, 2010).

Το πιο πρόσφατο μοντέλο μελέτης περιλαμβάνει τον πλήρη κύκλο αντιγραφής του HCV σε καρκινικές ηπατοκυτταρικές σειρές, μετά την κλωνοποίηση ενός συγκεκριμένου στελέχους HCV από έναν Ιάπωνα ασθενή με ηπατίτιδα, το οποίο ονομάστηκε JFH1 (Kato T et al., 2003). Αυτό που χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο κλώνο είναι ότι μπορεί και πολλαπλασιάζεται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα χωρίς να απαιτεί την ύπαρξη ενισχυτικών μεταλλάξεων. Ο JFH1 μπορεί να εισαχθεί σε ηπατικές κυτταρικές σειρές και αυτό οδηγεί στην παραγωγή HCV σωματιδίων τα οποία είναι μολυσματικά τόσο σε κυτταροσειρές όσο και *in vivo* (Bartenschlager R et al., 2013).

Κεφάλαιο 3. Επιγενετικές τροποποιήσεις

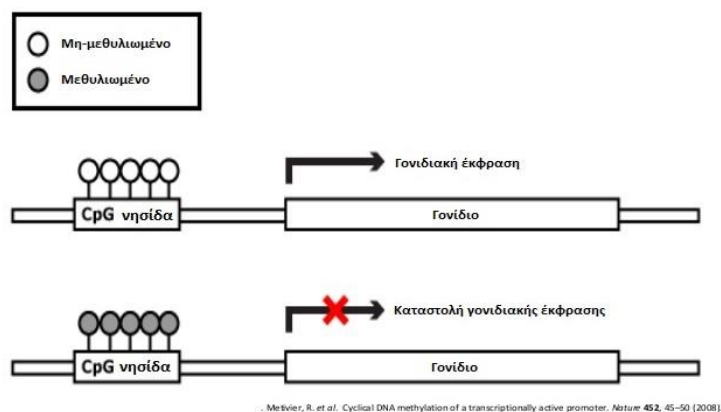
Η επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στη διατήρηση της ταυτότητας του κυττάρου αλλά και στην ανταπόκριση σε ερεθίσματα από το περιβάλλον (Feil R και Fraga MF, 2011). Ο όρος περιλαμβάνει τη μελέτη όλων των κληρονομήσιμων αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, που όμως δεν οφείλονται σε αλλαγή της αλληλουχίας του DNA. Μετά το πρόγραμμα αλληλούχησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project, HGP) άνοιξαν καινούριοι δρόμοι στη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών και στην ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής (Vender JC et al., 2001). Παρόλα αυτά, φαίνεται πως η γνώση της αλληλουχίας ενός γονιδίου δεν είναι αρκετή. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και αυτό καθιστά τη μελέτη των επιγενετικών ρυθμίσεων απαραίτητη για την κατανόηση πολλών διεργασιών τόσο σε κυτταρικό όσο και σε συστημικό επίπεδο.

Ωστόσο, η επιγενετική δεν αποτελεί καινούριο πεδίο. Ήδη από τη δεκαετία του 1980 έχουν μελετηθεί φάρμακα τα οποία επηρεάζουν επιγενετικούς μηχανισμούς με σκοπό τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, ιδιαίτερα των καρκίνων (Jones PA 1985). Τέτοιου είδους φάρμακα περιέχουν αναστολείς τροποποιήσεων των ιστονών, αναστολείς της μεθυλίωσης του DNA, καθώς και μικρά μόρια που στοχεύουν τις πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Press D, 2010). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που έχουν αναγνωριστεί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών, δηλαδή η μεθυλίωση, η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η κιτρουλινίωση, η σουμοϋλίωση, η ADP-ριβοσυλίωση και η ουβικιτινυλίωση σε κατάλοιπα των ουρών των ιστονών και η ύπαρξη μικρο-RNAs (miRNAs).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες και οι πρωτεΐνες που τροποποιούν τις ιστόνες έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κατάστασης του κυττάρου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αλλά και στη διατήρηση του μεταγραφικού προφίλ του κυττάρου. Μετά τη δέσμευσή τους στο DNA, οι μεταγραφικοί παράγοντες προσελκύουν και άλλα σύμπλοκα πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και τροποποιητές ιστονών, όπως μεθυλοτρανσφεράσες και ακετυλοτρανσφεράσες, κι έτσι διευκολύνεται ή αποτρέπει η μεταγραφή. Η μεθυλίωση είναι μια τέτοια τροποποίηση, η οποία αποτελεί την προσθήκη μεθυλομάδας σε κατάλοιπα αργινίνης ή/και λυσίνης. Σε αντίθεση με την ακετυλίωση, δηλαδή την προσθήκη ακετυλομάδας, η οποία μειώνει το θετικό φορτίο των ιστονών χαλαρώνοντας τη σύνδεσή του με το αρνητικά φορτισμένο DNA, η μεθυλίωση δεν αλλάζει το φορτίο, αλλά δημιουργεί νέες θέσεις σύνδεσης για αναγνώριση και σύνδεση των «πρωτεϊνών ανάγνωσης» (reader proteins) (Kouzarides T, 2007).

3.1 Η μεθυλίωση του DNA

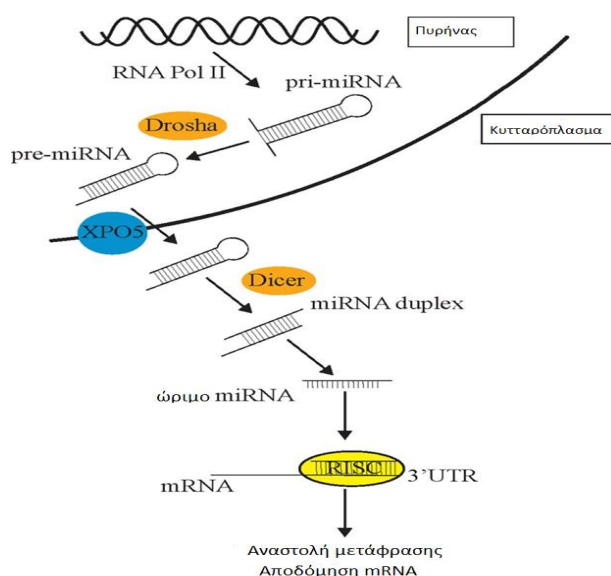
Η πιο καλά μελετημένη επιγενετική τροποποίηση είναι η μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση του DNA στα φυσιολογικά κύτταρα συμβαίνει σε περιοχές μεταξύ των γονιδίων, συνήθως σε νησίδες CpG, οι οποίες υπάρχουν διάσπαρτες στο γονιδίωμα και στους υποκινητές του 76% των γονιδίων των θηλαστικών (Goll MG και Bestor TH, 2005). Το πρότυπο DNA μεθυλίωσης δημιουργείται και διατηρείται από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs). Για παράδειγμα, κατά την αντιγραφή του DNA, προκειμένου να διατηρηθεί το πρότυπο μεθυλίωσης, το ένζυμο UHRF1 αναγνωρίζει τις ημιμεθυλιωμένες θέσεις και επάγει την DNMT1. Η τελευταία με τη σειρά της μεθυλιώνει τον νεοσυντιθέμενο κλώνο του DNA (Sharif J et al., 2007). Επίσης, κατά την εμβρυογένεση η *de novo* δημιουργία του προτύπου μεθυλίωσης πραγματοποιείται από τις DNMT3A και DNMT3B (Subramaniam D et al., 2014). Υπερμεθυλίωση στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της έκφρασης και αυτό μπορεί να αποτελεί αίτιο καρκινογένεσης (Jones PA και Baylin SB, 2002). Πιστεύεται ότι η μεθυλομάδα που προστίθεται στον υποκινητή του γονιδίου έχει την ικανότητα να δεσμεύει άλλες πρωτεΐνες κι έτσι σχηματίζεται ένα σύμπλοκο το οποίο εμποδίζει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή κι έτσι αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου (Esteller M, 2007). Η μεθυλίωση ωστόσο δεν αποτελεί μια μη αναστρέψιμη διαδικασία. Η απομεθυλίωση αναφέρθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1980 (Feinberg AP και Vogelstein B, 1983). Η απομεθυλίωση του DNA συμβαίνει νωρίς κατά την καρκινογένεση, και όταν αυτή συμβαίνει σε περιοχές επαναλαμβανόμενου DNA, μπορεί να προκληθεί χρωμοσωμική αστάθεια (Costa FF et al., 2006). Μπορεί να συμβεί παθητικά, για παράδειγμα όταν οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες αποτυγχάνουν να επανεγκαθιδρύσουν το πλήρες πρότυπο μεθυλίωσης μετά από αντιγραφή του DNA και διαίρεση του κυττάρου. Επίσης υπάρχει η ενεργητική απομεθυλίωση, που καταλύεται από τις DNA απομεθυλάσες και λαμβάνει χώρα σε ολόκληρο το γονιδίωμα όταν πρόκειται για αρχέγονα βλαστικά κύτταρα και για πρώιμα έμβρυα και σε συγκεκριμένες περιοχές όταν πρόκειται για σωματικά κύτταρα (Feng S et al., 2010).



Εικόνα 21: Μεθυλίωση του DNA. η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται με προσθήκη μεθυλομάδας με τη δράση μεθυλοτρανσφερασών σε νησίδες CpG που υπάρχουν διάσπαρτες στο γονιδίωμα και στους υποκινητές του 76% των γονιδίων των θηλαστικών. Έτσι, όταν συμβεί μεθυλίωση στον υποκινητή ενός γονιδίου, δημιουργείται ένα σύμπλοκο το οποίο δεν επιτρέπει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων και επομένως καταστέλλεται η γονιδιακή έκφραση.

3.2 Τα miRNAs

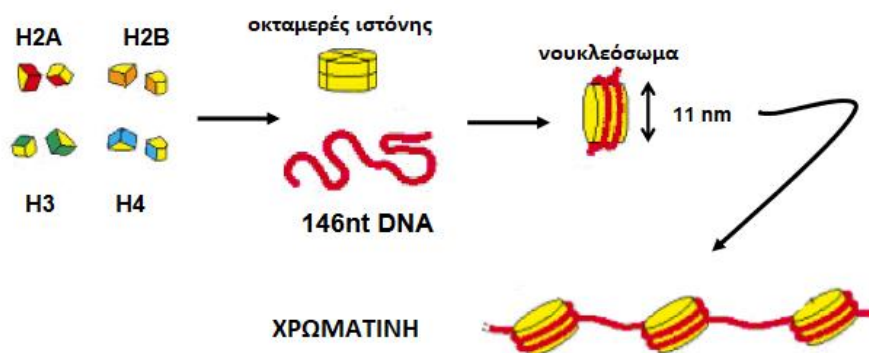
Τα miRNAs είναι μικρά μόρια RNA τα οποία προέρχονται από τη μεταγραφή του DNA, αλλά δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (non-coding RNAs). Τα miRNAs είναι μερικώς συμπληρωματικά προς τα αγγελιοφόρα RNAs (mRNAs) που παράγονται από τη μεταγραφή γονιδίων. Το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) χρησιμοποιεί το miRNA ως υπόστρωμα για να αναγνωρίσει τα συμπληρωματικά mRNAs. Στη συνέχεια μια πρωτεΐνη του συμπλόκου, η Argonaut, κόβει το mRNA προκαλώντας αποσιώπηση του γονιδίου (RNA interference, RNAi) (Pillai RS et al., 2007).



Εικόνα 22: Η δράση των miRNAs. Τα miRNAs μεταγράφονται από το γονιδιωματικό DNA και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μετά την έξοδό τους από τον πυρήνα αναγνωρίζονται από την Dicer και γίνονται μονόκλωνα. Στη συνέχεια υβριδίζονται με το συμπληρωματικό τους αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Το διμερές αυτό αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο RISC, το οποίο το αποδομεί και έτσι δε μεταφράζεται το mRNA και δεν εκφράζεται το γονίδιο.

3.3 Οι τροποποιήσεις των ιστώνων

Οι ιστόνες είναι μια οικογένεια μικρών, θετικά φορτισμένων πρωτεϊνών και είναι οι H1, H2A, H2B, H3 και H4 (Van Holde KE et al., 2074). Το DNA προκειμένου να πακεταριστεί μέσα στον πυρήνα του κυττάρου, δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες αυτές, τη χρωματίνη, μονάδες της οποίας είναι τα νουκλεοσώματα. Ένα νουκλεόσωμα αποτελείται από ένα ετεροτετραμερές (H3-H4)₂, συνδεδεμένο με δύο διμερή (H2A-H2B) (Davey CA et al., 2002, Kelley RI 1973). Γύρω από το οκταμερές των ιστώνων τυλίγονται περίπου 146 bp DNA. Μεταξύ των νουκλεοσωμάτων υπάρχει συνδετικό DNA και η σύνδεσή τους εξασφαλίζεται από τη συνδετική ιστόνη H1 (Olins AL και Olins DE, 1074). Η τελική δομή μοιάζει με «κομπολόι με χάντρες».

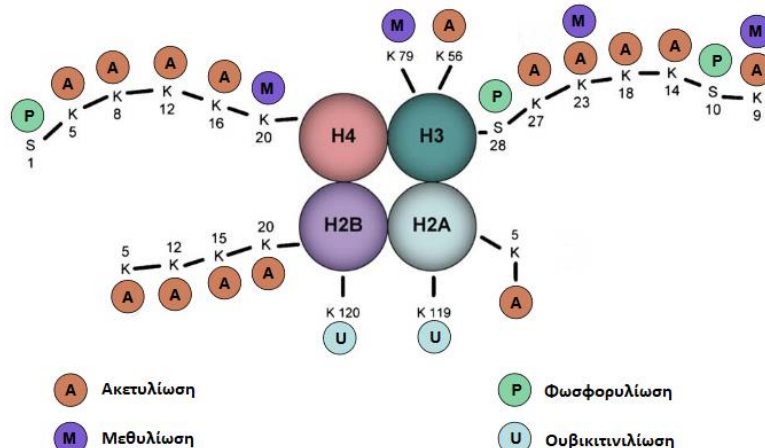


Εικόνα 23: Απεικόνιση της κατώτερης δομής της χρωματίνης. Το οκταμερές των ιστώνων αποτελείται από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4, οι οποίες σχηματίζουν ένα πυρήνα γύρω από τον οποίο τυλίγεται το DNA σε μήκος περίπου 146 νουκλεοτίδια. Αποτέλεσμα είναι το DNA να παίρνει τη μορφολογία ενός «κομπολογιού με χάντρες».

Η εκάστοτε δομική κατάσταση της χρωματίνης ρυθμίζει τόσο την αντιγραφή του DNA όσο και την έκφραση των γονιδίων. Οι πυρηνικές ιστόνες διαθέτουν μια σφαιρική επικράτεια η οποία συνεισφέρει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των ιστώνων που σχηματίζουν το οκταμερές. Επίσης διαθέτουν δύο ουρές οι οποίες προεκβάλλουν από τη σφαιρική επικράτεια, μια N-τελική ουρά, μήκους 20-35 καταλοίπων που είναι πλούσια σε βασικά αμινοξέα και μια κοντύτερη C-τελική ουρά, η οποία είναι προσβάσιμη σε πρωτεάσες (Kornberg RD και Lorch Y, 1999). Πρόκειται για επιγενετικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων χωρίς να αλλάξουν την αλληλουχία του DNA. Πολλές φορές, η δομική κατάσταση της χρωματίνης ρυθμίζεται ιστοειδικά, καθιστώντας συγκεκριμένες περιοχές του DNA προσβάσιμες σε μεταγραφικούς παράγοντες σε συγκεκριμένη χρονική περίοδο.



Εικόνα 24: Απεικόνιση δομής της χρωματίνης κατά τη μεσόφαση. Στην εικόνα απεικονίζεται ένας μεσοφασικός πυρήνας στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όπου διακρίνεται η δομή της χρωματίνης τόσο στη χαλαρή, μεταγραφικά ενεργή δομή της, την ευχρωματίνη (E), όσο και στη συμπαγή, μεταγραφικά ανενεργή δομή της, την ετεροχρωματίνη (H). Η ετεροχρωματίνη είναι τόσο συμπαγής που καθιστά την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων σχεδόν αδύνατη, γι' αυτό και είναι μεταγραφικά ανενεργή. Η μπάρα αντιστοιχεί σε 2 μm. E: Ευχρωματίνη. H: Ετεροχρωματίνη. Nu: πυρηνίσκος. M: Μιτοχόνδριο. ER: Ενδοπλασματικό δίκτυο.



Εικόνα 25: Τροποποιήσεις των ιστονών. Οι ιστόνες (H2A, H2B, H3, H4) διαθέτουν ουρές οι οποίες προεκβάλλουν από το νουκλεόσωμα και τα κατάλοιπά τους αποτελούν στόχο για διάφορα ένζυμα, τα οποία είναι ικανά με αυτό τον τρόπο να τροποποιούν το πακετάρισμα του DNA και κατ' επέκταση να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων.

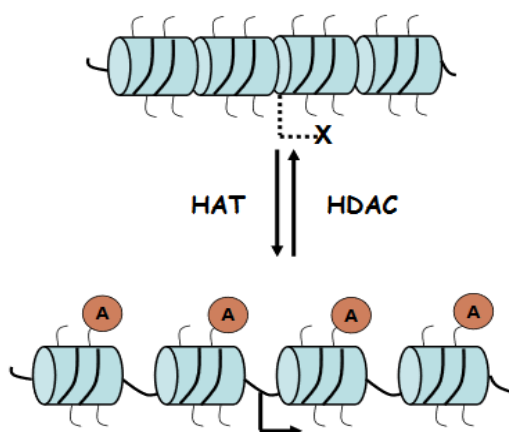
Οι δύο καλύτερα μελετημένες τροποποιήσεις των ιστονών είναι η ακετυλίωση και η μεθυλίωση και αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

3.4 Ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών

Η ακετυλίωση είναι η αντίδραση που βασίζεται στην προσθήκη μιας ακετυλικής ομάδας σε μια χημική ένωση. Η ακετυλιωμένη μορφή των ιστονών παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Alfrey το 1964 (Fraga MF et al., 2005). Η ακετυλίωση της λυσίνης καταλύεται από δύο τύπους ακετυλοτρανσφερασών ιστονών (histone acetyltransferases, HATs), οι οποίες για τη δράση τους απαιτούν την παρουσία ακετυλο-CoA (Fraga MF et al., 2005). Η τροποποίηση αυτή των ιστονών είναι αναστρέψιμη, μέσω της δράσης των

αποακετυλασών των ιστονών (histone deacetylases, HDACs) (Loidl P, 1994). Τόσο οι ακετυλοτρανσφεράσες όσο και οι αποακετυλάσες είναι μέλη μεγάλων πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων και οι δράσεις τους *in vivo* βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία (Lee KK και Workman JL, 2007, Walkinshaw DR et al., 2008).

Πιστεύεται ότι η ακετυλίωση της λυσίνης εξουδετερώνει το θετικό φορτίο των ουρών των ιστονών, ελαττώνοντας έτσι τη δέσμευσή του με το αρνητικά φορτισμένο DNA ή/και την αλληλεπίδραση μεταξύ των ιστονών (Ekwall K, 2005). Έτσι προκύπτει μια πιο χαλαρή διαμόρφωση χρωματίνης, που επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση στο DNA σε διάφορες πρωτεΐνες, όπως μεταγραφικούς παράγοντες. Αντίθετα αποτελέσματα προκύπτουν με την αποακετυλίωση, με την οποία προκύπτει μια πιο συμπυκνωμένη, μεταγραφικά ανενεργή χρωματίνη, καθώς δεν υπάρχει χώρος μεταξύ των νουκλεοσωμάτων ώστε να αλληλεπιδράσουν οι μεταγραφικοί παράγοντες με το DNA.



Εικόνα 26: Ακετυλίωση των ιστονών. Η ακετυλίωση των ιστονών από τις ακετυλοτρανσφεράσες διευκολύνει τη χαλάρωση της δομής της χρωματίνης, ευνοώντας την έκφραση των γονιδίων. Η ακετυλίωση είναι αναστρέψιμη διαδικασία, με την απομάκρυνση των ακετυλομάδων (αποακετυλίωση) από τα ένζυμα ακετυλοτρανσφεράσες, και η χρωματίνη αποκτά μια πιο συμπαγή, ανενεργή μεταγραφικά δομή.

Η μεθυλίωση είναι μια ομοιοπολική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που συχνά συμβαίνει σε καρβοξυλικές ομάδες του γλουταμινικού, της λευκίνης και της ισοπρενυλιωμένης κυστεΐνης, καθώς και στα άτομα αζώτου της λυσίνης, της ιστιδίνης και της αργινίνης (Norton VG et al., 1989). Στις ιστόνες η μεθυλίωση συμβαίνει στα άτομα αζώτου της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης και της αργινίνης. Οι πιο μεθυλιωμένες ιστόνες είναι η H3 και η H4 (Young zoon Kim, 2014). Η αργινίνη μπορεί να είναι μονο- ή δι-μεθυλιωμένη, με τη δεύτερη να βρίσκεται σε συμμετρική ή σε ασύμμετρη διαμόρφωση. Οι PRMTs (protein arginine methyltransferases) είναι τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση της αργινίνης (Murray K, 1964). Υπάρχουν διάφορες μελέτες που υποστηρίζουν ότι πολλές PRMTs, όπως η PRMT5, καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην καταστολή του καρκίνου (Weiss VH et al., 2000).

Όπως η αργινίνη, έτσι και η λυσίνη μπορεί να είναι μονο- ή δι-μεθυλιωμένη. Κάποια κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών H3 και H4 μπορεί να αποτελούν υπόστρωμα τόσο για μεθυλίωση όσο και για ακετυλίωση. Τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση της λυσίνης χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις ειδικές για λυσίνη μεθυλοτρανσφεράσες (histone methyltransferases, HMTs) που διαθέτουν επικράτεια SET (Suvar3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax) και η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τις HMTs που δε διαθέτουν την SET επικράτεια (Pal S et al., 2004). Τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης της λυσίνης ποικίλλουν σημαντικά. Ανάλογα με το κατάλοιπο της λυσίνης, η μεθυλίωση μπορεί να προκαλέσει είτε συμπύκνωση είτε χαλάρωση της δομής της χρωματίνης (Feng Q et al., 2002). Για παράδειγμα, μεθυλίωση των H3K9, H3K27 και H4K20 κυρίως επάγει το σχηματισμό της ετεροχρωματίνης. Αντιθέτως, μεθυλίωση των H3K4, H3K36 και H3K79 σχετίζεται με το σχηματισμό ευχρωματίνης (Zhou VW et al., 2011).

3.5 Οι απομεθυλάσες των ιστονών

Για πολλά χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι η μεθυλίωση των ιστονών είναι μια διαδικασία μη αναστρέψιμη. Μετά την ανακάλυψη της πρώτης απομεθυλάσης, της LSD1 (lysine-specific demethylase 1), φαίνεται πως η μεθυλίωση των ιστονών βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία, η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων και για τη διαφοροποίηση, ενώ διατάραξη της ισορροπίας συχνά οδηγεί σε καρκίνο (Hamamoto R et al., 2015, Santos-Rosa H et al., 2009).

Μέχρι σήμερα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων HUGO (www.genenames.org), έχουν αναγνωριστεί 21 απομεθυλάσες ιστονών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι 19 από αυτές ανήκουν στην οικογένεια διοξυγενασών που διαθέτουν επικράτεια jumonji, ενώ οι άλλες δύο, η LSD-1 και η LSD-2, αποτελούν τα δύο μοναδικά μέλη της οικογένειας των φλαβινο-εξαρτώμενων αμινοοξειδασών, οι οποίες για τη δράση τους απαιτούν την παρουσία του φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (flavin adenine dinucleotide, FAD) (Hojfeldt JW et al., 2013).

Κεφάλαιο 4. Η πρωτεΐνη LSD1

Η πρωτεΐνη LSD1 (Lysine-specific demethylase 1, επίσης KDM1A, AOF2, BHC110, KIA0601), είναι ένα πυρηνικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση μεθυλομάδων από ιστονικά και μη ιστονικά κατάλοιπα λυσίνης, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση μορίων που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, μεταξύ αυτών και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, υπερέκφραση της LSD1 έχει εντοπιστεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συγκεκριμένα του ήπατος, του στομάχου, του στήθους, της

ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα και του εντέρου. Για τους παραπάνω λόγους, παρεμπόδιση της δράσης της LSD1 έχει προταθεί ως αντικαρκινική θεραπεία (Kononov S και Garcia-Bassets I, 2013).

4.1 Γενικά στοιχεία της LSD1

Η LSD1 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 92903 Da και συνολικού μήκους 852 αμινοξέων. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στη θέση p36.12 (1p36.12). Αποτελείται από 21 εξόνια και έχει συνολικό μήκος 3107 bp. Με τη χρήση της RT-PCR, έχει βρεθεί ότι έκφραση της πρωτεΐνης υπάρχει σχεδόν σε όλους τους ιστούς, με μεγαλύτερη έκφραση στους όρχεις και στους νεφρούς και σχεδόν μηδενική έκφραση στο σπλήνα και στο πάγκρεας (Nagase T et al., 1998).

4.2 Στόχοι της LSD1

Σε γενικές γραμμές, η μεθυλίωση στην H3K4 συνδέεται με τη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη, ενώ η μεθυλίωση στις H3K9 ή/και H3K27 συνδέεται με τη μεταγραφικά ανενεργή ετεροχρωματίνη. Η κατάσταση αυτή ελέγχεται δυναμικά από εξειδικευμένες μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες όπως η LSD1 (Zhou VW et al., 2011).

Η LSD1 έχει εντοπιστεί σε διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που προκαλούν καταστολή της μεταγραφής, όπως το CoREST και το NuRD (Shi Y et al., 2003). Επιπλέον, έχει δείχθει ότι μπορεί και να επάγει την έκφραση γονιδίων, όπως για παράδειγμα τα γονίδια των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών. Πράγματι, η αλληλεπίδραση της LSD1 με τους πυρηνικούς υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων φαίνεται να αλλάζει την ειδικότητα της LSD1, από H3K4me1/me2 σε H3K9me1/me2 (Garcia-Bassets I et al., 2007). Επίσης, πιο πρόσφατα, η LSD1 αναγνωρίστηκε ως συστατικό του συμπλόκου ELL, του οποίου δράση είναι η παράταση της μεταγραφής, καθώς και του συμπλόκου MLL, το οποίο περιλαμβάνει συστατικά που προκαλούν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή (Biswas D et al., 2008, Nakamura T et al., 2010). Τέλος, συνυπάρχουσες επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως αποακετυλίωση ή φωσφορυλίωση, μπορεί να επηρεάσουν τη δράση της LSD1. Για παράδειγμα, ακετυλίωση της H3K9 ή φωσφορυλίωση της H3S10 μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη δράση απομεθυλίωσης της H3K4 της LSD1 (Cohen I et al., 2011).

Παράλληλα, υπάρχουν και μη ιστονικά υποστρώματα για απομεθυλίωση από την LSD1. Ένας τέτοιος στόχος είναι το διμεθυλιωμένο κατάλοιπο K370 της πρωτεΐνης p53, αλλάζοντας έτσι τη δράση του. Η τροποποίηση αυτή είναι σημαντική, διότι μόνο η διμεθυλιωμένη και όχι η μονομεθυλιωμένη p53 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον συμπαράγοντά της, 53BP1 (Scoumanne A και Chen X, 2007). Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η LSD1 συμμετέχει ενεργά στο μονοπάτι απόκρισης σε βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR) μέσω της ρύθμισης της p53, εμποδίζοντας έτσι την απόπτωση (Kontaki H και Talianidis I, 2010). Άλλος

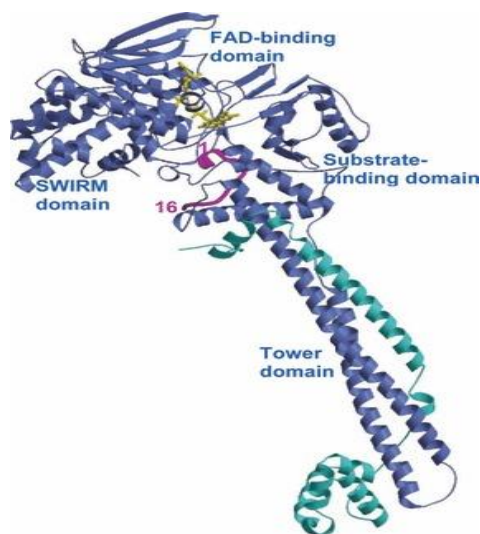
ένας μη ιστονικός στόχος για την LSD1 είναι η DNMT1, το κυριότερο ένζυμο στη διατήρηση της DNA μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA. Έτσι η LSD1, εκτός από την απευθείας επίδρασή της στη δομή της χρωματίνης, μπορεί επίσης να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων μέσω επίδρασής της σε μη ιστονικά υποστρώματα (Wang J et al., 2009).

4.3 Η δομή της LSD1

Κρυσταλλική απεικόνιση της LSD-1 δείχνει ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις επικράτειες. Αρχικά διαθέτει μια N-τελική επικράτεια, τη SWIRM (Swi3p, Rsc8p και Moira), η οποία είναι μοναδική στις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη (Aravind L και Iyer LM, 2002). Ακολουθεί μια ενδιάμεση επικράτεια πύργου (Tower domain), η οποία αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της LSD-1, και τέλος μια C-τελική επικράτεια με δράση αμινοοξειδάσης (AO domain), η οποία υπάρχει σε διάφορα άλλα μεταβολικά ένζυμα (Culhane JC και Cole PA, 2007, Shi Y et al., 2004) και από την οποία προεκβάλλει η επικράτεια Tower. Οι επικράτειες SWIRM και AO αλληλεπιδρούν προς σχηματισμό της καταλυτικής δομής, η οποία δεσμεύει το FAD μη ομοιοπολικά, ενώ η επικράτεια Tower αποτελεί επιφάνεια για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως η coREST (Amente S et al., 2013).



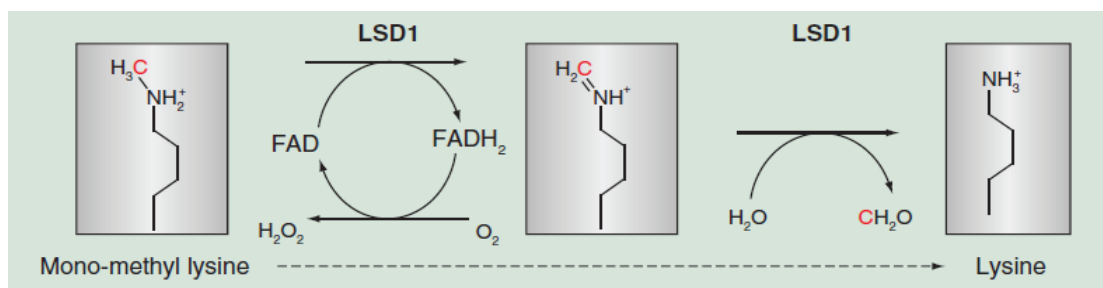
Εικόνα 27: Πρωτοταγής δομή της LSD1. Η LSD1 αποτελείται από 852 αμινοξέα, τα οποία περιλαμβάνουν 3 επικράτειες, τη SWIRM κοντά στο αμινοτελικό άκρο, η οποία αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη και είναι κοινή μεταξύ των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη, την AOD, η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο και έχει δράση αμινοοξειδάσης και η Tower, η οποία προεκβάλλει από την AOD και μέσω αυτής η LSD1 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες.



Εικόνα 28: Κρυσταλλική δομή της LSD1.

4.4 Η ενζυμική λειτουργία της LSD1

Η ενζυμική δραστηριότητα της LSD1 περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Shi και την ομάδα του το 2004, όπου βρέθηκε ότι απομεθυλιώνει την μόνο- ή δι-μεθυλιωμένη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (H3K4me1/me2), αλλά όχι και την τριμεθυλιωμένη H3K4 ή την μεθυλιωμένη H3K9 (Shi Y et al., 2004). Η καταλυτική δραστηριότητα της LSD1 βρίσκεται στην ΑΟ επικράτεια και εξαρτάται από τον συμπαράγοντα FAD. Η αντίδραση περιλαμβάνει την κατά βήμα μετατροπή της μεθυλιωμένης λυσίνης σε ένα κατιόν ιμινίου μέσω αφαίρεσης ενός ανιόντος υδριδίου από το οξειδωμένο FAD. Το κατιόν στη συνέχεια υδρολύεται και προκύπτει μια καρβυνολαμίνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται σε φορμαλδεΐδη και στο απομεθυλιωμένο κατάλοιπο. Το ανηγμένο FAD οξειδώνεται και πάλι ταχύτατα από το μοριακό οξυγόνο. Από την αντίδραση αυτή προκύπτει υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξειδωμένο FAD. Ο μηχανισμός της απομεθυλίωσης βασίζεται σε ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων που βρίσκεται στο πλευρικό άτομο αζώτου της λυσίνης. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί γιατί η LSD1 μπορεί να απομεθυλιώνει μονο- και δι-μεθυλιωμένη, αλλά όχι τριμεθυλιωμένη λυσίνη (Culhane JC και Cole PA, 2007, Maiques-Diaz A, 2016).



Εικόνα 29: Ενζυμική δράση της LSD1. Η καταλυτική δραστηριότητα της LSD1 βρίσκεται στην ΑΟD επικράτεια και εξαρτάται από τον συμπαράγοντα FAD. Η αντίδραση περιλαμβάνει την κατά βήμα μετατροπή της μεθυλιωμένης λυσίνης σε ένα κατιόν ιμινίου μέσω αφαίρεσης ενός ανιόντος υδριδίου από το οξειδωμένο FAD. Το κατιόν στη συνέχεια υδρολύεται και προκύπτει μια καρβυνολαμίνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται σε φορμαλδεΐδη και στο απομεθυλιωμένο κατάλοιπο. Το ανηγμένο FAD οξειδώνεται και πάλι ταχύτατα από το μοριακό οξυγόνο. Από την αντίδραση αυτή προκύπτει υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξειδωμένο FAD. Ο μηχανισμός της απομεθυλίωσης βασίζεται σε ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων που βρίσκεται στο πλευρικό άτομο αζώτου της λυσίνης. (Culhane JC και Cole PA, 2007).

Η ΑΟ επικράτεια έχει δύο λοβούς. Ο ένας σχηματίζει μια μη ομοιοπολική θέση δέσμευσης FAD και ο άλλος λοβός σχηματίζει μια θέση αναγνώρισης και δέσμευσης του υποστρώματος. Η υποεπικράτεια δέσμευσης του FAD παρουσιάζει εξαιρετική ομοιότητα με αυτές άλλων αμινοοξειδασών, αλλά η υποεπικράτεια δέσμευσης του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή άλλων μελών και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά όχι μόνο με το στόχο του αλλά και με τα γειτονικά κατάλοιπα. Συγκεκριμένα, για να εξασφαλιστεί η ικανότητα απομεθυλάσης, απαιτούνται τουλάχιστον 16 αμινοξικά κατάλοιπα της ουράς της H3 ιστόνης (Forneris F et al., 2005). Το άκρο της ΑΟ επικράτειας αποτελείται από αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα, τα οποία πιθανώς εξασφαλίζουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της LSD1 και του

ποστρώματος. Επίσης, ανάμεσα στις επικράτειες SWIRM και AO υπάρχει μια μεγάλη επιφανειακή σχισμή, η οποία πιθανώς προσφέρει επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα υποστρώματα (Maïques-Díaz A, 2016).

Η χαρακτηριστική επικράτεια της LSD1, Tower, προέρχεται από την καταλυτική περιοχή, επομένως πιστεύεται ότι η δέσμευση άλλων πρωτεϊνών προκαλεί αλλοστερική ρύθμιση στην κατάλυση ή στην αναγνώριση υποστρώματος (Yong Chen et al., 2006). Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της Tower επικράτειας με τη SANT2, είναι απαραίτητη για την ικανότητα απομεθυλίωσης της LSD1, πιθανότατα μέσω της αλληλεπίδρασης της τελευταίας με το νουκλεοσωμικό DNA (Yang M et al., 2006).

Η επικράτεια SWIRM της LSD1 δεν έχει τη δυνατότητα δέσμευσης στο DNA, όπως συμβαίνει με άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν τέτοια επικράτεια. Αντιθέτως, συμβάλλει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, διατηρώντας τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης. (Yoneyama M et al., 2007). Η επικράτεια αυτή είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της LSD1 με τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Η σύνδεση αυτή επάγει την αλλαγή της ειδικότητας υποστρώματος της LSD1, από την H3K4 στην H3K9 (Metzger E et al., 2005). Μελέτες μεταλλαξιγένεσης έχουν δείξει ότι η ικανότητα απομεθυλίωσης της LSD1 εξαρτάται από πολλά κατάλοιπα στην καταλυτική περιοχή και στη διεπαφή των SWIRM και AO. Επίσης, υπάρχουν μεταλλάξεις στο υπόστρωμα που υποβαθμίζουν την ικανότητα της απομεθυλίωσης από την πρωτεΐνη (Stavropoulos et al., 2006, Yang M et al., 2007). Επίσης, επιγενετικές τροποποιήσεις επίσης επηρεάζουν την ικανότητα μεθυλίωσης της H3K4. Για παράδειγμα, τα υπερακετυλιωμένα νουκλεοσώματα είναι λιγότερο επιρρεπή στην απομεθυλίωση από την LSD1 σε σχέση με τα υποακετυλιωμένα νουκλεοσώματα (Shi YJY et al., 2005).

Τέλος, πέρα από την ιστόνη H3, η LSD1 έχει βρεθεί ότι απομεθυλώνει τις TP53, E2F1 και DNMT ρυθμίζοντας της δράση, τη σταθερότητα ή τη δραστηριότητά τους. Παραδόξως, δεν υπάρχει ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ ιστονικών και μη ιστονικών υποστρωμάτων, πιθανώς λόγω του ρόλου των συνεργιστικών πρωτεϊνών στη διαδικασία της απομεθυλίωσης (Huang J et al., 2007, Kontaki H και Talianidis I, 2010, Wang J et al., 2009).

Δεδομένης της σημασίας της LSD1 στον καρκίνο και σε άλλες ασθένειες, μελετήθηκαν και αναπτύχθηκαν διάφορες ουσίες, υποψήφιες ως αναστολείς της LSD1. Το πρώτο μόριο που βρέθηκε να αναστέλλει την LSD1 είναι το tranilcypromine (trans-2-phenylcyclopropylamine), η οποία απενεργοποιεί την LSD1 μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης του συμπαραγόντα FAD (Schmidt DMZ και McCafferty DG, 2007).

Φαίνεται ότι η LSD1 συμπλοκοποιείται με άλλα μόρια προκειμένου να δράσει. Τα κυριότερα αυτών είναι οι αποακετυλάσες HDAC1/2, η CoREST και η BHC80, οι οποίες έχει τη δυνατότητα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Οι HDACs δρουν ανοδικά των CoREST/LSD1, δημιουργώντας μια υποακετυλιωμένη χρωματίνη, η οποία αναγνωρίζεται ευκολότερα από το CoREST/LSD1. Η CoREST έχει διττό ρόλο. Αφενός

αποτελεί γέφυρα που ενώνει την LSD1 με το ιστονικό της υπόστρωμα, αφετέρου βοηθά στη σταθερότητα της LSD1. Είναι γεγονός πως απουσία της CoREST, η LSD1 είναι περισσότερο ευαίσθητη σε πρωτεοσωμική αποικοδόμηση *in vivo*. Τέλος, η BHC80 παρεμποδίζει τη δράση απομεθυλίωσης της LSD1 και πιθανώς αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της δράσης της (Shi YJ et al., 2005).

4.5 Ο βιολογικός ρόλος της LSD1

Η LSD1 είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για τα θηλαστικά και τον άνθρωπο και έχουν αναφερθεί διάφοροι ρόλοι της. Αρχικά, έχει παρατηρηθεί ότι τόσο η πρωτεΐνη όσο και το RNA παρουσιάζουν υψηλή έκφραση σε ανθρώπινα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα, η οποία σταδιακά κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης μειώνεται, δείχνοντας ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη. Αργότερα, παρατηρήθηκε ότι σε καλλιέργειες εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, η LSD1 παίζει ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των κυττάρων αυτών ελέγχοντας τα επίπεδα μεθυλίωσης της H3K4, καταστέλλοντας έτσι διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες (Adamo A et al., 2011). Η LSD1 συμμετέχει επίσης στο πρώτο στάδιο αιμοποίησης, ελέγχοντας το σχηματισμό αιμαγγειοβλαστών (των προγονικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται τόσο τα αιμοποιητικά όσο και τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα) και τη δημιουργία των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (Takeuchi MM et al., 2015).

Η LSD1 είναι σημαντικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των νευρικών βλαστικών κυττάρων και της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος (Sun G et al., 2010). Έχουν αναγνωριστεί τρεις *de novo* παραλλαγές της LSD1 σε παιδιά με διανοητικά προβλήματα. Και στις τρεις περιπτώσεις οι μεταλλάξεις βρίσκονται στην επικράτεια AO αλλά σε διαφορετική θέση και ως τώρα η λειτουργία τους είναι άγνωστη (Chong JX et al., 2016).

Ιστοειδική αποσιώπηση της LSD1 έδειξε τη σημασία της πρωτεΐνης για τη διαφοροποίηση των κυττάρων της πρόσθιας υπόφυσης, για τη σωστή λειτουργία των ωοκυττάρων και για τη σωστή λειτουργία του μυελού των οστών (Maïques-Díaz A, 2016). Συγκεκριμένα, η υπό συνθήκες απαλοιφής της LSD1 σε ενήλικο μυελό των οστών οδηγεί σε ραγδαία μείωση της αιμοποίησης (Kerenyi MA et al., 2013). Σε γενικές γραμμές, πειράματα αποσιώπησης τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, επιβεβαιώνουν ότι από την LSD1 εξαρτάται η φυσιολογική κοκκιοποίηση, ερυθροποίηση και θρομβοποίηση (Saleque S et al., 2007).

Τέλος, άλλες δράσεις της LSD1 είναι η απόκριση σε βλάβη του DNA (DNA damage response, DDR), η ρύθμιση του κερκάδιου κύκλου και η καταστολή του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και της οξειδωσης των λιπιδίων προς δαπάνη ενέργειας στα λιποκύτταρα και στα καρκινικά ηπατοκύτταρα (Sakamoto A et al., 2015).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, διαπιστώνουμε ότι η LSD1 παίζει κρίσιμο ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη και αυτός είναι ο λόγος που τυχόν δυσλειτουργία της σχετίζεται με διάφορες καταστάσεις, όπως καρκίνο, νευροεκφυλιστικές νόσους, φλεγμονή, καρδιαγγειακά νοσήματα και ιικές λοιμώξεις.

Στόχος

Διάφορες έρευνες δείχνουν ότι η LSD1 διαθέτει ενεργό ρόλο σε πολλές ιικές διεργασίες όπως ιική λοίμωξη, έκφραση ικών πρωτεϊνών, καθώς και μετάβαση στη λανθάνουσα κατάσταση. Οι ιοί με σκοπό να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιούν εξ ολοκλήρου τον επιγενετικό μηχανισμό των κυττάρων-ξενιστών (Man RJ et al., 2016).

Υπάρχουν διάφορες ενδείξεις ότι η απομεθυλάση λυσίνης Lysine-specific Demethylase 1 (LSD1), πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του ήπατος, μπορεί να επηρεάζεται από τη μόλυνση από τον HCV καθώς και να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό του, παρόλο που κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί μέχρι σήμερα. Η πρωτεΐνη LSD1 (Lysine-specific demethylase 1, επίσης KDM1A, AOF2, BHC110, KIA0601), είναι ένα πυρηνικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση μεθυλομάδων από ιστονικά και μη ιστονικά κατάλοιπα λυσίνης, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση μορίων που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Έχει σπουδαίο βιολογικό ρόλο, καθώς συμμετέχει στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού, στην απόκριση σε βλάβες του DNA, σε ρύθμιση του κυκλικού ρυθμού και άλλα πολλά. Μεταξύ των άλλων συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, υπερέκφραση της LSD1 έχει εντοπιστεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, συγκεκριμένα του ήπατος, του στομάχου, του στήθους, της ουροδόχου κύστης, του πνεύμονα και του εντέρου. Για τους παραπάνω λόγους, παρεμπόδιση της δράσης της LSD1 έχει προταθεί ως αντικαρκινική θεραπεία (Kononov S και Garcia-Bassets I, 2013). Δεν υπάρχουν πολλές ενδείξεις που να συσχετίζουν την LSD1 με την ηπατική καρκινογένεση, ωστόσο υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης που οφείλονται στη δράση της LSD1 σχετίζονται με μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων του μεταβολισμού της ενέργειας (Hino S et al., 2012, Pan D et al., 2013). Επίσης η LSD1 υπερεκφράζεται σε ιστούς HKK και τα επίπεδα έκφρασής της είναι ευθέως ανάλογα με το στάδιο του όγκου (Zhao Z et al., 2013).

Παρότι δεν έχουν βρεθεί μηχανισμοί οι οποίοι να συσχετίζουν άμεσα τον HCV με την LSD1, πιστεύουμε ότι ο HCV ιός επηρεάζει έμμεσα την LSD1 αλληλεπιδρώντας με μόρια τα οποία σχετίζονται με την LSD1, όπως η πρωτεϊνική κινάση CK2, ή η αποακετυλάση SIRT1. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι:

- 1) Η κατασκευή πλασμιδιακού φορέα που να φέρει το γονίδιο της LSD1 και να είναι ικανό να μολύνει κύτταρα με σκοπό την έκφρασή της
- 2) Η κατασκευή κυτταροσειρών που να υπερεκφράζουν σταθερά την LSD1.

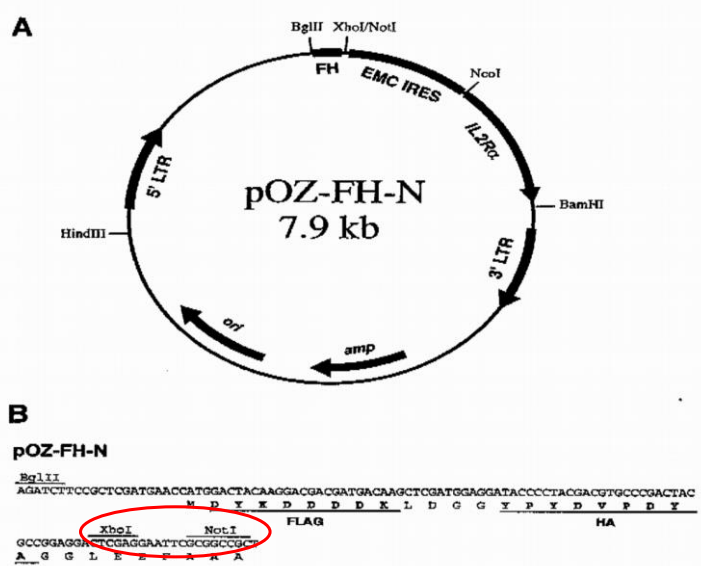
Οι δύο παραπάνω στόχοι αποσκοπούν στον ανώτερο σκοπό μας που είναι ο εξής:

- 3) Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης LSD1 κατά την *in vitro* μόλυνση ηπατοκυττάρων με τον HCV ιό, καθώς και της κινητικής του πολλαπλασιασμού του HCV στα ηπατοκύτταρα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση του γονιδίου της LSD1

Για τους σκοπούς της πειραματικής μας διαδικασίας, παραλάβαμε το πλασμίδιο που φέρει την γονιδιακή αλληλουχία της LSD1 από τους Shi *et al* (Shi YJ *et al.*, 2005) σε χαρτί Whatman, μαζί με έναν περιοριστικό χάρτη. Το γονίδιο LSD1 ήταν ενσωματωμένο σε ένα ρετροϊκό φορέα κλωνοποίησης το pOZ-N-Flag-HA-N. Για την ανάκτηση του DNA τοποθετήθηκε το Whatman που το περιείχε σε μια μικρή ποσότητα TE (Tris-EDTA) buffer Ph=8.0 για μισή ώρα μέσα σε ένα πλαστικό σωληνάριο, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, απομακρύνουμε τα υπολείμματα του Whatman με μια γρήγορη φυγοκέντρηση και αποθηκεύσαμε το υπερκείμενο στο οποίο βρισκόταν το πλασμιδιακό υλικό.



Εικόνα 30: Το πλασμίδιο pOZ-FH-N που φέρει το γονίδιο LSD1. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα, ενώ τονίζεται η περιοχή όπου δρουν τα δύο ένζυμα, XhoI και NotI, πέπτοντας και δημιουργώντας τα κατάλληλα άκρα (Shi YJ *et al.*, 2005).

2.2 Πέψη DNA και δημιουργία κατάλληλων άκρων

Τα περιοριστικά ένζυμα ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, που έχουν τη δυνατότητα να διασπούν το DNA σε ειδικές αλληλουχίες τις οποίες αναγνωρίζουν. Φυσιολογικός ρόλος τους είναι η προστασία των βακτηρίων από άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1965 από τον Werner, ο οποίος αργότερα, το 1978, τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ (Arber W, 1965). Σήμερα έχουν αναγνωρισθεί περισσότερες από 4000 περιοριστικές

ενδονουκλεάσες και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία, μεταξύ αυτών η δημιουργία βιβλιοθηκών και η κλωνοποίηση τμημάτων σε φορείς (Roberts RJ et al., 2015).

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτελούν πολύ χρήσιμα εργαλεία στη σημερινή έρευνα. Για τη χρήση τους είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ακριβώς την αλληλουχία αναγνώρισης, καθώς και τις συνθήκες στις οποίες η δράση τους είναι μέγιστη.

Υλικά:

- DNA προς πέψη
- Ένζυμα περιορισμού XhoI, NotI, BamHI της New England Biolabs (πίνακας 1)
- Buffer Cutsmart της New England Biolabs
- WFI (water for injection)
- Υδατόλουτρο
- Χρονόμετρο

Ένζυμα περιορισμού	Αλληλουχία περιορισμού	Εταιρία	Ενεργότητα
XhoI-HF (High fidelity)	5'...C [↓] TCGAG...3' 3'...GAGCT [↓] C...5'	New England Biolabs	20U/μl
NotI-HF	5'...GC [↓] GGCCGC...3' 3'...CGCCGG [↓] CG...5'	New England Biolabs	20U/μl
BamHI	5'...G [↓] GATCC...3' 3'...CCTAG [↓] G...5'	New England Biolabs	20U/μl

Πίνακας 2: Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην πέψη μαζί με τις αλληλουχίες αναγνώρισης.

Σύσταση του Cutsmart 1X:

- 10 mM οξικό μαγνήσιο
- 50 mM οξικό κάλιο
- 20 mM Tris-οξικό
- 100 μg/ml αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin, BSA)

pH 7.9, 25°C

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά, ελέγξαμε το πλασμίδιο με περιοριστικά ένζυμα, με βάση τον χάρτη περιορισμού, τόσο του pOZ-FH-N, όσο και του γονιδίου LSD1. Για να το πετύχουμε αυτό, πραγματοποιήσαμε δύο πέψεις. Στην πρώτη χρησιμοποιήσαμε δύο περιοριστικά ένζυμα που αναγνωρίζουν αλληλουχίες που βρίσκονται έξω από τα όρια του LSD1. Τα ένζυμα αυτά επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να αναγνωρίσουν αλληλουχίες που υπάρχουν επίσης στον φορέα κλωνοποίησης όπου θα ενσωματώσουμε το LSD1, όπως θα περιγραφεί παρακάτω. Η δεύτερη αντίδραση πέψης περιελάμβανε ένα περιοριστικό ένζυμο, το οποίο αναγνωρίζει αλληλουχία η οποία υπάρχει μέσα στο LSD1 αλλά όχι και στον φορέα, κι έτσι να διαπιστωθεί η παρουσία του γονιδίου. Στη μία αντίδραση πέψης χρησιμοποιήσαμε τα ένζυμα XhoI και NotI και στη δεύτερη αντίδραση το ένζυμο BamHI. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε για πέψη 2 μg DNA φαίνονται στον πίνακα παρακάτω. Η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37°C στο υδατόλουτρο, για τέσσερις ώρες.

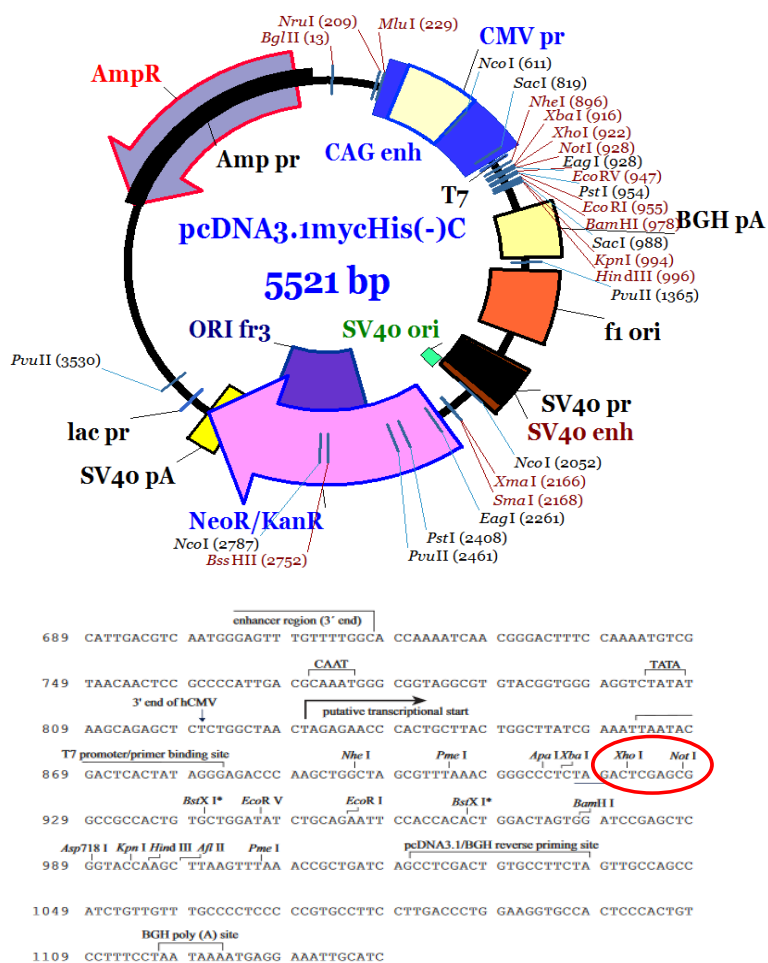
(μL)	XhoI(20U/μl)+NotI(20U/μl)	BamHI(20U/μl)	Uncut
DNA	3	3	3
10X διάλυμα CutSmart	3	3	3
Ένζυμο	0,5 + 0,5	0,5	-
H₂O	23	23,5	24
Σύνολο	30	30	30

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις πέψεις.

Στο πείραμά μας προχωρήσαμε στην ενζυμική πέψη δύο μορίων:

A) του pOZ-N-Flag-HA-LSD1, με σκοπό την απομόνωση ολόκληρου του γονιδίου LSD1 και

B) ενός φορέα κλωνοποίησης στον οποίο θα εισάγουμε το LSD1, το pcDNA3.1mycHis(-)C, με σκοπό να γίνει μονόκλωνο και παράλληλα τα άκρα του να ταιριάζουν με τα άκρα που θα δημιουργηθούν από την πέψη του A.



Εικόνα 31: Χάρτης περιορισμού του φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C. Στον χάρτη απεικονίζονται οι θέσεις δράσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών, καθώς και οι υποκινητές που περιλαμβάνει, όπως αυτός του CMV, και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η περιοχή κλωνοποίησης του πλασμιδιακού φορέα, ενώ τονίζεται η περιοχή όπου δρουν τα δύο ένζυμα, XhoI και NotI, πέπτοντας και δημιουργώντας τα κατάλληλα άκρα.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε δύο ένζυμα, τα οποία να βρίσκονται και στους δύο φορείς και με τον ίδιο προσανατολισμό. Επίσης στο A θα πρέπει να βρίσκονται ανοδικά και καθοδικά του LSD1, καθώς και έξω από τα όριά του, ώστε να απομονωθεί ολόκληρο. Τέλος, είναι ιδιαίτερα χρήσιμο τα δύο ένζυμα να έχουν μέγιστο δράσης στο ίδιο διάλυμα, έτσι ώστε να δράσουν ταυτόχρονα στο υπόστρωμα. Εναλλακτικά, σε περίπτωση που δε δρουν στο ίδιο διάλυμα, προχωρούμε σε διαδοχικές αντιδράσεις πέψης.

Τα δύο ένζυμα που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια φαίνεται να είναι τα XhoI και NotI.

Α) Πέψη του pOZ-N-Flag-HA-LSD1: πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης του με σκοπό την εξαγωγή του LSD1 από αυτό και τη μετέπειτα απομόνωσή του. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων υπολογίστηκαν για 50 μg DNA και φαίνονται στον πίνακα 4. Η πέψη πραγματοποιήθηκε για τέσσερις ώρες στους 37°C στο υδατόλουτρο.

(μL)	pOZ-N-Flag-HA-LSD1
DNA	75
10X διάλυμα CutSmart	50
XhoI(20U/μl) + NotI(20U/μl)	5 + 5
H₂O	370
Σύνολο	500

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pOZ-FH-N-LSD1 με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI

B) Πέψη του pcDNA3.1mycHis(-)C: πραγματοποιήθηκε αντίδραση πέψης του με σκοπό να το κάνουμε γραμμικό, καθώς και να ταιριάζουν τα άκρα του με αυτά του LSD1 της προηγούμενης αντίδρασης, ώστε να είναι συμβατά. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων υπολογίστηκαν για 10 μg DNA και φαίνονται στον πίνακα 5.

(μL)	pcDNA3.1mycHis(-)C
DNA	10
10X διάλυμα CutSmart	20
XhoI(20U/μl) + NotI(20U/μl)	2 + 2
H₂O	166
Σύνολο	200

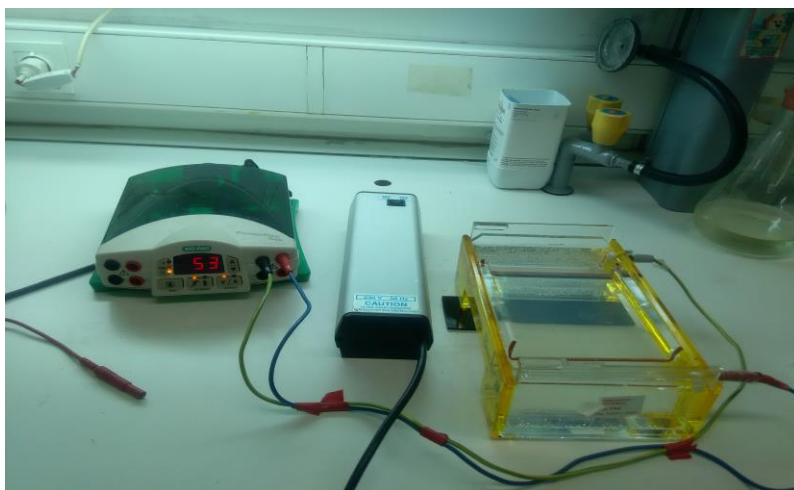
Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pcDNAmycHis(-)C

2.3 Ηλεκτροφόρηση

Από πολύ παλιά γίνονταν προσπάθειες για το διαχωρισμό του DNA. Πριν την ανακάλυψη της ηλεκτροφόρησης, ο διαχωρισμός του γενετικού υλικού γινόταν με φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση σουκρόζης, τεχνική η οποία δεν έδειχνε με ακρίβεια το μέγεθος των τμημάτων DNA. Σήμερα η ηλεκτροφόρηση αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο διαχωρισμού γενετικού υλικού.

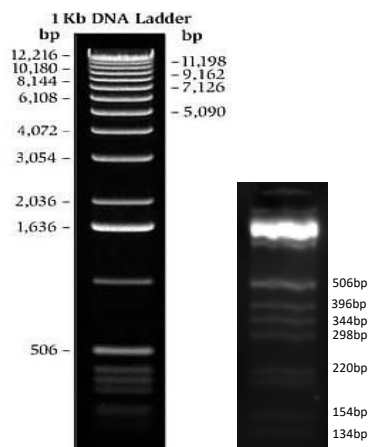
Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, σχετικά γρήγορη και απλή. Αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτωμάτων ή διαλυμάτων. Στην ηλεκτροφόρηση συνήθως χρησιμοποιούνται πηκτώματα (gel) αгарόζης ή πολυακρυλαμίδης, τα οποία είναι πορώδη πολυμερή, των οποίων οι πόροι έχουν μέγεθος ανάλογο της συγκέντρωσης και των ιδιοτήτων του μονομερούς.

Τόσο το DNA όσο και το RNA, λόγω των φωσφορικών τους ομάδων, διαθέτουν ένα αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα όταν αυτά υποβληθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, να μετακινηθούν προς τον θετικά φορτισμένο πόλο (άνοδο). Ωστόσο, όταν τα μόρια αναγκαστούν να μετακινηθούν στο εσωτερικό ενός πορώδους υλικού, θα συναντήσουν κάποια αντίσταση. Κατά αυτό τον τρόπο, θα υπάρχει διαχωρισμός των μορίων, με τα μικρότερα και με την πιο απλή δευτεροταγή δομή μόρια να μετακινούνται γρηγορότερα μέσα σε πήκτωμα σε σχέση με πιο μεγάλα μόρια ή μόρια με πιο σύνθετη δομή. Γενικά οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα με την οποία θα μετακινείται ένα μόριο DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι το μέγεθος και η δομή του μορίου, η συγκέντρωση και ο τύπος του πηκτώματος, η τάση του ρεύματος που εφαρμόζεται, το buffer της ηλεκτροφόρησης και χρωστικές όπως το βρωμιούχο αιθίδιο. Σημαντικό στάδιο αποτελεί η χρώση των διαχωρισθέντων κλασμάτων, με πιο συχνή χρησιμοποιούμενη χρώση το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο φθορίζει όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδες φως (Lee PY et al., 2012). Στην εικόνα 32 απεικονίζεται μια συσκευή ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 32: Στα δεξιά της εικόνας φαίνεται η συσκευή της ηλεκτροφόρησης που περιέχει μέσα πηκτή αгарόζης, δεξιά η συσκευή εφαρμογής πεδίου και στη μέση μια φορητή λάμπα UV.

Στις ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήσαμε κατά την κλωνοποίηση, κατά τις οποίες εξετάσαμε μεγαλύτερου μήκους αλληλουχίες, χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα το πλασμίδιο pRB2017 που κατασκευάσαμε με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω, ενώ στις ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήσαμε μετά τις PCR (περιγράφεται παρακάτω), κατά τις οποίες εξετάστηκαν μικρότερες σε μήκος αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκε ο 1Kb DNA Ladder της Invitrogen.



Εικόνα 33: 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen. Εφαρμογή σε 0,9% κ.β. πήκτωμα αγαρόζης, βαφή με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Στη δεξιά εικόνα παρατίθενται τα χαμηλότερα μοριακά βάρη.

2.3.1 Προετοιμασία του DNA μάρτυρα (marker)

Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις προέρχεται από το πλασμίδιο pRB2017, μετά από ενζυμικές πέψεις με τα ένζυμα PstI και XhoI. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στον πίνακα παρακάτω.

μL	PstI	XhoI
Πλασμίδιο pRB2017	200	200
10X διάλυμα 3.1	200	200
Ένζυμο	3	3
H₂O	1597	1597
Σύνολο	2000	2000

Πίνακας 6: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pRB2017 με τα περιοριστικά ένζυμα PstI και XhoI.

Οι ζώνες μοριακού βάρους του DNA του πλασμιδίου του pRB2017 φαίνονται στον πίνακα παρακάτω.

Ζώνες pRB2017 (kb)
8,2
3,5
2,7
1,7
0,8
0,45

Πίνακας 7: Οι ζώνες μοριακού βάρους του μάρτυρα pRB2017



Εικόνα 34: Ο μάρτυρας pRB2017

2.3.2 Η ηλεκτροφόρηση

Η συγκέντρωση του πηκτώματος αγαρόζης επιλέγεται με βάση το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορεθεί. Ενδεικτικά, στον πίνακα 8 φαίνεται η αντιστοιχία μεταξύ του μεγέθους του DNA και της συγκέντρωσης του πηκτώματος.

Συγκέντρωση πηκτώματος αγαρόζης (% w/v)	Μέγεθος μορίων DNA
0,5	1000 – 30.000 bp
0,7	800 – 12.000 bp
1,0	500 – 10.000 bp
1,2	400 – 7.000 bp
1,5	200 – 3.000 bp
2,0	50 – 2.000 bp

Πίνακας 8: Αντιστοιχία μεταξύ του μεγέθους του DNA και της συγκέντρωσης του πηκτώματος αγαρόζης

Υλικά:

- Αγαρόζη της Invitrogen
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10X (108 g Tris, 55 g boric acid, 40 ml EDTA 0,5M, Ph=8 Συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml)
- WFI στείρο
- Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/ml (0,025g βρωμιούχο αιθίδιο-d H2O μέχρι τελικό όγκο 25ml)

- Διάλυμα χρωστικής Dye 6x για DNA (0.25%(w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,25%(w/v) κυανούν του ξυλενίου-30%(v/v) γλυκερόλης)
- Marker pRB2017 ως δείκτη μοριακού βάρους
- Εκμαγείο και χτενάκια για τη στερεοποίηση του πηκτώματος
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό τάσης
- Λάμπα UV

Διαδικασία:

- Παρασκευή πηκτώματος αгарόζης 1% w/v προσθέτοντας 1 g αгарόζης σε 100 mL TBE 1X (10 mL TBE σε 90 mL WFI)
- Θέρμανση στους 100°C έως ότου λιώσει η αгарόζη
- Ψύξη στους 50°C και προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου 5 mL και ανάδευση
- Τοποθέτηση στο ειδικό εκμαγείο με τα χτενάκια και στερεοποίηση
- Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει διάλυμα TBE 1X
- Προσθήκη στα δείγματα 1/6 του όγκου από το Loading Dye
- Φόρτωση των δειγμάτων και του μάρτυρα (marker) στα πηγαδάκια που σχηματίστηκαν από τα χτενάκια
- Εφαρμογή τάσης 120 V για περίπου μία ώρα
- Παρατήρηση των ζωνών σε λάμπα υπεριώδους

2.4 Εκχύλιση DNA από πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί τόσο απεικονιστική όσο και διαχωριστική μέθοδο. Μετά από την πέψη του πίνακα 2, που έγινε για να απομονώσουμε το γονίδιο LSD1, είναι απαραίτητο να διαχωριστούν μεταξύ

τους τα δύο θραύσματα. Γνωρίζοντας τα μοριακά βάρη των δύο θραυσμάτων από τον χάρτη περιορισμού, μας δίνεται η δυνατότητα να εκχυλίσουμε το LSD1 μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Υλικά:

- Πήκτωμα αγαρόζης, όπου έχουμε ηλεκτροφορήσει τα προϊόντα της πέψης
- Αιθανόλη
- Οξικό νάτριο
- Υγρό άζωτο
- WFI
- Αντλία κενού
- Λάμπα UV
- Φούρνος υβριδισμού με κυκλικό αναδευτήρα
- Φυγόκεντρος
- QIAquick Gel Extraction Kit

Διαδικασία:

- Εξαγωγή της ζώνης του LSD1 στη πηκτή αγαρόζης με τη βοήθεια λάμπας UV και ενός νυστεριού
- Ζύγιση του κομματιού που κόψαμε και προσθήκη του QG Buffer σε αναλογία 3 προς 1, μέσα σε ένα σωληνάριο των 15 mL
- Επώαση υπό ανάδευση στους 50°C για 15 λεπτά
- Αφού διαλυθεί η αγαρόζη, προσθήκη ισοπροπανόλης σε όγκο ίσο με αυτό του πηκτώματος και έντονη ανάδευση
- Προσθήκη του παραπάνω μίγματος στη στήλη που παρέχεται και τοποθέτηση της στήλης στο σωληνάριο συλλογής
- Φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 1 λεπτό
- Απόρριψη των υγρών που πέρασαν από τη στήλη στο σωληνάριο συλλογής

- Προσθήκη 0,5 mL QG στη στήλη και φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 1 λεπτό
- Απόρριψη των υγρών που πέρασαν από τη στήλη στο σωληνάριο συλλογής
- Για να ξεπλυθεί η στήλη, προσθήκη 0,75 mL PE Buffer στη στήλη, παραμονή στον πάγκο για 2 λεπτά και φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 1 λεπτό
- Απόρριψη των υγρών που πέρασαν από τη στήλη στο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 1 λεπτό
- Για την έκλυση του DNA, τοποθέτηση της στήλης σε νέο πλαστικό σωληνάριο, προσθήκη 50 μ L EB Buffer, παραμονή για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 1 λεπτό

Κατακρήμνιση με αιθανόλη:

- Προσθήκη 150 μ L καθαρής αιθανόλης και 5 μ L οξικού νατρίου και τοποθέτησή του στο υγρό άζωτο για 15 λεπτά
- Φυγοκέντρωση σε 12000 rpm για 15 λεπτά
- Απόρριψη υπερκειμένου και στέγνωμα του DNA στο κενό σε θερμοκρασία δωματίου
- Αναδιάλυση του DNA σε 20 μ L WFI

2.5 Κλωνοποίηση

Η τεχνολογία αυτή μας παρέχει τη δυνατότητα να απομονώσουμε ένα συγκεκριμένο γονίδιο από έναν οργανισμό και τη μεταφορά του σε έναν οργανισμό ξενιστή μέσω φορέων κλωνοποίησης με σκοπό την έκφραση του γονιδίου στο νέο οργανισμό. Τα βήματα που περιλαμβάνει είναι τα εξής:

1. Η τεχνητή σύνδεση (ligation) του ενθέματος (DNA) σε φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο)
2. Πρόσληψη του ανασυνδυασμένου μορίου από βακτηριακά κύτταρα, διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός
3. Ανάπτυξη βακτηριακών κλώνων σε καλλιέργεια και επιλογή αυτών που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο μόριο (με γονίδια επιλογής, όπως αντοχής σε αντιβιοτικά ή χρωστικές κλπ)
4. Πιστοποίηση ότι περιέχει το ένθεμα (PCR, χαρτογράφηση, αλληλούχιση κλπ) (Peter J Russel, 2005).

2.5.1 τεχνητή σύνδεση DNA μορίων (ligation)

Ο μηχανισμός της τεχνητής σύνδεσης (ligation) εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Lehman et al. Πρόκειται για μια αντίδραση, όπου τα άκρα δύο μορίων ενώνονται με την ενζυμική δράση της DNA λιγάσης, η οποία καταλύει το σχηματισμό ενός διφωσφορικού δεσμού ανάμεσα στα δύο άκρα (Modorich P και Lehman IR, 1973).

Η ενσωμάτωση του LSD1 στο pcDNAmycHis3.1(-)C γίνεται μέσω τεχνητής σύνδεσης (ligation), αφού τα άκρα των δύο μορίων έχουν προετοιμαστεί κατάλληλα, με τη βοήθεια των περιοριστικών ενδονουκλεασών, όπως περιγράφεται στο βήμα 1.1. ωστόσο, πριν από την τεχνητή σύνδεση, υπάρχει ακόμη ένα βήμα, κατά το οποίο τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα πρέπει να αποφωσφορυλιωθούν, με τη βοήθεια του CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase).

2.5.1.1 Αποφωσφορυλίωση DNA άκρων με το ένζυμο CIAP

Το ένζυμο CIAP είναι μια φωσφομονοεστεράση που απομονώθηκε από το βλεννογόνο εντέρου του μοσχαριού και υδρολύει τις 5' φωσφορικές ομάδες από DNA και RNA. Το CIAP χρησιμοποιείται στην αποφωσφορυλίωση των άκρων των γραμμικοποιημένων πλασμιδιακών φορέων, έτσι ώστε να μην κυκλοποιηθούν ξανά, χωρίς να προσλάβουν το ένθεμα.

Υλικά:

- Γραμμικοποιημένος πλασμιδιακός φορέας
- CIAP της New England Biolabs
- CIAP ρυθμιστικό διάλυμα 10X (1X: 50mM Tris-HCl (pH 9.3 στους 25°C), 1mM MgCl₂, 0.1mM ZnCl₂ και 1mM spermidine)
- WFI
- Θερμοκυκλοποιητής

Διαδικασία:

- Η όλη διαδικασία ξεκινά αφού πρώτα γίνει κατακρήμνιση του πλασμιδιακού φορέα με αιθανόλη, τεχνική που περιγράφεται παραπάνω, με σκοπό την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων συστατικών από την αντίδραση πέψης που έγινε προηγουμένως

- Αναδιάλυση του ιζήματος, σύμφωνα με τον πίνακα 9
- Επώαση στον θερμοκυκλοποιητή, στους 37°C, για 1,5 ώρα
- Κατακρήμνιση με αιθανόλη εκ νέου και αναδιάλυση σε 20 µL WFI, ώστε να είναι έτοιμο για την αντίδραση της λιγάσης

µL	pcDNA3.1mycHis(-)C
CIAP ρυθμιστικό διάλυμα	20
CIAP (U/L)	1
WFI	179
Σύνολο	200

Πίνακας 9: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την αντίδραση αποφωσφορλίωσης των άκρων.

2.5.1.2 Τεχνητή σύνδεση με τη λιγάση

Το ένζυμο T4 DNA λιγάση επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση τμημάτων DNA με μονόκλινα συμπληρωματικά άκρα, που έχουν παραχθεί από την δράση ίδιων περιοριστικών ενδονουκλεασών ή παρουσιάζουν τυφλά άκρα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με ανάμιξη 100 mg πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C και ευθύγραμμου τμήματος (LSD1) με συμπληρωματικά άκρα που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί σε αναλογία 1:3.

Υλικά:

- T₄ DNA λιγάση της New England Biolabs
- 10X T₄ DNA λιγάση ρυθμιστικό διάλυμα (200mM Tris pH 7.6, 100mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.5mM ATP, 10mM EDTA)
- DTT (διθειοθρεϊτόλη) επιπλέον, η οποία χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του ενζύμου
- WFI
- Θερμοκυκλοποιητής

Διαδικασία:

- Προσθήκη των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τον πίνακα 10

- Ήπια ανάδευση με τη χρήση πιπέτας
- Επώαση στον θερμοκυκλοποιητή στους 16°C για 18 ώρες

μL	pLSD1	Control
pcDNA3.1mycHis(-)C/XhoI-NotI	1,5	1,5
pOZ-N-Flag-HA-LSD1/XhoI-NotI	6	-
10X T ₄ ρυθμιστικό διάλυμα	2	2
T ₄ λιγάση (1U/L)	1	1
DTT 0,1M	0,2	0,2
WFI	10	16
Σύνολο	20	20

Πίνακας 10: Ποσότητες αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την τεχνητή σύνδεση μορίων (ligation).

2.5.2 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli* με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA (transformation)

Με τον όρο μετασχηματισμό εννοούμε τη γενετική μεταβολή ενός κυττάρου μετά από την πρόσληψη ξένου γενετικού υλικού από το εξωτερικό περιβάλλον μέσω των μεμβρανών του. για να πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός, τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν γίνει δεκτικά, κάτι που μπορεί να συμβεί είτε στη φύση μετά από διάφορα ερεθίσματα όπως η έλλειψη θρεπτικών, αλλά μπορεί να επαχθεί και πειραματικά (Johnston C et al., 2014).

Εργαστηριακά, μετασχηματισμός επιτεύχθηκε πρώτη φορά το 1970 από τους Morton Mandel και Akiko Higa, οι οποίοι με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου πέτυχαν την εισαγωγή ξένου γενετικού υλικού σε κύτταρα *E. coli*. Αργότερα η τεχνολογία αυτή δέχθηκε πολλές βελτιώσεις, ωστόσο ανακαλύφθηκαν και άλλες τεχνικές, όπως αυτή της ηλεκτοδιάτρησης το 1980 (Mandel M και Higa A, 1970).

Το μέγιστο της δεκτικότητας των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων δισθενών κατιόντων (CaCl₂), τα οποία προσκολλώνται στα κυτταρικά τοιχώματα του βακτηριακού κυττάρου και λόγω του θετικού τους φορτίουπροσελκύουν τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA και προσκόλληση αυτών στα κυτταρικά τοιχώματα, διευκολύνοντας έτσι την είσοδό τους στο κύτταρο. Στη συνέχεια ο μετασχηματισμός επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ.

2.5.2.1 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων (competent cells) XL-Blue

Υλικά:

- LB broth Luria-Bertani (yeast extract, NaCl και τρυπτόνη)

- Αντιβιοτικό Τετρακυκλίνη
- CaCl_2 0,1M
- Γλυκερόλη 100%
- Πάγος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Φωτόμετρο
- Λυχνία για αποστείρωση

Διαδικασία:

- Επώαση ολονύκτια (overnight) των βακτηρίων σε 25 ml LB Broth που περιέχει τετρακυκλίνη συγκέντρωσης 25 $\mu\text{g/ml}$
- Ενοφθαλμισμός της καλλιέργειας σε φιάλη καλλιέργειας που περιέχει 500 ml LB Broth. Επιλέγουμε φιάλη καλλιέργειας μεγέθους 2L για καλύτερο αερισμό της καλλιέργειας
- Επώαση μέχρι $\text{OD}_{600}=0,5$ περίπου (περίπου 1,5 ώρα)
- Η φιάλη καλλιέργειας τοποθετείται απευθείας στους 4°C ώστε να σταματήσει η βακτηριακή ανάπτυξη
- Μόλις η καλλιέργεια κρυώσει, φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σε 5000 rpm για 15 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση του βακτηριακού ιζήματος σε 200 ml στείρου, παγωμένου CaCl_2 0,1M. Διατήρηση στον πάγο για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 15 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 22 ml στείρου, παγωμένου CaCl_2 0,1M. Έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση στον πάγο για 1,5 ώρα
- Προσθήκη 7 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης 100%
- Μοίρασμα των κυττάρων, 0,5 ml σε σωληνάρια και διατήρησή τους στους -80°C

- Κατά την κατεργασία τους διατηρούνται πάντα σε πάγο και σε στείρες συνθήκες διότι είναι πολύ ευαίσθητα

2.5.2.2 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων

Υλικά:

- Δεκτικά βακτήρια XL1-Blue (competent cells)
- LB Luria-Bertani Broth ή Miller Broth (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% Sodium chloride. pH : 7.0 ± 0.2)
- LB άγαρ (Scharlau) 15%w/v
- Αντιβιοτικό Αμπικιλλίνη 60μg/ml
- Τρυβλία
- Πάγος
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- Λυχνία για αποστείρωση

Διαδικασία:

- Προετοιμασία τρυβλίων με LB άγαρ (Scharlau) 15%w/v και αμπικιλλίνη 60μg/ml από την προηγούμενη ημέρα
- Ξεπάγωμα των κυττάρων και του DNA σε πάγο. Τα κύτταρα δεν πρέπει να ξεπεράσουν τους 0°C
- Ανάμιξη 0,2 ml κυττάρων και 5 μl DNA σε σωληνάριο των 15 ml
- Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά
- Θερμικό σοκ στους 37°C για 2 λεπτά
- Τοποθέτηση για 2 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη 1 ml LB Broth προθερμασμένο στους 37°C και επώαση στους 37°C για μία ώρα
- Στρώσιμο 0,2 ml σε τρυβλίο με άγαρ και αμπικιλλίνη

- Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων βακτηρίων στις 1500 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 0,2 ml LB Broth
- Στρώσιμο των 0,2 ml σε τρυβλίο με το αμπικιλίνη για πιο πυκνή ανάπτυξη
- Επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18-24 ώρες
- Παρατήρηση των αποικιών και επιλογή

2.5.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Αφού επιλεχθούν οι μετασχηματισμένοι κλώνοι, σειρά έχει η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Αρχικά πραγματοποιείται στον κάθε κλώνο καλλιέργεια μικρής κλίμακας (mini preparation) έτσι ώστε να ελεγχθούν οι κλώνοι ως προς την παρουσία του pLSD1 με τη βοήθεια ενζύμων περιορισμού και αλληλούχισης και στη συνέχεια όσοι από αυτούς είναι θετικοί προχωρούν σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxi preparation) για την αποκομιδή μεγάλης ποσότητας και υψηλής καθαρότητας του pLSD1.

2.5.3.1 Καλλιέργεια μικρής κλίμακας (mini preparation)

Υλικά:

- Τρυβλίο με αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων
- Θρεπτικό υλικό LB Luria-Bertani Broth ή Miller Broth (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% Sodium chloride. pH : 7.0 ± 0.2)
- Αντιβιοτικό Αμπικιλίνη 60 µg/ml

Διαδικασία:

- Εμβολιασμός με τις αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων που έχουμε επιλέξει (δηλαδή βακτηρίων που έχουν καταφέρει να επιβιώσουν παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλίνης επειδή έχουν προσλάβει το πλασμίδιο που τους προσδίδει ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό) σε 5ml υγρό θρεπτικό υλικό LB που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.
- Επώαση για 18 ώρες στους 37oC με έντονη ανάδευση.

2.5.3.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας

Υλικά:

- Διάλυμα Tris 1M pH=8
- Διάλυμα EDTA 0,5 M pH=8
- Διάλυμα επαναιώρησης STET (8% κ.β. σακχαρόζη - 5% κ.ο. TritonX-100 - 50mM EDTA pH=8 - 50mM Tris pH=8)
- Λυσοζύμη (Sigma) απόθεμα 10mg/ml (30μl από απόθεμα 10mg/ml σε διάλυμα 0,25M Tris pH=8)
- Tris-EDTA ρυθμιστικό διάλυμα TE (10mM Tris pH=8 - 1mM EDTA pH=8)
- Ισοπροπανόλη

Διαδικασία:

- Μεταφορά 1,5 ml από την υγρή καλλιέργεια μικρής κλίμακας σε σωληνάκι.
- Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 2 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Προσθήκη 400 μl από το διάλυμα επαναιώρησης STET και αναδιάλυση των κυττάρων με τη χρήση vortex
- Προσθήκη 30 μl από το διάλυμα της λυσοζύμης και θέρμανση για 1 λεπτό στους 100°C.
- Φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απομάκρυνση του ιζήματος με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα αφού το DNA βρίσκεται στο υπερκείμενο
- Προσθήκη 400 μl ισοπροπανόλης
- Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε 12000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C και απορρίπτεται το υπερκείμενο
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl διαλύματος TE με χρήση vortex
- Μέτρηση με τη βοήθεια του φωτομέτρου Thermo Scientific NanoDrop 2000 τη συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA σε ng/μl

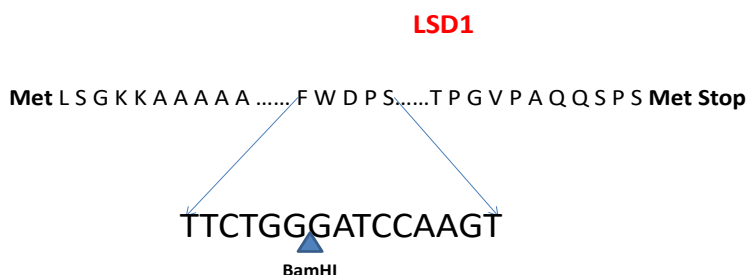
Η απόδοση της μεθόδου είναι περίπου 500 ng πλασμιδίου / μl καλλιέργειας. Ακολουθεί πέψη του πλασμιδιακού DNA (2 μg) με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης για έλεγχο ακεραιότητας του πλασμιδίου.

2.5.3.3 Πέψη πλασμιδιακού DNA με BamHI

Σύμφωνα με την εικόνα 8, υπάρχουν δύο θέσεις περιορισμού για τη BamHI, και μάλιστα η μία βρίσκεται μέσα στο γονίδιο LSD1. Αυτό το καθιστά κατάλληλο ένζυμο για την επιλογή των θετικών κλώνων. Από τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας, έχουν αναπτυχθεί 8 κλώνοι. Σαν control χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο το οποίο δεν περιέχει το ένθεμα (LSD1). Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων υπολογίστηκαν και φαίνονται στον πίνακα 10. Τα δείγματα έπειτα επώαστηκαν για 4 ώρες στους 37°C και ηλεκτροφορήθηκαν ώστε να επιλεγθούν οι θετικοί κλώνοι. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 9.

μl	pLSD1	Control
DNA	35	1
10X διάλυμα CutSmart	4	4
BamHI (20U/ μl)	1	1
WFI	-	34
Σύνολο	40	40

Πίνακας 11: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του πλασμιδίου pLSD1 με το περιοριστικό ένζυμο BamHI



Εικόνα 35: Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου BamHI στο γονίδιο LSD1. Στην εικόνα φαίνεται η πρωτεϊνική αλληλουχία της LSD1 και στο κάτω μέρος φαίνεται η αλληλουχία που περιέχεται στο γονίδιο, η οποία αναγνωρίζεται και πέπτεται από το ένζυμο BamHI.

Για τον ακριβέστερο έλεγχο των πλασμιδίων, προχωρήσαμε σε χαρτογράφηση, καθώς και σε αλληλούχιση.

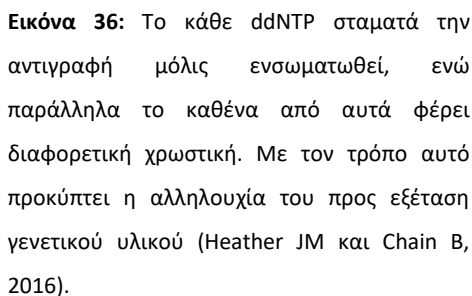
2.5.3.4 Αλληλούχιση

Η πιο σίγουρη μέθοδος για τον έλεγχο του γονιδίου που χρησιμοποιούμε στα πειράματά μας είναι αδιαμφισβήτη η αλληλούχιση αυτού. Με τη διαδικασία της αλληλούχισης μπορούμε να

αποκρυπτογραφήσουμε την αλληλουχία ενός τμήματος DNA. Όλες οι σύγχρονες τεχνικές είναι βασισμένες στη μέθοδο Sanger. Η μέθοδος Sanger βασίζεται στη χρήση διδεόξυ-τριφωσφορικών-νουκλεοτιδίων (ddNTPs) κατά την αντίδραση επέκτασης εκκινητή, τα οποία μόλις εισαχθούν σταματούν την επέκταση, κάθε φορά σε διαφορετικό σημείο, καθώς δεν περιέχουν την υδροξυλομάδα που είναι απαραίτητη για την προσθήκη του επόμενου dNTP. Η μέθοδος του Sanger αναφέρεται και ως μέθοδος τερματισμού της αλυσίδας. Η αλληλούχιση του DNA με τη μέθοδο τερματισμού της αλυσίδας βασίζεται στο ότι τα μονόκλωνα DNA που διαφέρουν μόνο κατά ένα νουκλεοτίδιο μπορούν να διαχωριστούν το ένα από το άλλο μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Με τη μέθοδο Sanger κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα δεν έχει την ικανότητα ανάλυσης τμημάτων με μήκος μεγαλύτερου των 800 βάσεων. Για να αυξηθεί ο αριθμός των ζευγών βάσεων που διαβάζονται σε μια αντίδραση πρέπει οι συγκεντρώσεις των πρόωρα τερματισμένων τμημάτων του DNA που αλληλουχείται να εμφανίζουν μικρή διακύμανση. Η ομοιομορφία αυτή είναι δύσκολη διότι για αλυσίδες διαφορετικού μεγέθους απαιτούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις των 2-3 ddNTPs (νουκλεοτίδια που επιφέρουν τον τερματισμό σύνθεσης της αλυσίδας). Κάθε ddNTP περιλαμβάνει ένα μόριο ριβόζης που φέρει μια φωσφορική ομάδα στην 5' θέση και μια βάση στην 1' θέση. Όμως στην 3' θέση δεν υπάρχει -OH, προκαλείται έτσι τερματισμός σύνθεσης της αλυσίδας.

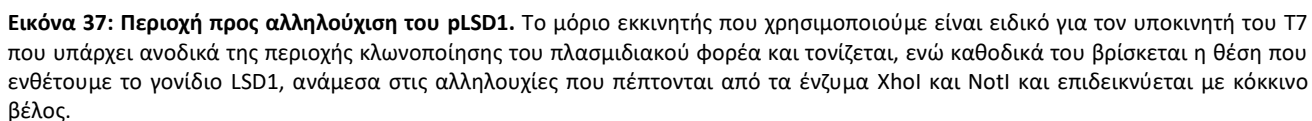
Η ενζυμική μέθοδος Sanger απαιτεί μονόκλωνο DNA. Η μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση μιας ραδιοσημασμένης αλυσίδας *in vitro*. Για τη σύνθεση του κλώνου παρασκευάζονται 2-3 ddNTPs για κάθε μια από τις τέσσερις βάσεις. Τα ddNTPs μπορούν να ενσωματωθούν από την DNA πολυμεράση σε ένα μόριο DNA αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την DNA πολυμεράση, με την παρουσία τεσσάρων dNTPs εκ των οποίων το καθένα είναι σημασμένο με διαφορετική χρωστική. Επίσης χρησιμοποιείται και ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που είναι συμπληρωματικό στη μήτρα DNA και χρησιμεύει ως εκκινητής. Πραγματοποιούνται έτσι οι τέσσερις αντιδράσεις σύνθεσης μέσω προσθήκης των 2-3 dNTPs. Η προσθήκη ενός ddNTP στο 3' άκρο μιας αντιγραφόμενης αλυσίδας σταματά την περαιτέρω σύνθεση. Ο λόγος ddNTP/dNTP είναι ρυθμιζόμενος ώστε να μην γίνεται ολοκλήρωση της αντίδρασης όπου συναντάται η βάση N. Η ποσότητα των dNTPs είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ddNTPs ώστε να μην τερματίζεται γρήγορα η σύνθεση του κλώνου. Συνεπώς σε κάθε αντίδραση περιέχεται μείγμα αλυσίδων που έχουν όλες διαφορετική βάση τερματισμού. Για να προσδιοριστεί η αλληλουχία προσδιορίζεται το ddNTP που υπάρχει στο τέλος του κάθε κλώνου. Στον προσδιορισμό βοηθά το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης. Τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μήκος τους στην πηκτή και στη συνέχεια ανιχνεύονται τα ddNTPs από ανιχνευτή φθορισμού (Heather JM και Chain B, 2016).



- pcDNAmycHis3.1(-)C-LSD1 (pLSD1)
- μόρια-εκκινητές (primers)

T7 promoter-Forward primer:	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
-----------------------------	----------------------------

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται η περιοχή προς αλληλούχιση.



Διαδικασία:

Για τη διαδικασία αλληλούχισης αποστέλλουμε δείγμα από το καθαρισμένο προϊόν της PCR, καθώς και τους εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε, αραιωμένους σε αναλογία 1:20.

2.6 Καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxi preparation)

Από την προηγούμενη διαδικασία έχουμε δύο βακτηριακούς κλώνους, οι οποίοι περιέχουν το pLSD1. Με την καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας, οι κλώνοι αυτοί θα πολλαπλασιαστούν, έτσι ώστε να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA σε μεγάλη ποσότητα και σε υψηλή καθαρότητα.

Υλικά:

- Υγρό θρεπτικό υλικό LB Broth
- Αντιβιοτικό Αμπικιλίνη 60 µg/ml
- Λυχνία για αποστείρωση

Διαδικασία:

- Εμβολιασμός 300ml υγρού θρεπτικού υλικού LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, με 2,5ml από την καλλιέργεια μικρής κλίμακας της οποίας το πλασμιδιακό DNA είχε την καλύτερη απεικόνιση στην ηλεκτροφόρηση, δηλαδή των LSD1-2 και LSD1-4.
- Επώαση για 18 ώρες στους 37°C με ανάδευση.

2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (maxi preparation)

Η μεγάλης κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA αποτελείται από τρία βήματα. Το πρώτο βήμα είναι η αλκαλική λύση των κυττάρων, το δεύτερο βήμα είναι ο περαιτέρω καθαρισμός με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG8000) και το τρίτο βήμα είναι ο καθαρισμός με διαβάθμιση καισίου, από τον οποίο προκύπτει πλασμιδιακό DNA πολύ υψηλής καθαρότητας.

2.7.1 Αλκαλική λύση

Υλικά:

- Διάλυμα Solution I (50mM γλυκόζη - 25mM Tris pH=8 - 50mM EDTA pH=8)
- Διάλυμα Solution II (4mM NaOH - 1mM θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS 1%)
- Διάλυμα Solution III (60% (v/v) οξικό κάλιο 5M – 11,5% (v/v) οξικό οξύ)
- Ισοπροπανόλη

- Διάλυμα TE (10mM Tris pH=8 - 1mM EDTA pH=8)

Διαδικασία:

- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 15 λεπτά
- Απόριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση του βακτηριακού ιζήματος σε 6 ml Solution I. Επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 12 ml από το Solution II που έχουμε μόλις παρασκευάσει. Ήπια ανάδευση με ανακίνηση του tube με το χέρι. Επώαση στον πάγκο για 10 λεπτά.
- Προσθήκη 14 ml Solution III που έχουμε μόλις παρασκευάσει. Έντονη ανάδευση με το χέρι. Επώαση στον πάγκο για 30 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 5000 rpm για 30 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο bucket μέσα από μια γάζα, η οποία το φιλτράρει από πιθανά κομμάτια από το ίζημα
- Προσθήκη 0,6 του όγκου ισοπροπανόλη σε θερμοκρασία δωματίου. Έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 7000 rpm για 30 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 3 ml διαλύματος TE

2.7.2 Καθαρισμός με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG8000)

Υλικά:

- Αιθανόλη 70%
- Διάλυμα χλωριούχου λιθίου 5M (LiCl)
- Ριβονουκλεάση A (Sigma, από απόθεμα 10mg/ml σε 10mM Tris pH=7,5 - 15mM NaCl)
- Διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης PEG 8000 (13% PEG 8000 σε 1,6M NaCl)
- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- Οξικό νάτριο 3M pH=5,2

Διαδικασία:

- Προσθήκη στα 3 ml πλασμιδιακού DNA 3 ml παγωμένου LiCl 5M σε ένα corex tube 15 ml. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 7000 rpm για 15 λεπτά
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε corex tube 30 ml και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου στις 7000 rpm για 20 λεπτά

- Απόρριψη του υπερκειμένου και ξήρανση του ιζήματος σε αντλία κενού ώστε να απομακρυνθεί η ισοπροπανόλη
- Ανασύσταση του ιζήματος σε 0,5 ml TE buffer που περιέχει 20 µg/ml RNAase. Μεταφορά σε σωληνάριο του 1,5 ml, ανάδευση με το χέρι και επώαση για 15 λεπτά στους 370C
- Προσθήκη 1 ml 13% PEG 8000, ανάδευση με vortex και τοποθέτηση στο υγρό άζωτο για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12000 rpm για 30 λεπτά
- Απόρριψη υπερκειμένου και ανασύσταση του ιζήματος σε 400 µg TE Buffer
- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης, ανάδευση με vortex και spin down για διαχωρισμό των φάσεων. Η επάνω (υδατική) φάση περιέχει το DNA.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο και προσθήκη μισού όγκου φαινόλης και μισού όγκου χλωροφόρμιου. Ανάδευση (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) για διαχωρισμό των φάσεων. Πάλι, η επάνω (υδατική) φάση είναι αυτή που περιέχει το DNA.
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάριο που περιέχει ίσο όγκο χλωροφόρμιου. Ανάδευση (vortex) και σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) για διαχωρισμό των φάσεων.
- Εκτελούμε άλλες δύο πλύσεις με χλωροφόρμιο κατά τον ίδιο τρόπο
- Προσθήκη 1:10 του όγκου CH₃COONa και δύο όγκους αιθανόλης. Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 12000 rpm για 15 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 µl TE Buffer
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA στο Thermo Fisher Nanodrop 2000

2.7.3 Καθαρισμός με διαβάθμιση καισίου (CsCl)

Υλικά:

- TE Buffer
- CsCl
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10 µg/ml
- Ισοπροπανόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Υπερφυγόκεντρος

Διαδικασία:

- Αραίωση του δείγματος DNA σε TE Buffer 3 ml σε αποστειρωμένο σωληνάριο 15 ml
- Διάλυση 4,8 gr CsCl. Ανάδευση με vortex και υδατόλουτρο μέχρι να διαλυθεί το άλας
- Αφού διαλυθεί τελείως, προσθήκη 200 μl EtBr και ανάδευση
- Μεταφορά του δείγματος μέσα στις αμπούλες της υπερφυγοκέντρου με τη βοήθεια μιας σύριγγας
- Πλήρωση της αμπούλας με TE Buffer
- Εφαρμογή θερμότητας στο ανοιχτό άκρο της αμπούλας έως ότου λιώσει και σφραγιστεί
- Υπερφυγοκέντρωση του δείγματος στις 55000rpm ολονύκτια (overnight) σε θερμοκρασία δωματίου
- Μετά το πέρας της υπερφυγοκέντρωσης μεταφέρουμε προσεκτικά την κόκκινη μπάντα που σχηματίστηκε στην αμπούλα από το σύμπλοκο του EtBr με το DNA σε ένα σωληνάριο των 15 ml με τη χρήση σύριγγας
- Διαδοχικές πλύσεις με ίσο όγκο ισοπροπανόλης έως ότου το δείγμα καθαριστεί από το EtBr και είναι διαυγές
- Απομάκρυνση του CsCl με διαπίδυση σε διάλυμα TE, δύο φορές από 2 ώρες και άλλη μία ολονύκτια (overnight)
- Συλλογή του δείγματος από τη μεμβράνη διαπίδυσης και μέτρηση στο Nanodrop 2000

2.8 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι καλλιέργειες ιστών αναπτύχθηκαν αρχικά ως μια μέθοδος μελέτης της συμπεριφοράς των κυττάρων ελεύθερων από πιθανές *in vivo* επιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό. Σκοπός των καλλιιεργειών κυττάρων είναι να διατηρηθούν τα κύτταρα βιώσιμα μακριά από τον φυσιολογικό οργανισμό από τον οποίο προήλθαν. Από την πρώτη περιγραφή καλλιέργειας ιστού το 1907 ως την ανάπτυξη της πρώτης συνεχούς ανθρώπινης σειράς καρκινικών κυττάρων, HeLa, το 1952, οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν εξελιχθεί σε ένα απαραίτητο ερευνητικό εργαλείο (Schiff J, 2002). Επίσης αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της φαρμακοβιομηχανίας, της βιομηχανίας τροφίμων και της βιοτεχνολογίας. Οι ορίζοντες όμως και οι δυνατότητες των κυτταροκαλλιιεργειών απέκτησαν νέες απρόβλεπτες διαστάσεις τις τελευταίες δεκαετίες με την καλλιέργεια και διατήρηση ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων.

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα HuH-7.5, που προέρχονται από τα κύτταρα HuH-7, μια κυτταρική σειρά που προέρχεται από καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και απομονώθηκε από ένα 57χρονο ασθενή στην Ιαπωνία το 1982. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κυτταρική σειρά HuH-7.5 είναι δεκτική στο μολυσματικό στέλεχος του ιού HCV, JFH1 (Sainz B et al., 2009). Η δεύτερη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας είναι η HepG2, η οποία είναι μια συνεχής κυτταρική σειρά, προερχόμενη από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου Αμερικανού από την Καυκάσια φυλή, με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Είναι προσκολλητικά κύτταρα μεγέθους 18 microns. Έχουν μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων και διαθέτουν 55 χρωμοσώματα. Τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν διάφορες πρωτεΐνες πλάσματος, όπως τρανσφερρίνη, αλβουμίνη, αλλά και πρωτεΐνες οξείας φάσης, όπως ινωδογόνο, α2-μακροσφαιρίνη, τρανσφερρίνη, πλασμινογόνο. Στον πίνακα 13 φαίνεται η σύσταση του θρεπτικού υλικού στο οποίο καλλιεργήθηκαν, ενώ στον πίνακα 14 φαίνονται οι συνθήκες στις οποίες επωάζονται οι περισσότερες κυτταρικές σειρές.

HepG2	HuH-7.5
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (1gr/L), GibcoBRL	Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (4,5gr/L), GibcoBRL
Ορός εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum 10%, FCS 10%), GibcoBRL	Ορός εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum 10%, FCS 10%), GibcoBRL
Penicillin (10.000IU) και Streptomycin (10.000 µg/ml) στο DMEM	Penicillin (10.000IU) και Streptomycin (10.000 µg/ml) στο DMEM
-	Non-essential aminoacids, GibcoBRL

Πίνακας 13: Θρεπτικά υλικά των κυτταρικών σειρών

Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας	
Θερμοκρασία	37 °C
CO ₂	5%
Υγρασία	95%

Πίνακας 14: Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

2.8.1 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Υλικά:

- Θρεπτικά υλικά των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιούνται κάθε φορά (Πίνακας 13)
- Versene (0,5 Mm EDTA σε PBS 1x)
- Τρυψίνη (0,05% τρυψίνη – EDTA 1x)

Διαδικασία:

- Παρασκευή πλήρους υλικού με DMEM και 10% FBS ποσότητας 40ml (ή και με μη-απαραίτητα αμινοξέα (Non-essential aminoacids))
- Αφαίρεση του υλικού που υπήρχε στη φιάλη καλλιέργειας 75F με κύτταρα που επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C
- Πλύση με 10ml Versene
- Προσθήκη στην φιάλη καλλιέργειας 75F 1ml τρυψίνη και επώαση για περίπου 2 λεπτά στον κλίβανο
- Προσθήκη 3ml πλήρες υλικό και καλή ανάδευση με την πιπέτα
- Μεταφορά του εναιωρήματος κυττάρων σε σωληνάριο των 15 ml
- Φυγοκέντρηση σε 800 rpm, για 5 λεπτά στους 22°C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Προσθήκη 5ml πλήρους υλικού
- Αναδιάλυση του ιζήματος
- Μέτρηση των κυττάρων με πλάκα Neubauer
- Επίστρωση $4 \cdot 10^5$ κυττάρων σε πλάκα 6 φρεατίων, που περιέχουν καλυπτρίδες
- Τοποθέτηση των κυτταροκαλλιεργειών στον κλίβανο

2.9 Διαμόλυνση κυττάρων πλασμιδιακό DNA με τη χρήση του αντιδραστηρίου jetPEI (transfection)

Κατά την παροδική διαμόλυνση, εισάγουμε ξένο DNA σε κύτταρα, αναγκάζοντάς τα να εκφράσουν τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν. Στην παρούσα εργασία, εισαγωγή του pLSD1 σε κυτταροκαλλιέργεια επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου jetPEI. Πρόκειται για ένα αντιδραστήριο το οποίο αποτελείται κυρίως από μια γραμμική πολυαιθυλενιμίνη. Το αντιδραστήριο αυτό συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια, ικανά να αλληλεπιδράσουν με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεογλυκάνες που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα αυτά εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ενδοκύττωσης. Παράλληλα το jetPEI στο εσωτερικό του κυττάρου, προστατεύει το DNA

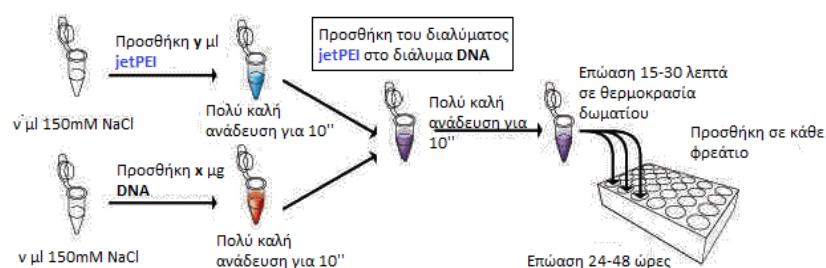
από αποικοδόμηση, ρυθμίζοντας το pH εντός του ενδοσώματος. Η συνεχής εισροή πρωτονίων επηρεάζει την οσμωτική ισορροπία του κυττάρου και μπορεί να προκαλέσει ρήξη. Με αυτόν τον τρόπο απελευθερώνεται το DNA στο κυτόπλασμα του κυττάρου.

Υλικά:

- 150 mM διάλυμα χλωριούχου νατρίου, Polyplus
- JetPei (DNA Transfection Reagent), Polyplus
- Πλασμίδια pLSD1
- Φυγόκεντρος

Διαδικασία:

- Σε σωληνάρια 1ml προσθήκη 2 μ g DNA σε διάλυμα NaCl μέχρι τα 50 μ l
- Πολύ καλή ανάδευση (vortex και short spin)
- Σε διαφορετικό σωληνάριο προσθέτουμε 4 μ l jetPei και 46 μ l NaCl
- Πολύ καλή ανάδευση (vortex και short spin)
- Από κάθε φρεάτιο, αφαίρεση του παλαιού θρεπτικού υλικού και προσθήκη 600 μ l φρέσκου θρεπτικού υλικού
- Στο κάθε σωληνάριο που περιέχει το DNA προσθήκη του μίγματος του jetPei
- Πολύ καλή ανάδευση (vortex και short spin)
- Επώαση των δύο διαλυμάτων για 30min σε θερμοκρασία δωματίου
- Η συνολική ποσότητα του DNA solution και του jetPei solution προστίθεται σε κάθε φρεάτιο (100 μ l), στάγδην ροή
- Επώαση των κυττάρων για 4 ώρες στους 37°C.
- Αλλαγή θρεπτικού υλικού
- Επώαση των κυττάρων για 48 ώρες στους 37°C
- Έλεγχος της έκφρασης των αλληλουχιών που εισήχθησαν στα κύτταρα με διάφορες μεθόδους, για παράδειγμα με PCR ή με Ανοσοσύτρωση τύπου Western



Εικόνα 38: Πειραματική διαδικασία διαμόλυνσης με τη χρήση του jetPEI.

2.10 Δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών Huh-7.5 και HepG2 που εκφράζουν LSD1

Η διαφορά των σταθερών κυτταρικών σειρών σε σχέση με τις παροδικά διαμολυσμένες, είναι ότι εκφράζουν σταθερά το γονίδιο που έχουμε εισάγει, σε αντίθεση με τις παροδικά διαμολυσμένες σειρές, οι οποίες μπορεί να αποβάλλουν το ξένο DNA αυθόρμητα. Πρόκειται για μια διαδικασία που διαρκεί πολλές εβδομάδες, κατά την οποία τα κύτταρα, κάτω από την πίεση της επιλογής, λόγω χάρη παρουσία κάποιου αντιβιοτικού, επιβιώνουν μόνο εάν καταφέρουν να ενσωματώσουν το γενετικό υλικό και εκφράσουν το γονίδιο επιλογής, λόγω χάρη ένα γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό.

Υλικά:

- 150 mM διάλυμα NaCl, Polyplus
- JetPei (DNA Transfection Reagent), Polyplus
- Πλασμίδια pLSD1 καθώς και pcDNA3.1mycHis(-)C
- Αντιβιοτικό Γενετισίνη (G418)
- Φυγόκεντρος

Διαδικασία:

Η διαδικασία διαμόλυνσης που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή της προηγούμενης ενότητας, με τη διαφορά ότι μετά το πέρας του 48ωρου, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται το αντιβιοτικό Γενετισίνη. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που προσθέσαμε φαίνεται στον πίνακα παρακάτω.

Συγκέντρωση γενετισίνης στο θρεπτικό υλικό	
Huh-7.5	HepG2
700 µg/ml	1000 µg/ml

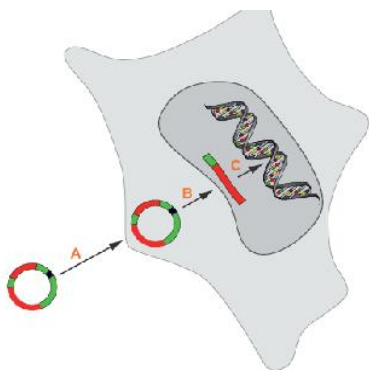
Πίνακας 15: συγκέντρωση αντιβιοτικού για την επιλογή των κλώνων.

Στη συνέχεια, οι κλώνοι που καταφέρνουν να επιβιώσουν ανακαλλιεργούνται και πολλαπλασιάζονται.

2.11 Απομόνωση των κλώνων

Η σταθερή έκφραση γονιδίων από μια κυτταροσειρά είναι ένα σπάνιο γεγονός, κατά το οποίο το εξωγενές DNA θα πρέπει να εισαχθεί μέσα στο κύτταρο και στη συνέχεια μέσα στον πυρήνα και τέλος να ενσωματωθεί στο χρωμοσωμικό DNA. Σε σύγκριση με την παροδική έκφραση, η σταθερή έκφραση μας παρέχει μια πιο μακροπρόθεσμη αλλά και επαναλήψιμη έκφραση του εισαχθέντος γονιδίου. Για να επιλεγθούν οι σταθεροί κλώνοι, θα πρέπει μαζί με το επιθυμητό γονίδιο να εκφράζεται παράλληλα και ένα

γονίδιο επιλογής, που στη δική μας περίπτωση είναι το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης, το οποίο είναι επίσης ενσωματωμένο στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C. Το γονίδιο αυτό εκφράζει ένα ένζυμο, το οποίο απενεργοποιεί με φωσφορυλίωση μια σειρά από αμινογλυκοσίδες, μεταξύ αυτών και τη γενετισίνη (G418) που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα.



Εικόνα 39: Δημιουργία σταθερών κυτταροσειρών. Για τη σταθερή έκφραση του εισαχθέντος γονιδίου από ένα κύτταρο είναι απαραίτητη η ενσωμάτωσή του στο χρωμοσωμικό DNA. Αρχικά το πλασμιδιακό DNA εισάγεται στο κύτταρο με τεχνητή διαμόλυνση και αρχίζει να εκφράζεται από τους μηχανισμούς του κυττάρου (παροδική διαμόλυνση). Στο στάδιο αυτό το κύτταρο μπορεί αυθόρμητα να αποβάλλει το πλασμίδιο. Όταν η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες πίεσης επιλογής, για παράδειγμα παρουσία ενός αντιβιοτικού στο οποίο το πλασμίδιο παρέχει ανθεκτικότητα, θα επιβιώσουν μόνο οι σταθεροί κλώνοι, δηλαδή αυτοί που έχουν ενσωματώσει το πλασμιδιακό DNA στο χρωμοσωμικό τους DNA.

Για να δημιουργηθούν κυτταρικοί κλώνοι, θα πρέπει τα κύτταρα να αραιωθούν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να αναπτύσσονται ως μονήρη κύτταρα. Αυτό μπορεί να γίνει με τη βοήθεια μιας πλάκας 96 φρεατίων, στην οποία θα κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας των κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο το σύστημα που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια θα είναι μονοκλωνικό, επομένως και ομοιογενές. Τελικά, παίρνουμε τους κλώνους που προκύπτουν στα φρεάτια και τους αναπτύσσουμε, έως ότου έχουμε αρκετή ποσότητα για ανάλυση (ενίσχυση κλώνου).

Υλικά:

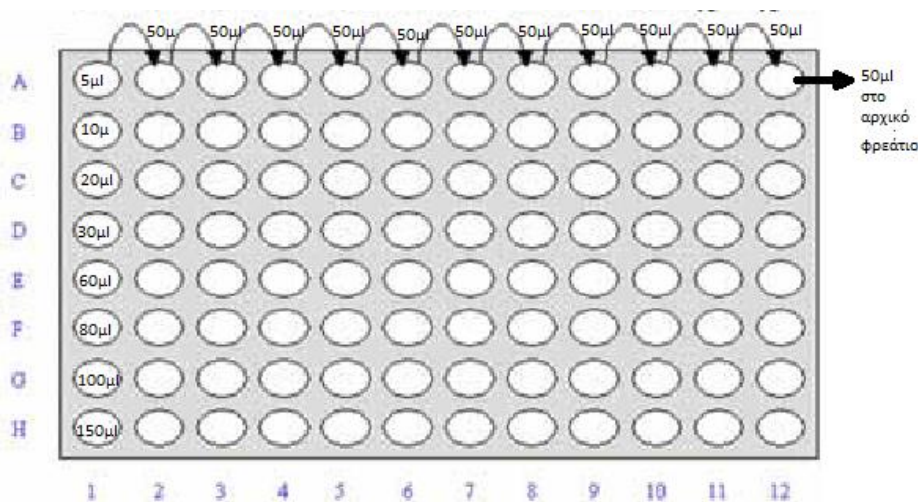
- Κυτταρικοί κλώνοι, οι οποίοι έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο που κατασκευάσαμε και έχουν αναπτυχθεί κάτω από πίεση επιλογής (γενετισίνη)
- Versene
- Τρυψίνη
- Πλάκα 96 φρεατίων

Διαδικασία:

- Μετά τη διαμόλυνση αφήνουμε τα κύτταρα για 48 ώρες να αναπτυχθούν χωρίς την προσθήκη G418, ώστε να εκφράσουν ικανοποιητικά το γονίδιο της αντοχής στην G418. Μετά το πέρας των 48 ωρών, προσθέτουμε την G418 σε συγκέντρωση που υπολογίσαμε (700 µg/ml για τους κλώνους Huh7.5 και 1000 µg/ml για τους κλώνους HepG2), ώστε να ασκηθεί πίεση επιλογής.
- Αλλάζουμε τακτικά το μέσο των καλλιεργειών.
- Μετά από περίπου 15 ημέρες παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν πια ορατές αποικίες κυττάρων στα φρεάτια που περιείχαν τα μετασχηματισμένα κύτταρα, ενώ στα φρεάτια που περιείχαν παράλληλη καλλιέργεια μη μετασχηματισμένων κυττάρων (μάρτυρας) δεν υπήρχαν αποικίες. Στο στάδιο αυτό

συνεχίζουμε να ανανεώνουμε το μέσο, πάντα με την προσθήκη G418, έως ότου παρατηρήσουμε αποικίες να αναπτύσσονται, μετά από μερικές εβδομάδες. Οι αποικίες αυτές πιθανά είναι θετικοί κλώνοι.

- Μεταφέρουμε τις αποικίες που παρατηρήσαμε σε πλάκα 96 φρεατίων και στη συνέχεια πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις, με σκοπό να αποκτήσουμε μονοκλωνικές καλλιέργειες.
- Μετά από κάποιες εβδομάδες, παρατηρούνται οι καλλιέργειες των κυττάρων στο μικροσκόπιο και εκείνες οι οποίες είναι πιο ευκρινείς και στη μεγαλύτερη δυνατή αραιώση μεταφέρονται και ανακαλλιεργούνται έπειτα σε πλάκες 12 φρεατίων, 6 φρεατίων και τέλος σε φιάλες καλλιέργειας 25 cm², ώστε να ενισχυθούν οι κλώνοι για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 40: Απεικόνιση της διαδικασίας των διαδοχικών αραιώσεων των κυτταροσειρών σε πλάκα 96 φρεατίων. Αρχικά, γίνεται κατακρήμνιση της καλλιέργειας της σταθερής κυτταροσειράς σε θερμοκρασία δωματίου σε χαμηλές στροφές. Στη συνέχεια το ίζημα που προκύπτει αναδιαλύεται σε 520 μl μέσου καλλιέργειας. Έπειτα τα φρεάτια των στηλών 2-12 πληρούνται με 150 μl μέσο καλλιέργειας, ενώ στα φρεάτια της στήλης 1 τοποθετούμε σε όγκους που φαίνονται στην εικόνα από το κυτταρικό εναίωρημα και συμπληρώνουμε με μέσο μέχρι τελικού όγκου 150 μl. Οι διαδοχικές αραιώσεις έπειτα, πραγματοποιούνται οριζόντια, μεταφέροντας κάθε φορά 50 μl από το ένα φρεάτιο στο αμέσως επόμενο δεξιά και ούτω καθεξής. Τέλος, από το τελευταίο φρεάτιο (δεξιά), μεταφέρουμε 50 μl στο πρώτο φρεάτιο (αριστερά). Σε όλα τα φρεάτια προστίθεται γενετισίνη σε κατάλληλη συγκέντρωση. Οι κλώνοι που είναι κατάλληλοι για περαιτέρω ανάλυση είναι αυτοί που αναπτύσσονται στη μεγαλύτερη δυνατή αραιώση (όσο το δυνατόν δεξιότερα).

2.12 Μόλυνση κυττάρων με μολυσματικά στελέχη του HCV ιού

Πραγματοποιήσαμε μόλυνση ενός από τους κλώνους που κατασκευάσαμε, καθώς και κυττάρων Huh-7.5 με το μολυσματικό στέλεχος JFH1 καθώς και με το 3a. Πρόκειται για συμπυκνωμένη καλλιέργεια κυττάρων που είναι ήδη μολυσμένη με το στέλεχος και της οποίας ο τίτλος έχει μετρηθεί.

Υλικά:

- Πλήρη θρεπτικά υλικά
- Versene
- Τρυψίνη

- PBS
- Μολυσματικό στέλεχος JFH1
- Μολυσματικό στέλεχος 3a

Διαδικασία:

- Αλλαγή υλικού την προηγούμενη ημέρα από τη μόλυνση
- Πριν από τη μόλυνση παρασκευάζεται θρεπτικό υλικό που περιέχει 1% FCS αντί για 10% και προστίθεται μέσα σε αυτό το μολυσματικό στέλεχος, σε ποσότητα που υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\frac{\text{αριθμός κυττάρων ανά φρεάτιο} \times \text{αριθμός φρεατίων} \times m.o.i. (\text{multiplicity of infection})}{\text{υικός τίτλος}}$$

Εξίσωση 1: Υπολογισμός της ποσότητας του ιού με την οποία θα μολύνουμε την καλλιέργεια

- Διανομή του παραπάνω υλικού στα φρεάτια που βρίσκονται τα κύτταρα σε κατάλληλη ποσότητα και επώαση στον κλίβανο για 4 ώρες
- Αντικατάσταση του υλικού με υλικό που περιέχει 10% FCS
- Επώαση στον κλίβανο για 24, 48, 72 και 96 ώρες
- 2X πλύσεις με PBS
- Προσθήκη 1 ml PBS και απόξεση του πυθμένα των φρεατίων με σκοπό να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε νέο σωληνάριο
- Φυγοκέντρηση σε 11000 rpm για 1 λεπτό
- Αποθήκευση του ιζήματος στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθεί για ανάλυση

2.13 Λύση ευκαρυωτικών κυττάρων με τη χρήση του διαλύματος RIPA

Για να προχωρήσουμε σε ανάλυση πρωτεϊνών, απαραίτητο βήμα είναι η λύση των κυττάρων ώστε να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του RIPA buffer. Αποτελεί ένα ασφαλές αντιδραστήριο το οποίο προκαλεί ρήξη των μεμβρανών χωρίς να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Αυτό το επιτυγχάνει χάρη στο μίγμα συστατικών του που είναι απορρυπαντικές ουσίες. Το αντιδραστήριο περιέχει τα εξής συστατικά:

- 25mM Tris, pH 7–8
- 150 mM NaCl
- 0.1% SDS
- 0.5% δεοξυχολικό νάτριο

- 1% Triton X-100 ή NP-40
- Αναστολείς πρωτεασών, όπως PMSF

Υλικά:

- Φωσφορικό αλατούχο διάλυμα (phosphate buffer saline, PBS)
- Διάλυμα RIPA Thermo Fisher Scientific
- Διαμολυσμένα με pLSD1 κύτταρα HepG2
- Πάγος
- Φυγόκεντρος

Διαδικασία:

- Πλύσεις 2X των φρεατίων με κρύο PBS
- Προσθήκη 140 μl RIPA buffer και απόξεση του πυθμένα των φρεατίων με το ρύγχος της πιπέτας, έως ότου ξεκολλήσουν τα κύτταρα
- Συλλογή του εναιωρήματος του φρεατίου σε σωληνάριο και τοποθέτηση των σωληναρίων στον πάγο
- Προσθήκη επιπλέον 20 μl RIPA buffer στα φρεάτια και συλλογή των εναπομείναντων κυττάρων στα σωληνάκια
- Επώαση στον πάγο για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε 11000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά
- Συλλογή υπερκείμενου που περιέχει τις πρωτεΐνες και ανάλυσή του

2.14 Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων (nuclear extracts) ευκαρυωτικών κυττάρων

Η LSD1 είναι μια πρωτεΐνη η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα. Επομένως μπορούμε να έχουμε πιο δυνατό σήμα LSD1 κατά την ανάλυση, αν απορρίψουμε όλα τα κυτταροπλασματικά συστατικά που παρεμβάλλονται στο σήμα, αν αντί για εκχύλισμα ολικού κυττάρου (whole cell extract) χρησιμοποιήσουμε πυρηνικό εκχύλισμα (nuclear extract).

Υλικά:

- Φωσφορικό αλατούχο διάλυμα PBS
- Διάλυμα A
- Διάλυμα C
- Σύριγγα Hamilton
- Φυγόκεντρος
- Πάγος

	Διάλυμα A	Διάλυμα C
Hepes 1M pH=7,9	10 μ l	20 μ l
MgCl ₂ 1M	1,5 μ l	1,5 μ l
KCl 4M	2,5 μ l	-
NaCl 4M	-	105 μ l
EDTA 0,5M	-	0,4 μ l
DTT 0,5M	1 μ l	-
PMSF 0,25M	2 μ l	-
Glycerol 40%	-	625 μ l
Protease Inhibitor Complete mini, Roche (αναστολέας πρωτεασών)	143 μ l	143 μ l
Phos-stop, Roche (αναστολέας φωσφατασών)	100 μ l	100 μ l
H ₂ O	740 μ l	5,1 μ l

Πίνακας 16: Ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την Παρασκευή 1 ml των διαλυμάτων A και C

Διαδικασία:

- Πλύσεις 2X με κρύο PBS της φιάλης καλλιέργειας που περιέχει τα κύτταρα
- Προσθήκη 3 ml PBS και επώαση για 5 λεπτά στον πάγο
- Απόξεση των κυττάρων και μεταφορά τους σε σωληνάρια των 15 ml
- Μοίρασμα του υγρού σε δύο σωληνάρια
- Φυγοκέντρηση σε 14000 rpm στους 4°C για 20 λεπτά
- Απόρριψη υπερκείμενου
- Πλύση με 1,5 ml κρύου PBS και φυγοκέντρηση σε 14000 rpm στους 4°C για 5 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκείμενου και μέτρηση του όγκου των κυττάρων
- Αναδιάλυση σε ίσο όγκο Buffer A και μεταφορά των περιεχομένων των δύο σωληναρίων σε ένα
- Επώαση για 15 λεπτά στον πάγο
- Λύση των κυττάρων με τη βοήθεια της σύριγγας Hamilton
- Φυγοκέντρηση σε 14000 rpm στους 4°C για 20 δευτερόλεπτα
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 2/3 του όγκου Buffer C
- Επώαση υπό ανάδευση στους 4°C για 30 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε 14000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά
- Συλλογή υπερκείμενου, στο οποίο περιέχονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες

2.15 Μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης με το αντιδραστήριο Bradford

Η δοκιμασία Bradford αναπτύχθηκε από τον Marion Mckinley Bradford το 1976 και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών σε διάλυμα άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford, σε βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών και στη μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης της Coomassie Brilliant Blue G-250, από τα 465 nm (καστανό) στα 595 nm (κυανό), όπου και μετράται φωτομετρικά, όταν αυτή προσδένεται στις ελεύθερες αμινομάδες των

πρωτεϊνών. Η ένταση της οπτικής πυκνότητας είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης, αφού υπάρχουν περισσότερες ελεύθερες αμινομάδες για να προσδεθεί η χρωστική (Bradford M, 1976).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα άγνωστο διάλυμα κατασκευάζουμε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Προσδιορίζουμε δηλαδή την απορρόφηση στο κατάλληλο μήκος κύματος, διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς και στη συνέχεια κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης με βάση την περιεκτικότητα του κάθε διαλύματος. Έτσι αφού προσδιορίσουμε πειραματικά την απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του. Η αλβουμίνη ορού βοός (Bovine serum albumin, BSA) χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη αναφοράς για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Υλικά:

- Αντιδραστήριο Bradford (Biorad)
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) 1X (απόθεμα 10mg/ml New England Biolabs)
- PBS 1X
- Πλάκα 96 φρεατίων
- Φασματοφωτόμετρο Microplate reader (Model 680 Biorad)

Διαδικασία:

- Παρασκευή ενός πρότυπου διαλύματος (working stock) από το οποίο θα κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη, το οποίο αποτελείται από 3,5 μl BSA αραιωμένο σε 346,5 μl PBS 1X
- Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης με την προσθήκη διαφορετικών αναλογικών του πρότυπου διαλύματος και PBS, όπως φαίνεται στον πίνακα 14
- Προσθήκη στα φρεάτια 1 μl από το κάθε δείγμα, αραιωμένο σε 119 μl PBS (αραίωση 1:120)
- Προσθήκη 30 μl από το αντιδραστήριο Bradford στο κάθε φρεάτιο (αραίωση 1:5)
- Ανάδευση των περιεχομένων των φρεατίων με τη χρήση πιπέτας
- Επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Μέτρηση των απορροφήσεων στα 595 nm στο φασματοφωτόμετρο
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης του κάθε δείγματος με βάση την πρότυπη καμπύλη

Πρότυπο διάλυμα (BSA 1x)	PBS 1x	Τελική ποσότητα
0 μl	120 μl	0 μg
6 μl	114 μl	5 μg
12 μl	108 μl	10 μg
18 μl	102 μl	15 μg
24 μl	96 μl	20 μg
30 μl	90 μl	25 μg

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στην πρότυπη καμπύλη

2.16 Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε αναπτύχθηκε από τους Laemmli et al το 1970. Κατά την ηλεκτροφόρηση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος.

Στην ηλεκτροφόρηση, η μετακίνηση πρωτεϊνών εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα των μορίων. Όμως, παρουσία SDS, οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στο SDS, φορτίζονται αρνητικά και έχουν παρόμοιες αναλογίες φορτίου/βάρους. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, αν οι πρωτεΐνες τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, ο διαχωρισμός τους θα εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος και το σχήμα τους. Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν καλύτερα μετά από την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Μετά από τη θέρμανση στους 100°C παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης (που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς) και SDS, οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται και δεσμεύουν περίπου 1,4g SDS/g πρωτεΐνης. Με λίγα λόγια, το ποσό του SDS που δεσμεύουν οι πρωτεΐνες είναι ανάλογο του μοριακού τους βάρους και επομένως η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα θα εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος (Laemmli UK, 1970).

Στον πίνακα 15 φαίνονται οι κατάλληλες συγκεντρώσεις πηκτώματος ακρυλαμίδης ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία παρασκευάσαμε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 10%. Πάνω από την πηκτή διαχωρισμού επιστιβάχθηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης (5%) χαμηλότερης συγκέντρωσης και με χαμηλότερο pH.

Συγκέντρωση πηκτώματος ακρυλαμίδης (% w/v)	Μοριακό βάρος προς διαχωρισμό πρωτεϊνών
15	10 – 43 Kd
12	12 – 60 Kd
10	20 – 80 Kd
7.5	36 – 94 Kd
5.0	57 – 212 kD

Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις πηκτώματος ακρυλαμίδης σύμφωνα με τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών

(ml)	Πήκτωμα διαχωρισμού 10%	Πήκτωμα επιστήβαξης 5%
Ακρυλαμίδη 29:1	6,7	1,3
Tris 1,5M pH=8,8	5,0	-
Tris 1,0M pH=6,8	-	1,0
SDS 10%	0,2	0,08
APS	0,2	0,08
TEMED	0,008	0,008
H ₂ O	7,9	5,5
Τελικός όγκος	20	8

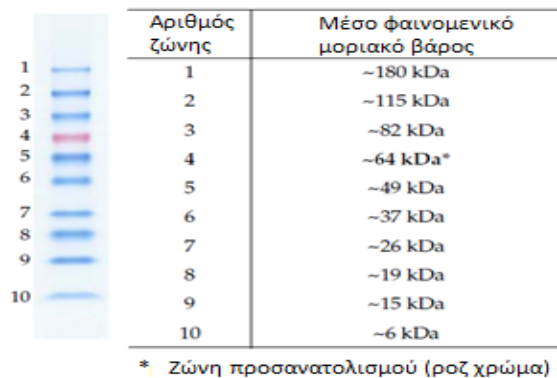
Πίνακας 19: Αντιδραστήρια για την παρασκευή πηκτώματος ακρυλαμίδης

Υλικά:

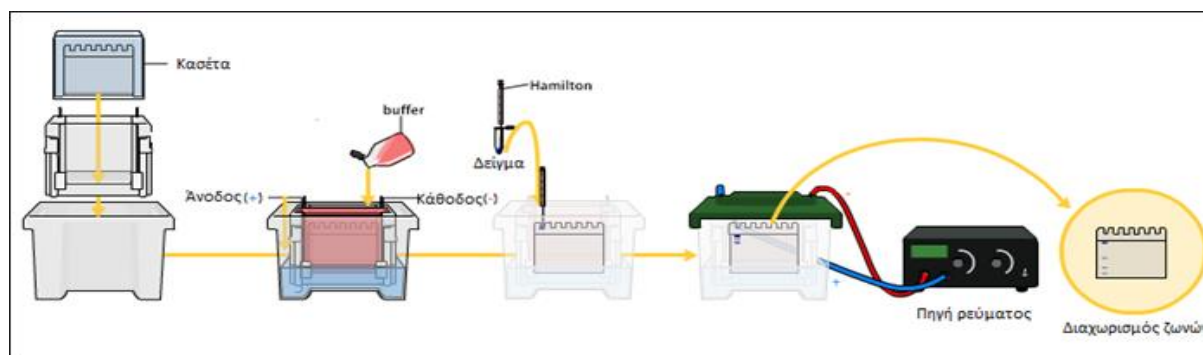
- Ακρυλαμίδη 29:1 (29% (w/v) ακρυλαμίδη – 1% (w/v) bis ακρυλαμίδη σε dH₂O)
- Tris 1,5M pH=8,8 (90,83g Trizma base σε dH₂O – ρύθμιση pH με πυκνό HCl – dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500ml)
- Tris 1,0M pH=6,8
- SDS 10% (10g SDS – dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100ml)
- Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate, APS)
- TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη)
- dH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης (25mM Tris - 250mM γλυκίνη – 0,1% (w/v) SDS)
- Sample buffer 2x (4% (w/v) SDS – 0,2% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης – (10% (v/v) Tris-Cl 1M pH=8 – 20% (v/v) γλυκερόλη)
- Διάλυμα χρωστικής Dye 2x για πρωτεΐνες (Sample buffer – 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών (Benchmark)

Διαδικασία:

- Αφού συναρμολογήσουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης (εικόνα 14), παρασκευάζουμε το διάλυμα διαχωρισμού το οποίο τοποθετείται στη συσκευή με τη βοήθεια σύριγγας των 60ml. Το αφήνουμε να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να προκύψει το πήκτωμα διαχωρισμού
- Στη συνέχεια, προσθέτουμε το διάλυμα επιστίβαξης με σύριγγα των 10ml, τοποθετούμε γρήγορα το χτενάκι (1,5 mm) και αφήνουμε το διάλυμα να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να προκύψει το πήκτωμα επιστίβαξης
- Αφαιρούμε το χτενάκι και προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-γλυκίνης τόσο στην άνοδο, όσο και στην κάθοδο.
- Προσθήκη στα δείγματα μας 1/2 του όγκου που θέλουμε να φορτώσουμε διάλυμα χρωστικής Dye 2x και θέρμανση στους 100°C για 3 λεπτά.
- Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια
- Παράλληλα με τα δείγματα μας μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και μάρτυρα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Εικόνα 13), όπως Benchmark της Invitrogen (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5 mM EDTA, 10 mM 1,4-διθειοθρεϊτόλη (1,4-Dithiothreitol, DTT), 1% (w/v) SDS, 10% (w/v) γλυκερόλη)
- Εφαρμογή τάσης ρεύματος στα 120V για 2,5 ώρες.



Εικόνα 41: Benchmark (Invitrogen) μοριακά βάρη πρωτεϊνών



Εικόνα 42: Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

2.17 Ανοσοσύπωση τύπου Western

Ο όρος «σύπωμα» αναφέρεται στην μεταφορά βιολογικών δειγμάτων από ένα πήκτωμα σε μεμβράνη και την επακόλουθη ανίχνευσή τους στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η τεχνική Western blotting (που ονομάζεται επίσης ανοσοσύπωση επειδή ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται για να ανιχνεύσει ειδικά το αντιγόνο του) εισήχθη από τους Towbin, et al. το 1979 και τώρα είναι μια τεχνική ρουτίνας για την ανάλυση πρωτεϊνών. Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης αντισώματος-αντιγόνου επιτρέπει στην πρωτεΐνη-στόχο, να ταυτοποιηθεί σε ένα σύνθετο μίγμα πρωτεϊνών. Η ανοσοσύπωση τύπου Western μπορεί να παράγει ποιοτικά και ημιποσοτικά δεδομένα σχετικά με αυτή την πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες, μετά το διαχώρισμό τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνη ή PVDF). Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται υπό τη μορφή συμπλόκου με το SDS και είναι αρνητικά φορτισμένες μεταφέρονται από το πήκτωμα προς τη μεμβράνη με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κάθετα προς τις δύο επιφάνειες (Towbin H et al., 1979).

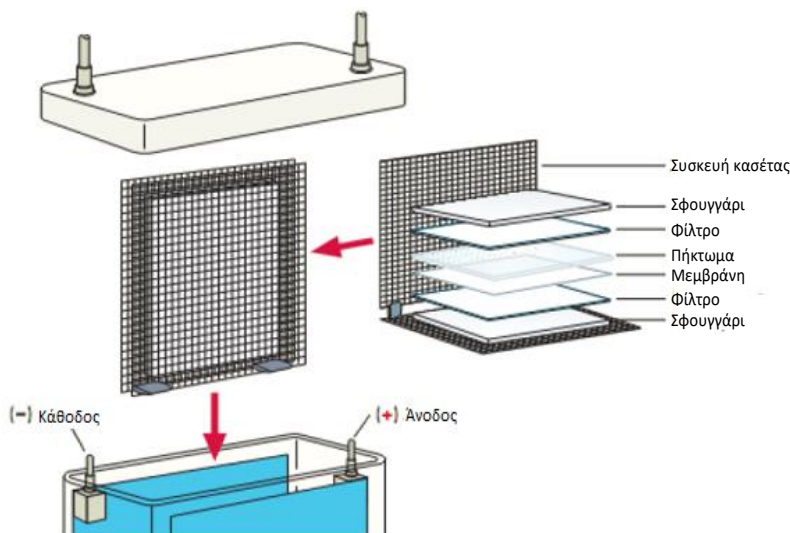
Υλικά:

- Χαρτιά Whatman 1mm
- Μεμβράνη Amersham Protran BA, 100% νιτροκυτταρίνη με μέγεθος πόρου 0,45 μm GE Healthcare Life Sciences
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, transfer buffer pH=8.3 (39mM γλυκίνης - 48 mM Tris - 0,037% (w/v) SDS - 20% (v/v) μεθανόλη)
- Ponceau S (0,2% (w/v) Ponceau S - 3% (w/v) τριχλωροξικό οξύ)

Πειραματική διαδικασία:

- Για την ηλεκτροφορητική μεταφορά υγρού τύπου, χρησιμοποιούμε χαρτιά Whatman και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ώστε να κατασκευάσουμε το σάντουιτς μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη
- Διαβρέχουμε τα χαρτιά Whatman, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer)
- Τοποθετούμε διαδοχικά δύο χαρτιά Whatman, το πήκτωμα, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλα δύο χαρτιά Whatman. Το σάντουιτς τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς με προσοχή ώστε η νιτροκυτταρίνη να είναι τοποθετημένη προς την άνοδο, αφού οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες
- Ρυθμίζουμε την ένταση του ρεύματος σταθερά στα 300mA για 3 ώρες στους 4°C

- Ελέγχουμε την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των πρωτεϊνών με χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S. Ταυτόχρονα σημειώνουμε τις θέσεις του δείκτη μοριακού βάρους. Η χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau S απομακρύνεται μετά από επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απιονισμένο νερό



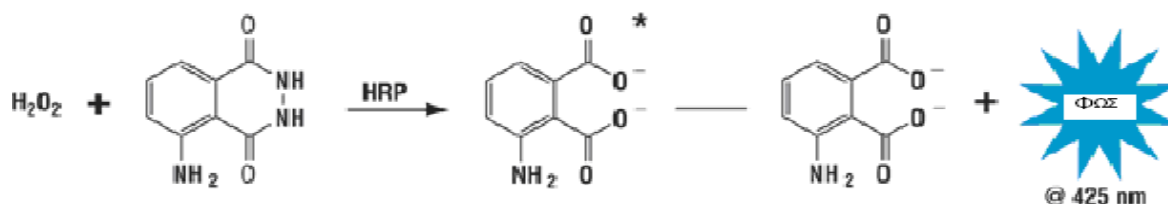
Εικόνα 43: Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

2.18 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, στην επιφάνεια της οποίας έχει εντυπωθεί το πρότυπο των πρωτεϊνικών ζωνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για ανοσοοστύπωση προκειμένου να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Αρχικά, η πρωτεΐνη ανιχνεύεται από αντίσωμα με ειδικότητα έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα με ειδικότητα έναντι του πρώτου αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με ειδικό μόριο ανίχνευσης, την υπεροξειδάση (*horseradish peroxidase*, HRP). Η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει ανιχνεύεται μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος μέσω χημειοφωταύγειας μαζί με ενισχυτικούς παράγοντες για την παραγωγή φωτός στην περιοχή της πρωτεΐνης. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται σε φωτογραφικό φιλμ.

Χημειοφωταύγεια είναι η διαδικασία κατά την οποία απελευθερώνεται ενέργεια υπό τη μορφή φωτός μετά από μια χημική αντίδραση. Το Luminol είναι το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας. Η οξείδωσή του από το υπεροξείδιο του υδρογόνου οδηγεί στη δημιουργία ενός διηγερμένου προϊόντος, του 3-aminophthalate. Το προϊόν αυτό στη συνέχεια διασπάται προς ένα προϊόν

χαμηλότερης ενέργειας απελευθερώνοντας φωτόνια. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στην αντίδραση της εικόνας παρακάτω.



Εικόνα 44: Η αντίδραση της χημειοφωταύγειας

Υλικά:

- TBS 10x (60,6g Tris base-87,6g NaCl σε 1000ml dH₂O pH 7,6)
- TBST 1x(50ml TBS 10x – dH₂O μέχρι τελικό όγκο 500ml-0.05% ή 0.1% Tween-20)
- BSA (Bovine Serum Albumine)
- Διάλυμα κορεσμού, blocking solution (5% (w/v) χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε TBST 1x ή 3% ή 5% BSA σε TBST 1x)
- Διάλυμα έκπλυσης (TBST 1x ή 1% (w/v) χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε TBST 1x ή 0,3% BSA σε TBST 1x)
- Διάλυμα TBST 1x με 5% BSA
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ιστόνης H3 (Rabbit mAb, Cell Signaling)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης LSD1 (Rabbit mAb, Cell Signaling)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακτίνης (παρασκευάστηκε σε ποντίκια)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-rabbit (Chemicon)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-mouse (Chemicon)
- Ειδικό διάλυμα SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- Φιλμ (X-Ray film, Fuji medical)
- Διάλυμα εμφάνισης φιλμ Development (Kodak) (50mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο)
- Διάλυμα μονιμοποίησης φιλμ Fixer (Kodak) (50mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200mL. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο)

Πρωτογενές Αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Διάλυμα αναδιάλυσης	Εταιρία
LSD1 (C69G12) Rabbit mAb, μονοκλωνικό	Κουνέλι	5% κ.ο. BSA σε 1x TBS, 0,1%Tween 20 (1:1000)	Cell Signaling Technology
Histone H3 (D1H2) XP® Rabbit mAb, μονοκλωνικό	Κουνέλι	5% κ.ο. αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά σε 1x TBS, 0,1%Tween 20 (1:500)	Cell Signaling Technology
Ακτίνη, μονοκλωνικό	Ποντίκι	5% κ.ο. BSA σε 1x TBS, 0,1%Tween 20 (1:5000)	Παρασκευάστηκε σε ποντίκια

Πίνακας 20: Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Δευτερογενές Αντίσωμα	Διάλυμα αναδιάλυσης	Εταιρία
Anti-Rabbit	5% κ.ο. αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά σε 1x TBS, 0,1%Tween 20 (1:25000)	Chemicon
Anti-Mouse	5% κ.ο. αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά σε 1x TBS, 0,1%Tween 20 (1:1000)	Chemicon

Πίνακας 21: Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Διαδικασία:

Κορεσμός των μη ειδικών θέσεων αναγνώρισης του αντισώματος:

- Παρασκευή του διαλύματος κορεσμού (blocking solution). Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, έτσι ώστε να παρεμποδιστεί η επακόλουθη μη ειδική πρόσδεση των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων στις θέσεις αυτές.
Επιάζουμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με 10ml διαλύματος κορεσμού για 1h, υπό συνεχή ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου.

Δέσμευση 1ου αντισώματος:

- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για 16-18h στους 4 ° C με το 1^ο αντίσωμα (έναντι της LSD1, που είναι το πρωτογενές αντίσωμα, ή της ακτίνης ή της ιστόνης H3 που είναι οι πρωτεΐνες αναφοράς, για τα κυτταρικά και τα πυρηνικά εκχυλίσματα αντίστοιχα), υπό συνεχή ανακίνηση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει και δεσμεύεται με τους επιτόπους του. Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:1000 για την LSD1, 1:1500 για την ιστόνη H3 και 1:5000 για την ακτίνη και αναδιαλύεται στο αντίστοιχο διάλυμα.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης. Οι εκπλύσεις διαρκούν 10min και επαναλαμβάνονται τρεις φορές.

Προσθήκη 2ου αντισώματος:

- Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το 2^ο αντίσωμα (anti-rabbit ή anti-mouse ανάλογα με το 1^ο αντίσωμα) για 1h, υπό συνεχή ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση μαύρου ραπανιού (Horse Radish Peroxidase). Το anti-Mouse χρησιμοποιείται συνήθως σε αραιώση 1:1000 και το anti-Rabbit χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:20000. Τα δύο αντισώματα διαλύονται σε διάλυμα κορεσμού (blocking buffer).
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης. Οι εκπλύσεις διαρκούν 10min και επαναλαμβάνονται τρεις φορές.

Ανίχνευση του σήματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας:

- Επώαση της μεμβράνης για 3min με το διάλυμα SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate. Στη συνέχεια τοποθέτησή της στην ειδική κασετίνα εμφάνισης.
- Στο σκοτεινό θάλαμο, κόβεται κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με την μεμβράνη, τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη και η κασετίνα κλείνεται.
- Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα μερικά λεπτά.
- Στη συνέχεια το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης (Development) για μερικά λεπτά έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες και τοποθετείται στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer).
- Τέλος, το φιλμ πλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

2.19 Απομόνωση RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα

Ένας ακόμη τρόπος να ελέγξουμε την έκφραση ενός γονιδίου, πέρα από την ανάλυση των πρωτεϊνών, είναι και η ανάλυση του RNA. Για να αναλύσουμε το RNA αρχικά θα πρέπει να απομονώσουμε το ολικό RNA των κυττάρων της καλλιέργειας. Η εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TRIzol Reagent. Πρόκειται για ένα μονοφασικό διάλυμα, το οποίο περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανικό

γουανίδιο, με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται ταυτόχρονα ομογενοποίηση των κυττάρων και αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Έπειτα, με τα επόμενα βήματα που θα αναλυθούν και παρακάτω, γίνεται ο διαχωρισμός του RNA από τα υπόλοιπα συστατικά (Rio DC et al., 2010).

Υλικά:

- TRIzol Invitrogen
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- CH₃COONa
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 75%
- H₂O ελεύθερο από RNάσες
- PBS
- Πάγος
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος
- Αντλία κενού SpeedVac

Διαδικασία:

- Πλύση με PBS τα κύτταρα που βρίσκονται στον πυθμένα του φρεατίου της πλάκας
- Προσθήκη 200 μl TRIzol ανά φρεάτιο με ταυτόχρονη απόξεση των κυττάρων από την επιφάνεια και μεταφορά τους σε σωληνάρια
- Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 20 μl χλωροφόρμιο
- Έντονη ανάδευση (vortex) και παραμονή στον πάγο για 5 λεπτά
- Φυγοκέντρηση σε 15000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά
- Σχηματισμός τριών διακριτών φάσεων μετά τη φυγοκέντρηση. Μεταφορά της επάνω (υδατικής) φάσης που φέρει το RNA σε νέο σωληνάριο και μέτρηση του όγκου
- Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης, 1/5 του όγκου CH₃COONa και 1/10 του όγκου γλυκογόνου
- Έντονη ανάδευση (vortex) και παραμονή στους -20°C ολονύκτια (overnight)
- Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C για 20 λεπτά
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Αναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μl αιθανόλη 75% και σύντομη ανάδευση (vortex)
- Φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C για 20 λεπτά
- Απόρριψη υπερκειμένου
- Τοποθέτηση στο κενό για 3-4 λεπτά ώστε να στεγνώσει το ίζημα
- Αναδιάλυση σε 20 μl H₂O RNase free

- Μέτρηση στο NanoDrop

2.20 Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription)

Οι αντίστροφες μεταγραφάσες ανακαλύφθηκαν το 1970 από τους H. Temin και D. Baltimore, ταυτόχρονα και ανεξάρτητα. Πρόκειται για ένζυμα τα οποία καταλύουν τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA), χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο RNA, διαδικασία η οποία ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή. Εκφράζονται κυρίως από ρετροϊούς, αλλά και από άλλους ιούς όπως ο ιός της ηπατίτιδας B (HBV). Η ανακάλυψη του ενζύμου οδήγησε στη διαμόρφωση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας στη σημερινή του μορφή και χάρισε στους δύο ερευνητές το Νόμπελ ιατρικής το 1975 (Tu X et al., 2010).

Η αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) M-MLV (Moloney-Murine leukemia virus) παράγεται ως ένα κλωνοποιημένο ένζυμο που προέρχεται από σύμπτυξη του γονιδίου *trpE* του *Escherichia coli* με την κεντρική περιοχή του γονιδίου *pol* του M-MLV. Το ένζυμο αυτό είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA ή DNA παρουσία εκκινητή, ώστε να συνθέσει ένα συμπληρωματικό κλώνο DNA (Roth MJ et al., 1985). Η μέθοδος που χρησιμοποιεί το ένζυμο βρίσκει πολλές εφαρμογές, μεταξύ αυτών και την *in vitro* σύνθεση cDNA κλώνων από συγκεκριμένες RNA αλληλουχίες. Τα παράγωγα cDNA χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της δομής, οργάνωσης και έκφρασης προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών γονιδίων (Quinones-Coello AT et al., 2006).

Σκοπός μας στην παρούσα εργασία είναι η δημιουργία cDNA από το RNA των δειγμάτων και στη συνέχεια ανάλυση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων με χρήση της μεθόδου PCR (αναλύεται παρακάτω).

Υλικά:

- RNA των δειγμάτων που απομονώθηκε κατά το προηγούμενο στάδιο
- M-MLV Reverse Transcriptase της Promega
- dNTPs (dATP 10mM, dGTP 10mM, dTTP 10mM, dCTP 10mM)
- H₂O RNase-free
- M-MLV 5X reaction buffer (250mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C) 375mM KCl 15mM MgCl₂ 50mM DTT)
- RNAsin (αναστολέας ριβονουκλεασών)

- Τυχαίοι εκκινητές (Random primers)
- Θερμοκυκλοποιητής
- Πάγος

Διαδικασία:

- Προσθήκη σε σωληνάριο για PCR του RNA, των τυχαίων εκκινητών και των dNTPs σε ποσότητες που υπολογίστηκαν και παρατίθενται στον πίνακα 17 (διάλυμα 1)
- Θέρμανση στον θερμοκυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά με σκοπό την αποδιάταξη του RNA και την υβριδοποίηση των τυχαίων εκκινητών
- Προσθήκη στο διάλυμα 1 το διάλυμα 2 στον πάγο, το οποίο παρασκευάσαμε κατά τη διάρκεια του σταδίου θέρμανσης του διαλύματος 1. Το διάλυμα 2 περιέχει το ρυθμιστικό buffer, το RNasin και την M-MLV, σε ποσότητες που υπολογίστηκαν και παρατίθενται στον πίνακα 18
- Ήπια ανάδευση (short spin)
- Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή, στις συνθήκες που παρατίθενται στον πίνακα παρακάτω

Διάλυμα 1	
RNA	1 µg
Random primers	1 µl
H ₂ O RNase-free	Έως τελικού όγκου 13,5 µl

Πίνακας 22: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την Παρασκευή του διαλύματος 1

Διάλυμα 2	
5X διάλυμα αντίδρασης	4 µl
dNTPs 10X	4 µl
RNasin (Αναστολέας ριβονουκλεασών)	0,5 µl
M-MLV Reverse Transcriptase	1 µl
H ₂ O RNase-free	Έως τελικού όγκου 6,5 µl

Πίνακας 23: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την Παρασκευή του διαλύματος 2

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη	70°C	5 λεπτά
Πολυμερισμός	37°C	1 ώρα
Απενεργοποίηση ενζύμου	94°C	2 λεπτά
Διατήρηση	4°C	∞

Πίνακας 24: Συνθήκες της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής

2.21 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αναπτύχθηκε το 1983 από τον Karry Mullis, και χάρη σε αυτή τη μέθοδο επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός τμήματος DNA σε μία *in vitro* ενζυμική αντίδραση, δίνοντας μια καινούρια προοπτική για τη μελέτη και την ανάλυση γονιδίων. η βασική ιδέα για την ανάπτυξη της PCR μεθόδου βασίζεται στην ανάγκη ταυτοποίησης τμημάτων DNA, προκαλώντας τεχνητά την αύξηση της ποσότητάς του όταν αυτό βρίσκεται σε πολύ μικρή, μη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση (Mullis KB et al., 1987).

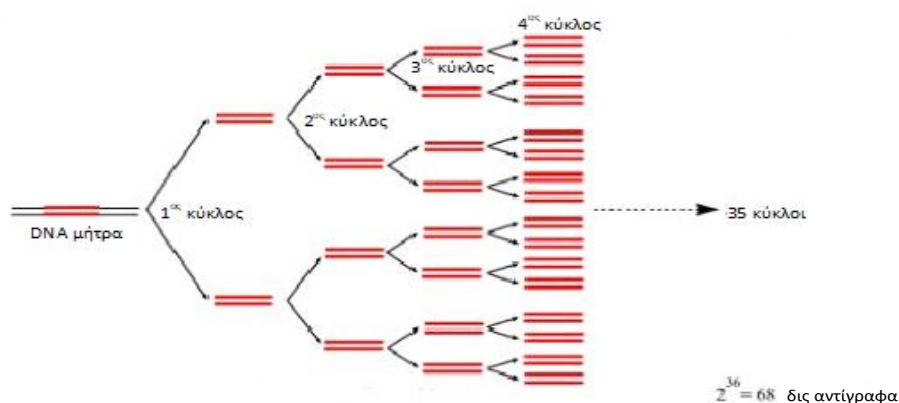
Η PCR βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να αντιγράφει έναν κλώνο DNA μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές-ολιγονουκλεοτίδια (primers), μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων σύνθεσης DNA. Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA εκμαγείου, επομένως κρίνεται απαραίτητο πριν από την αντίδραση να είναι γνωστά τα όρια της προς ανάλυση αλληλουχίας. Συνήθως, το μέγεθος του τμήματος DNA που χρησιμοποιείται για διαγνωστικές εξετάσεις είναι μεταξύ 100-1000 βάσεις. Η αντίδραση τυπικά περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε θερμικός κύκλος αποτελείται από 3 στάδια, τα οποία απεικονίζονται και στην εικόνα 17:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου συνήθως σε συνθήκες 94-96°C για 20-60 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο αυτό οι δύο κλώνοι διαχωρίζονται μεταξύ τους, ώστε να μπορούν να υβριδοποιηθούν με τους εκκινητές.
- Υβριδοποίηση εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες, συνήθως σε συνθήκες 50-65°C για 20-60 δευτερόλεπτα, μειώνεται δηλαδή η θερμοκρασία ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις συμπληρωματικές αλυσίδες-στόχους.
- Επέκταση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση του DNA με κατεύθυνση 5'-3', τυπικά σε 72°C για 0,5-2 λεπτά.

Πολλές φορές μετά το τέλος των κύκλων της PCR ακολουθεί ένα τελευταίο στάδιο, αυτό της τελικής επέκτασης των εκκινητών, που ελέγχει τυχόν λάθη στην προσθήκη νουκλεοτιδίων και καλύπτει κενά με ελεύθερα νουκλεοτίδια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα όργανα, τους θερμοκυκλοποιητές. Οι εκκινητές επεκτείνονται σύμφωνα με τη συμπληρωματική αλυσίδα με την οποία υβριδοποιούνται, με τη διαδοχική προσθήκη dNTPs υπό την ενζυμική κατάλυση μιας DNA πολυμεράσης. Το προϊόν επιμήκυνσης του εκκινητή από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, η θερμοκρασία στη συσκευή μειώνεται στους 40C ώστε τα προϊόντα να διατηρηθούν (Cheng S et al., 1994).

Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης PCR ο αριθμός των αρχικών αντιγράφων θεωρητικά διπλασιάζεται μιας και η αύξηση είναι εκθετική. Αν η απόδοση της PCR είναι 100%, τότε μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2^n αντίγραφα της αλληλουχίας που καθορίζεται από τους εκκινητές. Όμως στην πραγματικότητα η απόδοση της PCR δεν είναι 100%, καθώς αυτή είναι ανάλογη του αρχικού αριθμού των αντιγράφων. Επίσης στα τελευταία στάδια η αντίδραση φτάνει σε πλατώ λόγω της εξάντλησης των αντιδραστηρίων ή της αδρανοποίησης της πολυμεράσης. Η χρήση της PCR ενέχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως:

- Παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα και
- Η αντίδραση μπορεί να γίνει με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA ή πολύ κακής ποιότητας DNA (Saiki R et al., 1988).



Εικόνα 45: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Thermofischer Scientific).

2.21.1 PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative PCR, qPCR) είναι μια μοριακή τεχνική που βασίζεται στην PCR, η οποία ελέγχει την ποσότητα του DNA σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή κατά τη διάρκεια της PCR και όχι στο τέλος αυτής, όπως συμβαίνει με την απλή PCR. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποσοτικά ή και ημιποσοτικά. Δύο είναι οι συνήθεις τρόποι ανίχνευσης των προϊόντων σε μια real-time PCR. Ο πρώτος περιλαμβάνει φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες παρεμβάλλονται σε οποιαδήποτε δίκλινα μόρια DNA μη ειδικά. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι φέρουν ένα φθορίζον μόριο που επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδισμό του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του αλληλουχία. Η διαδικασία είναι όπως αυτή της απλής PCR, με την προσθήκη ενός φθοροφόρου στο μίγμα της PCR, καθώς και με τη χρήση ενός θερμοκυκλοποιητή που να διαθέτει αισθητήρες για τη μέτρηση του φθορισμού μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Η Real time PCR βρίσκει πολλές εφαρμογές, τόσο στο χώρο της διάγνωσης όσο και στο χώρο της έρευνας, χρησιμοποιείται δε και στη βιομηχανία, καθώς και στην περιβαλλοντική βιολογία. Στην έρευνα η βασικότερη εφαρμογή της είναι η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης του LSD1 στις σταθερές κυτταροσειρές που παρασκευάσαμε.

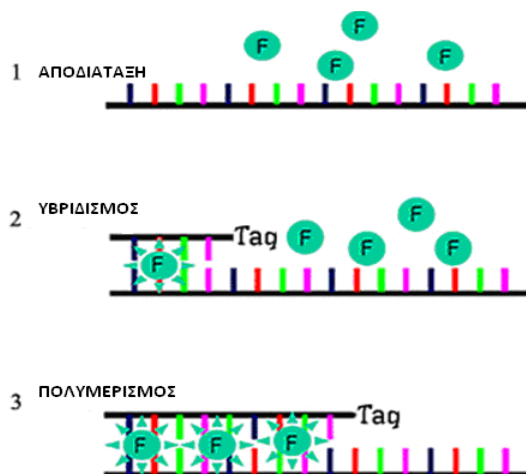
Οι πιο καινοτόμες μέθοδοι για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης είναι η Real-Time PCR και τα DNA μόρια-ανιχνευτές (DNA micro-arrays). Παλαιότερα για την ποσοτικοποίηση του mRNA χρησιμοποιούνταν άλλες μέθοδοι, μεταξύ αυτών η ανοσοσύτωση τύπου Northern, τεχνική που χρησιμοποιείται ακόμη σήμερα. Ωστόσο η τεχνική αυτή παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα, καθώς πρόκειται για μια χρονοβόρα μέθοδο, με μειωμένη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση, που απαιτεί τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων mRNA (Pfaff MW et al., 2005).

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να μετρηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η απόλυτη ποσοτικοποίηση κατά την οποία δίνεται ο ακριβής αριθμός των DNA μορίων, μέσω σύγκρισης των δειγμάτων με μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Ο δεύτερος τρόπος είναι η σχετική ποσοτικοποίηση, η οποία βασίζεται σε εσωτερικά γονίδια αναφοράς. Τα γονίδια αυτά χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των μη ειδικών μεταβολών στην έκφραση, όπως οι διαφορές στην ποσότητα και την ποιότητα του mRNA που απομονώθηκε και κατ' επέκταση του cDNA που προέκυψε από αυτό μέσω αντίστροφης μεταγραφής (Bar T et al., 2011). Η σχετική ποσοτικοποίηση είναι ευκολότερη από την απόλυτη ποσοτικοποίηση, καθώς δεν απαιτείται καμπύλη βαθμονόμησης και η ποσότητα του mRNA του προς μελέτη γονιδίου συγκρίνεται ως προς την ποσότητα του mRNA του γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κανονικοποίηση

(normalization) και το γονίδιο αναφοράς ονομάζεται γονίδιο κανονικοποίησης (normalizing gene). Συνήθως για το ρόλο αυτό επιλέγονται γονίδια οικιακής οικονομίας (housekeeping genes), τα οποία είναι γονίδια που χρησιμοποιούνται σε ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου και χαρακτηρίζονται από σταθερή και απανταχού κυτταρική έκφραση. Τέτοια γονίδια είναι αυτά του κυτταρικού σκελετού, όπως η τουμπουλίνη, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την έκφραση των κυτταρικών γονιδίων, όπως τα ριβοσωμικά γονίδια(306). Σύμφωνα με τα παραπάνω, το γονίδιο που επιλέξαμε ως γονίδιο αναφοράς είναι το 18S.

Το κύριο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήσαμε για τις Real-Time PCR είναι το KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit, το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων, εκτός από το DNA μήτρα και τα μόρια-εκκινητές. Τα συστατικά αυτά είναι το χλωριούχο μαγνήσιο σε κατάλληλη συγκέντρωση, που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου πολυμεράση, τη χρωστική SYBR Green I σε κατάλληλη για την αντίδραση συγκέντρωση και την πολυμεράση KAPA SYBR FAST DNA Polymerase.

Η πολυμεράση που είναι ενσωματωμένη στο KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit είναι ειδικά σχεδιασμένη για αντιδράσεις Real-Time PCR οι οποίες χρησιμοποιούν τη χρωστική SYBR Green I. Η πολυμεράση αυτή δε διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και για την ενεργοποίησή της απαιτείται πριν τους κύκλους της PCR ένα αρχικό βήμα κατά το οποίο η πολυμεράση ενεργοποιείται με την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας πριν από το βήμα της αποδιάταξης του DNA. Έτσι παρεμποδίζεται ο σχηματισμός παραπροϊόντων ή διμερών εκκινητών (primer dimmers) που μπορεί να σχηματιστούν πριν από το στάδιο της αποδιάταξης. Η χρωστική SYBR Green I είναι μια χρωστική κυανίνης, μοριακής μάζας 509,73 g/mol, η οποία δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και σε μικρότερο βαθμό σε μονόκλωνο DNA και σε RNA. Το σύμπλοκο SYBR Green-DNA που προκύπτει απορροφά το μπλε φως (497 nm) και εκπέμπει πράσινο (520 nm). Η SYBR-Green λόγω της ειδικής της δέσμευσης στο δίκλωνο DNA έχει ενσωματωθεί σε πολλές μεθόδους, μεταξύ αυτών στην ηλεκτροφόρηση, στη μικροσκοπία φθορισμού, στην κυτταρομετρία ροής, καθώς και στη real-time PCR (Mackay IM et al., 2002).



Εικόνα 46: SYBR Green

Υλικά:

- Μόρια εκκινητές που παρατίθενται στον πίνακα 24
- KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit
- H₂O
- Θερμοκυκλοποιητής

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
qLSD1-Forward (100 μM)	5'-GCTCGGGGCTCTTATTCC-3'	224 bp
qLSD1-Reverse (100μM)	5'-ATTGCAGACCAGTTTTTGGG-3'	
q18S-Forward (100μM)	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' (Tsitoura E et al., 2009)	
q18S-Reverse (100μM)	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3' (Tsitoura E et al., 2009)	
qNS3-JFH1-Forward (100μM)	5'-CTGCCACCCTGGGGTTTGGG-3'	140 bp
qNS3-JFH1-Reverse (100μM)	5'-GCAGCCCCCATCGGCGAGAA-3'	
qNS3-3a-Forward (100μM)	5'- GCAGCGGTAAGAGCACAAG-3'	118 bp
qNS3-3a-Reverse (100μM)	5'-TAGGCACGCGACATGAAAGA-3'	

Πίνακας 25: Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Μελέτη του επιγενετικού παράγοντα LSD1 στη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε αντίδραση, καθώς και οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης Real-Time PCR:

A) Μελέτη της έκφρασης του LSD1:

Αντιδραστήρια (μl)	
LSD1 Forward primer (100μM)	0,06 (400nM)
LSD1 Reverse primer (100μM)	0,06 (400nM)
SYBR Green (2X)	7,5 (1X)
H ₂ O	4,38
cDNA	3
Τελικός όγκος	15

Πίνακας 26: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την LSD1 Real-Time PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95oC	3min	1
Αποδιάταξη	95oC	15sec	40
Υβριδισμός	55oC	15sec	
Πολυμερισμός	72oC	15sec	
Τελικός πολυμερισμός	72oC	5min	1
Διατήρηση	4oC	-	-

Πίνακας 27: Συνθήκες της αντίδρασης LSD1 Real-Time PCR

B) Μελέτη της έκφρασης του 18S rRNA:

Αντιδραστήρια (μl)	
18S Forward primer (100μM)	0,06 (400nM)
18S Reverse primer (100μM)	0,06 (400nM)
SYBR Green (2X)	7,5 (1X)
H ₂ O	4,38
cDNA	3
Τελικός όγκος	15

Πίνακας 28: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την 18S Real-Time PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95oC	3min	1
Αποδιάταξη	95oC	15sec	30
Υβριδισμός	55oC	20sec	
Πολυμερισμός	72oC	20sec	
Τελικός πολυμερισμός	72oC	5min	1
Διατήρηση	4oC	-	-

Πίνακας 29: Συνθήκες της αντίδρασης 18S Real-Time PCR

Οι συνθήκες της Real-Time PCR της NS3, τόσο του JFH1 όσο και του 3a είναι κοινές και φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Αντιδραστήρια (μl)	
NS3-JFH1/3a Forward primer (100μM)	0,06 (400nM)
NS3-JFH1/3a Reverse primer (100μM)	0,06 (400nM)
SYBR Green (2X)	7,5 (1X)
H ₂ O	4,38
cDNA	3
Τελικός όγκος	15

Πίνακας 30: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις NS3-JFH1 και NS3-3a Real-Time PCRs

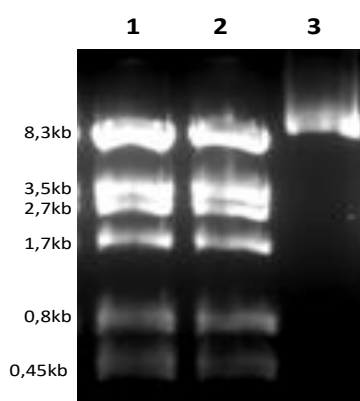
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	3min	1
Αποδιάταξη	95°C	20sec	30
Υβριδισμός	55°C	20sec	
Πολυμερισμός	72°C	30sec	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Πίνακας 31: Συνθήκες των αντιδράσεων NS3-JFH1 και NS3-3a Real-Time PCRs

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κατασκευή του DNA μάρτυρα (DNA marker) pRB2017.

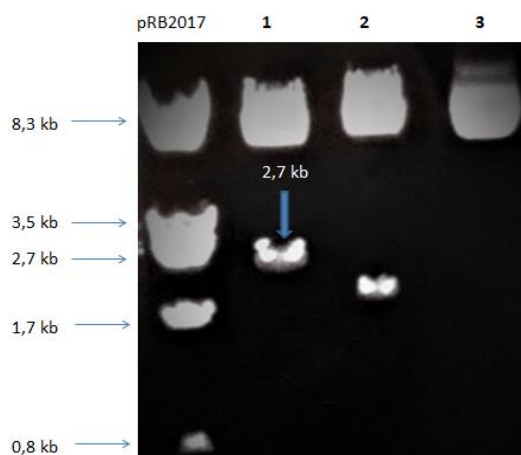
Για την κατασκευή του DNA μάρτυρα που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα πραγματοποιήσαμε διπλή πέψη του πλασμιδίου pRB2017 με τα περιοριστικά ένζυμα PstI και XhoI, τα οποία διατηρούν την ενεργότητά τους στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και στην ίδια θερμοκρασία. Έπειτα, για να ελέγξουμε την αντίδραση πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος των πέψεων μαζί με δείγμα από τον παλιό μάρτυρα, ώστε να συγκρίνουμε τα μεγέθη των ζωνών.



Εικόνα 47: Έλεγχος της παρασκευής του DNA μάρτυρα pRB2017. Μετά τη διπλή πέψη συγκρίναμε το προϊόν (2) με δείγμα από παλιό μάρτυρα (1), ως προς το μέγεθος των ζωνών. Επίσης, ηλεκτροφορήσαμε και δείγμα από το άκοπο πλασμίδιο pRB2017 ως μάρτυρα ελέγχου (3).

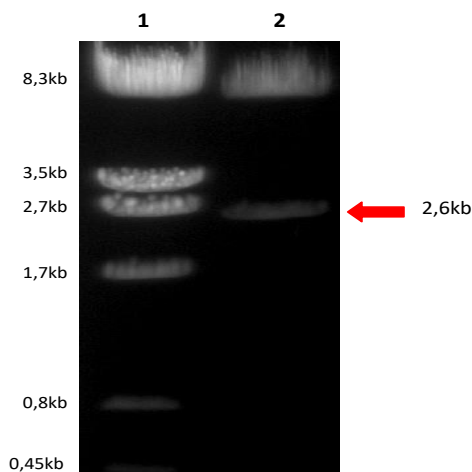
3.2 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψεων

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ακεραιότητας του αρχικού πλασμιδίου που έφερε το γονίδιο LSD1 (pOZ-FH-N-LSD1) με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών XhoI και NotI εκατέρωθεν του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου, αλλά και στην περιοχή κλωνοποίησης (multiple cloning site, MCS) του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C, καθώς και με το BamHI που βρίσκεται στο εσωτερικό του γονιδίου LSD1, ώστε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη του γονιδίου μέσα στον φορέα. Η πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI ήταν διπλή, καθώς τα δύο ένζυμα διατηρούν την ενεργότητά τους στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψεων.



Εικόνα 48: Ηλεκτροφόρηση των πέψεων του pOZ-FH-N-LSD1. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ο DNA μάρτυρας pRB2017. **1:** Πέψη του pOZ-FH-LSD1 με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI. Η ζώνη που περιέχει το LSD1 είναι στο μέγεθος που την περιμέναμε, περίπου στα 2,7 kb. **2:** Πέψη του pOZ-FH-LSD1 με το περιοριστικό ένζυμο BamHI. **3:** Το άκοπο πλασμίδιο.

Αφού ελέγξαμε την ακεραιότητα του pOZ-FH-LSD1 σύμφωνα με το χάρτη περιορισμού του, προχωρήσαμε σε διπλή πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NotI, αυτή τη φορά μεγαλύτερης ποσότητας πλασμιδίου, με σκοπό την απομόνωση του γονιδίου LSD1 με εκχύλιση από το πήκτωμα αγαρόζης σε ποσότητα ικανή ώστε να πραγματοποιήσουμε τεχνητή σύνδεσή του με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C. Η ηλεκτροφόρηση της πέψης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



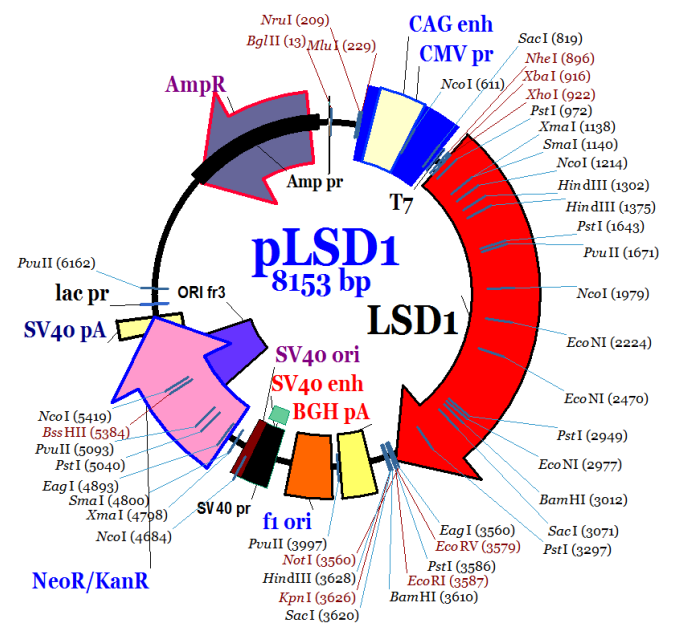
Εικόνα 49: Πέψη του pOZ-FH-LSD1 με σκοπό την εξαγωγή του γονιδίου LSD1. Θα ακολουθήσει εκχύλιση της ζώνης στα 2,6 kb. **1:** ο DNA μάρτυρας pRB2017. **2:** πέψη του pOZ-FH-LSD1.

Έπειτα ακολούθησε η εκχύλιση της ζώνης που περιέχει το LSD1 από το πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το LSD1 πλέον διαθέτει κολλώδη άκρα που δημιουργήθηκαν από την πέψη των ενζύμων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε τα ίδια ακριβώς ένζυμα για την πέψη του

pcDNA3.1mycHis(-)C, ώστε να γραμμικοποιηθεί και τα άκρα του να είναι κολλώδη και συμπληρωματικά προς αυτά του LSD1 έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η τεχνητή σύνδεση μεταξύ των δύο μορίων.

3.3 Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pLSD1

Στην παρούσα διπλωματική εργασία κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pLSD1 το οποίο εκφράζει την πρωτεΐνη LSD1. Το εν λόγω πλασμίδιο κατασκευάστηκε με το γονίδιο LSD1 το οποίο αποσπάσαμε με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού XhoI-HF και NotI-HF (New England Biolabs) από το πλασμίδιο pOZ-Flag-HA-N και του πλασμιδιακού φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C, ο οποίος γραμμικοποιήθηκε με τη χρήση των ίδιων ενζύμων περιορισμού, ώστε τα άκρα του να γίνουν κατάλληλα για την τεχνητή σύνδεση (ligation) με το LSD1 με τη δράση του ενζύμου T₄ DNA λιγάσης. Πριν την αντίδραση τεχνητής σύνδεσης τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα αποφωσφορυλιώθηκαν με τη δράση του ενζύμου CIAP, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το πλασμίδιο pLSD1 που κατασκευάσαμε φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



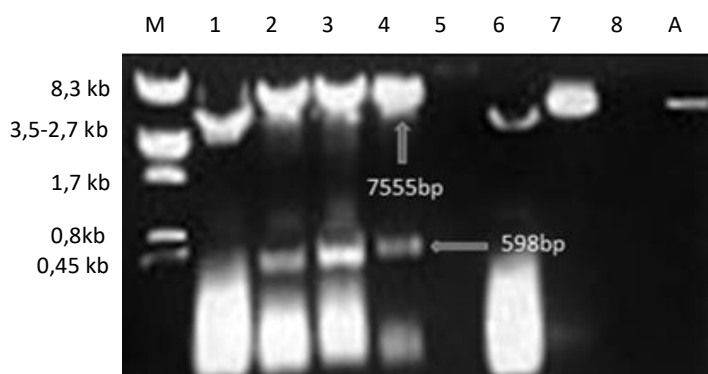
Εικόνα 50: Το πλασμίδιο pLSD1. Στο μέγεθος του αρχικού πλασμιδιακού φορέα, 5521 bp, προστίθεται το γονίδιο LSD1, μήκους 2632 bp, έτσι το κατασκευασμένο πλασμίδιο pLSD1 θα έχει συνολικό μήκος 8153 bp.

Το πλασμίδιο που κατασκευάσαμε στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό (transformation) δεκτικών βακτηρίων (competent cells) XL1-blue. Ακολούθησε επίστρωση εναιωρήματος μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό αμικικλίνη, που αποτελεί τον παράγοντα επιλογής. Το στέλεχος XL1-blue διαθέτει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και το ναλιδιξικό οξύ, αλλά είναι ευαίσθητο στην αμικικλίνη. Έτσι, μόνο

τα επιτυχώς μετασχηματισμένα βακτήρια, αυτά δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο Amp^r, θα καταφέρουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν.

3.4 Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων

Πραγματοποιήθηκε επιλογή 8 διαφορετικών κλώνων από τις μεμονωμένες αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων που παρατηρήθηκαν στα τρυβλία με άγαρ και ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών σε θρεπτικό υλικό LB που περιείχε κατάλληλο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, ώστε να έχουμε μεγαλύτερη πιθανότητα απομόνωσης του πλασμιδίου rLSD1. Ακολούθησε μικρής κλίμακας απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Κατόπιν, το πλασμιδιακό DNA υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (κ.β.) για να διαπιστωθεί η ακεραιότητα του πλασμιδιακού DNA. Σύμφωνα με το χάρτη της εικόνας 49, υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου BamHI. Η μία βρίσκεται στη θέση 3012, στην περιοχή του γονιδίου LSD1, και η άλλη βρίσκεται καθοδικά του γονιδίου, στη θέση 3610. Επομένως, σύμφωνα με το χάρτη, σε θετικούς κλώνους θα περιμένουμε 2 ζώνες, μία με μήκος 7555 bp και μια μικρότερη, μήκους 598 bp.



Εικόνα 51: Έλεγχος των κλώνων μετασχηματισμένων βακτηρίων με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (κ.β.) των προϊόντων πέψεων των πλασμιδίων των μετασχηματισμένων κλώνων (1-8). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA του πλασμιδίου rRB2017 (M). Επίσης για έλεγχο χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο που δεν έχει υποστεί πέψη (A). Από την εικόνα, οι κλώνοι που επιλέξαμε για το πείραμά μας είναι οι 2, 3 και 4.

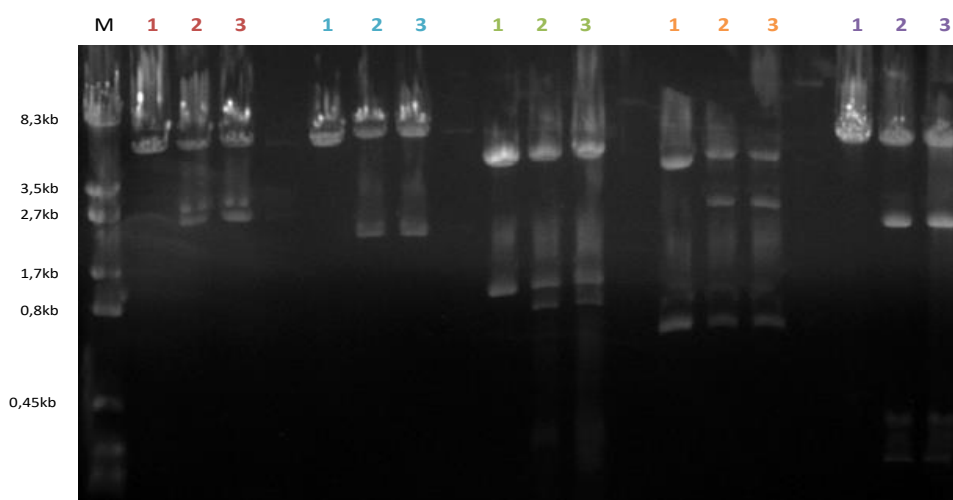
Οι κλώνοι που επιλέξαμε για να συνεχίσουμε το πείραμα είναι οι κλώνοι rLSD1-2, rLSD1-3 και rLSD1-4, διότι από την πέψη τους προέκυψαν δύο ζώνες κοντά στο μέγεθος που τις περιμέναμε.

Εμβολιάσαμε μεγάλη ποσότητα υγρού θρεπτικού υλικού LB (350ml) που περιείχε το κατάλληλο αντιβιοτικό αμικικιλίνη, με ορισμένη ποσότητα (0,5ml) από την καλλιέργεια μικρής κλίμακας των κλώνων 2, 3 και 4 των μετασχηματισμένων βακτηρίων, των οποίων το πλασμιδιακό DNA είχε την σωστή απεικόνιση

στην ηλεκτροφόρηση. Ακολούθησε απομόνωση μεγάλης κλίμακας πλασμιδιακού DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης και περαιτέρω καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 8000) και με υπερφυγοκέντρωση σε διαβάθμιση CsCl₂. Στο στάδιο αυτό ο κλώνος 3 δεν αναπτύχθηκε, επομένως προχωρήσαμε με τους υπόλοιπους δύο κλώνους.

3.5 Έλεγχος της ακεραιότητας του πλασμιδιακού DNA με χαρτογράφιση περιορισμού και αλληλούχιση

Όπως προαναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ακεραιότητας του πλασμιδίου που κατασκευάσαμε, με τη χρήση διαφόρων περιοριστικών ενδονουκλεασών, σύμφωνα με το χάρτη περιορισμού παραπάνω. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση με τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, με σκοπό τον έλεγχο της ακεραιότητας του πλασμιδίου. Ο έλεγχος αυτός θα μας δείξει αφενός μεν ότι το γονίδιο έχει πράγματι εισαχθεί στον πλασμιδιακό φορέα, αφετέρου δε ότι έχει εισαχθεί και με το σωστό προσανατολισμό. Χρησιμοποιήσαμε σαν μάρτυρα ελέγχου ένα μετασχηματισμένο κλώνο που περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C χωρίς το γονίδιο LSD1, που έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ακριβώς ένζυμα.



Εικόνα 52: Χαρτογράφιση του πλασμιδίου pLSD1. Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των κλώνων pLSD1-2 και pLSD1-4, καθώς και του κλώνου V που περιέχει τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C χωρίς το γονίδιο LSD1, σε πήκτωμα αгарόζης 1% (κ.β.). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το DNA του πλασμιδίου pRB2017.

Οι ζώνες των προϊόντων των πέψεων συγκρίθηκαν με αυτές που υπολογίστηκαν με βάση τον χάρτη περιορισμού που κατασκευάσαμε για το πλασμίδιο pLSD1 (εικόνα 50) ως προς τον αριθμό τους και το μέγεθός τους και απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Ένζυμα περιορισμού	Πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.1mycHis(-)C	Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLSD1
XhoI-EcoRI	5521	2765 5388
HindIII	5521	73 2253 5827
PstI	1454 4067	4085 1454-1306 671 348 289
PvuII	3356 1096-1069	3662 2326 1096-1069
SacI	169 5352	2252 549 5901

Πίνακας 32: Αναμενόμενοι αριθμοί και μεγέθη ζωνών σε ηλεκτροφόρηση μετά από πέψεις, με βάση τον χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου pLSD1. Παρατηρούμε ότι οι ζώνες που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων και απεικονίζονται στην εικόνα 54 είναι σε συμφωνία με τις ζώνες που υπολογίσαμε με βάση τον χάρτη περιορισμού του πλασμιδίου pLSD1 (εικόνα 52). Έτσι, επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα του πλασμιδίου pLSD1.

Το επόμενο βήμα για τον έλεγχο της ακεραιότητας του πλασμιδίου που κατασκευάσαμε, ήταν η αλληλούχιση του πλασμιδίου στην περιοχή του γονιδίου LSD1, με χρήση μορίου-εκκινητή ειδικού για τον υποκινητή του T7 (**T7 promoter (Forward): 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'**). Η νουκλεοτιδική ανάλυση ήταν θετική ως προς την ένθεση του γονιδίου LSD1 στο πλασμίδιο pcDNA3.1mycHis(-)C. Επομένως το πλασμίδιο pLSD1 που κατασκευάσαμε είναι ικανό εφόσον εισαχθεί σε κάποιο ευκαρυωτικό κύτταρο να εκφράσει την πρωτεΐνη της LSD1, υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV, όπως φαίνεται στην εικόνα 50. Τμήματα των αποτελεσμάτων της νουκλεοτιδικής αλληλούχισης εισήχθησαν στο πρόγραμμα Blastn, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι ανήκουν στο γονίδιο LSD1 (Εικόνα 53).

PREDICTED: Homo sapiens lysine demethylase 1A (KDM1A), transcript variant X6, mRNA

Sequence ID: [XM_017000717.1](#) Length: 3769 Number of Matches: 1

Range 1: 151 to 1376 [GenBank](#) [Graphics](#)

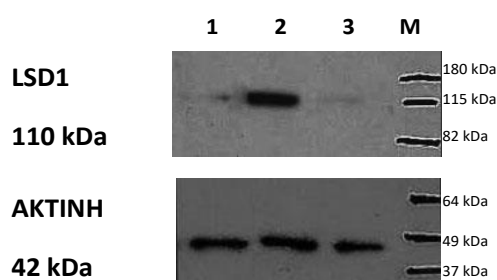
▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2030 bits(1099)	0.0	1189/1230(97%)	32/1230(2%)	Plus/Plus

Εικόνα 53: Ταυτοποίηση της αλληλουχίας της LSD1 με τη χρήση του προγράμματος Blastn. Επιβεβαιώνεται έτσι η ένθεση του γονιδίου της LSD1 στον πλασμιδιακό φορέα, καθοδικά του υποκινητή CMV.

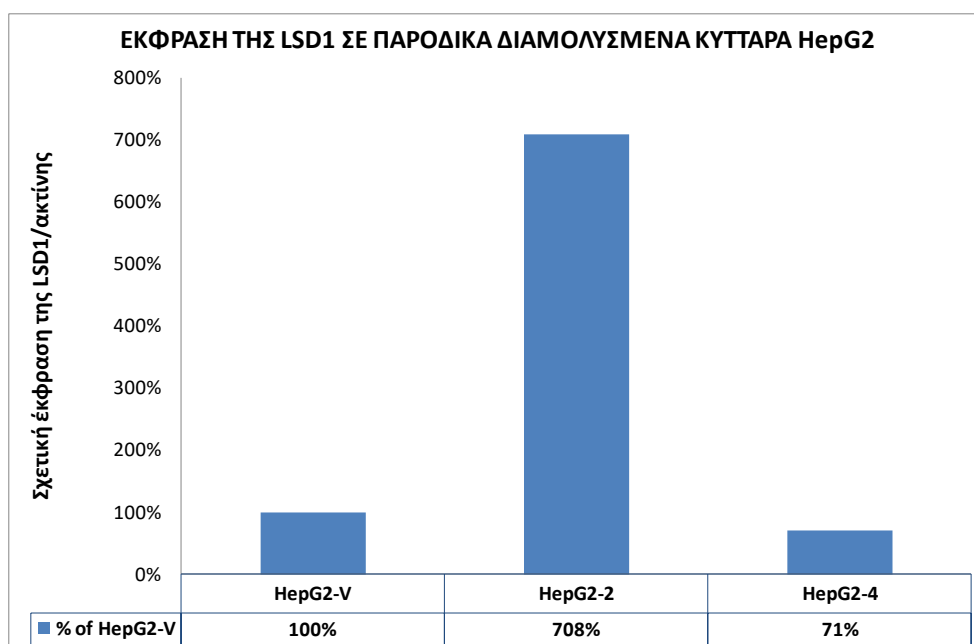
3.6 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HepG2 με το pLSD1 και έλεγχος της έκφρασης

Ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η υπερέκφραση της LSD1 σε ηπατικές κυτταροσειρές HepG2 και HuH7.5 με σκοπό τη μελέτη τους κατά τη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C. Έτσι, μετά τον έλεγχο της ακεραιότητας του πλασμιδίου που κατασκευάστηκε σύμφωνα με τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της καθαρότητας και ποσοτικοποίησή του με τη χρήση του φωτομέτρου Thermo Scientific NanoDrop 2000. Ωστόσο, προτού προχωρήσουμε στην κατασκευή σταθερών κυτταροσειρών που υπερεκφράζουν την LSD1, ελέγξαμε την ικανότητα του πλασμιδίου για υπερέκφραση της LSD1 πρωτεΐνης, δηλαδή για την παραγωγή ικανοποιητικών ποσοτήτων LSD1 ενδοκυτταρικά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε παροδική διαμόλυνση (transfection) κυττάρων HepG2 με το πλασμίδιο pLSD1 και στη συνέχεια λύση τους και ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της LSD1 με ανοσοσύτωση τύπου Western, σύμφωνα με τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συγκεκριμένα, έγινε λύση των κυττάρων και προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης σε πυρηνικά εκχυλίσματα HepG-2 ηπατοκυττάρων με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε φόρτωση των κατάλληλων ποσοτήτων δειγμάτων σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδου και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με ανοσοσύτωση τύπου Western. Τέλος, η ανίχνευση με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της LSD1, καθώς και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ακτίνης που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 54: Ανοσοσύτωση τύπου Western με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της LSD1, για έλεγχο της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης μετά από παροδική διαμόλυνση των κυττάρων (επάνω) και με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ακτίνης (κάτω). **1:** εκχύλισμα από κύτταρα HepG2 διαμολυσμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C. **2:** εκχύλισμα από κύτταρα HepG2 διαμολυσμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLSD1-2. **3:** εκχύλισμα από κύτταρα HepG2 διαμολυσμένα με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pLSD1-4. Η πρωτεΐνη της LSD1 ανιχνεύεται στα 110 kDa, ενώ η πρωτεΐνη ακτίνη ανιχνεύεται στα 42 kDa.

Αν λάβουμε υπόψη μας ότι οι ζώνες ακτίνης των δειγμάτων είναι παρόμοιας έντασης, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι ο πλασμιδιακός κλώνος rLSD1-2 (ζώνη 2) προσδίδει υπερέκφραση μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων, καθώς η ζώνη της LSD1 που εμφανίζει είναι πιο έντονη σε σχέση με αυτή των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα ελέγχου (ζώνη 1). Παράλληλα βλέπουμε ότι ο ίδιος κλώνος παρουσιάζει καλύτερη έκφραση σε σχέση με τον rLSD1-4 (ζώνη 3), καθώς η ζώνη της LSD1 που παρουσιάζει είναι πιο έντονη σε σχέση με αυτή του κλώνου rLSD1-4. Για ακριβέστερο έλεγχο της υπερέκφρασης συγκρίθηκαν οι δύο κλώνοι ως προς την έκφραση της LSD1 τόσο μεταξύ τους όσο και με τον μάρτυρα με τη χρήση της πυκνομετρίας (densitometry) των ζωνών μέσω του λογισμικού Quantity One-4.6.6 (basic) της Biorad. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 55: Έκφραση της LSD1 σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα HepG2. Στην παρούσα εικόνα φαίνεται ότι κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο rLSD1 παρουσιάζουν υπερέκφραση της LSD1-2 (708% σε σχέση με τον μάρτυρα), ενώ τα κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο rLSD1 δεν παρουσιάζουν υπερέκφραση (71% σε σχέση με τον μάρτυρα). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1mycHis(-)C.

Με βάση το παραπάνω αποτέλεσμα, επιλέξαμε να προχωρήσουμε στην κατασκευή σταθερής κυτταροσειράς που να υπερεκφράζει την LSD1 με χρήση του πλασμιδίου rLSD1-2, το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με το rLSD1-4.

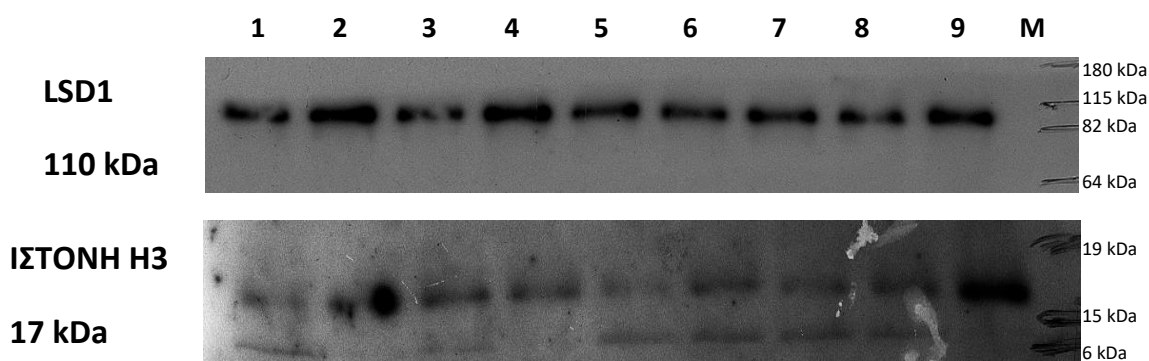
3.7 Κατασκευή κυτταροσειρών σταθερών ως προς την υπερέκφραση της LSD1 και έλεγχος της έκφρασης των κλώνων

Από τη στιγμή που δοκιμάσαμε την υπερέκφραση με παροδική διαμόλυνση σε ηπατοκύτταρα, προχωρήσαμε στην κατασκευή ηπατικών κυτταροσειρών HuH7.5 και HepG2, σταθερών ως προς την υπερέκφραση της LSD1 και στη συνέχεια απομόνωση κλώνων και επιλογή τους ως προς την έκφραση της LSD1. Όπως αναφέρεται στο προηγούμενο κεφάλαιο, επιλέχθηκαν, απομονώθηκαν και ενισχύθηκαν από την πλάκα 96 φρεατίων οι κλώνοι εκείνοι οι οποίοι αναπτύχθηκαν στη μεγαλύτερη δυνατή αραιώση (δεξιότερα της πλάκας), διότι έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι θετικοί ως προς την υπερέκφραση της LSD1. Ο έλεγχος της έκφρασης των κλώνων στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους: α) ημι-ποσοτικός έλεγχος των κλώνων ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης LSD1 με χρήση της μεθόδου Western blot που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο και β) ποσοτικός έλεγχος των κλώνων ως προς την ποσότητα mRNA της LSD1 με χρήση της μεθόδου RT-qPCR. Στις δύο μεθόδους, οι ποσότητες πρωτεΐνης και mRNA της LSD1 συγκρίθηκαν με την ενδογενή έκφραση LSD1 από μη μετασχηματισμένα ηπατοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας.

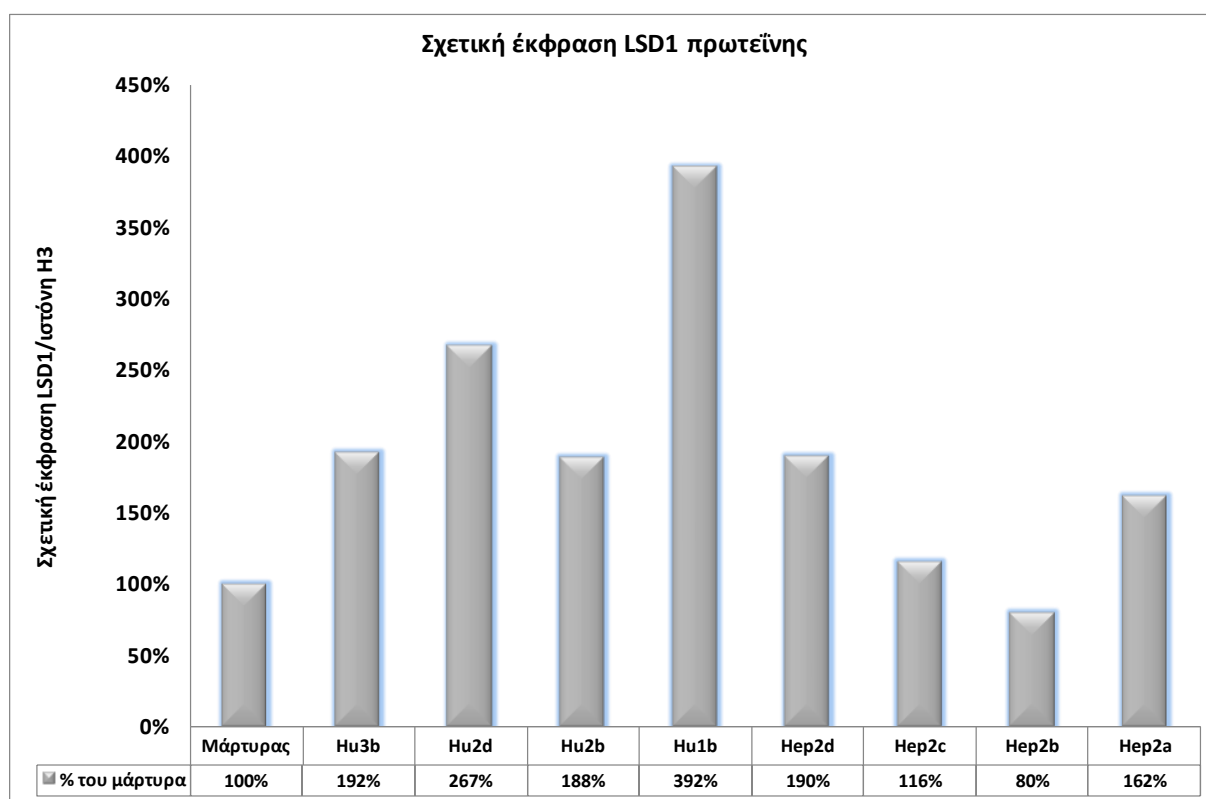
3.7.1 Έλεγχος της έκφρασης με χρήση της μεθόδου Western blot

Μέρος των κυττάρων από την κάθε κυτταροσειρά υπέστη λύση και απομονώθηκε το πυρηνικό εκχύλισμα, με μέθοδο που περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα αυτά ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου και οι διαχωρισμένες πια πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Τέλος, μετά την επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα, ανιχνεύθηκαν οι ζώνες που περιέχουν την LSD1, σε ένταση ανάλογη της ποσότητας σε πρωτεΐνη. Για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα έναντι της ιστόνης H3, που είναι επίσης πυρηνική πρωτεΐνη, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία.

Αν και η μέθοδος Western blot είναι κυρίως μια ποιοτική μέθοδος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ημι-ποσοτικά, κι έτσι να έχουμε μια πρώτη εικόνα για την έκφραση της LSD1 από τους κλώνους. Η σύγκριση των δειγμάτων έγινε με πυκνομετρία των ζωνών με τη χρήση του λογισμικού Quantity One 4.6.6 (basic) της Biorad. Στη συνέχεια οι μετρήσεις των ζωνών για τα δείγματα που αντιπροσωπεύουν την LSD1 κανονικοποιήθηκαν με βάση τη μέτρηση των ζωνών που αντιπροσωπεύουν την ιστόνη H3 και τέλος οι αναλογίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Οι μετρήσεις φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 56: Ανοσοσύτπωση τύπου Western των κλώνων της LSD1. Ανοσοσύτπωση τύπου Western με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης LSD1 (επάνω) και έναντι της ιστόνης H3 (κάτω). 1: Hep2a, 2: Hep2b, 3: Hep2c, 4: Hep2d, 5: Hu1b, 6: Hu2b, 7: Hu2d, 8: Hu3b, 9: Μάρτυρας.



Εικόνα 57: Μέτρηση της υπερέκφρασης LSD1 των κλώνων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η σύγκριση των κυτταρικών κλώνων έγινε με μέτρηση της πυκνότητας των ζωνών που προέκυψαν από την ανοσοσύτπωση τύπου Western και με χρήση του λογισμικού Quantity One 4.6.6 (basic), Biorad. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη μετασχηματισμένα ηπατοκύτταρα.

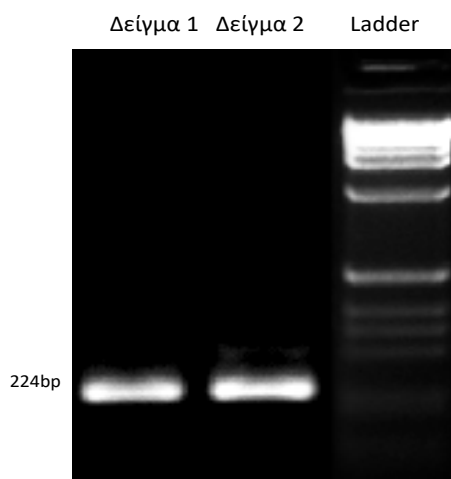
Από την πυκνομετρία των ζωνών φαίνεται ότι από τους κυτταρικούς κλώνους, ο Hu1b είναι αυτός που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη έκφραση LSD1 (392% σε σχέση με τον μάρτυρα). Ο κλώνος αυτός επιλέχθηκε ως ο καταλληλότερος για το πείραμα της παρούσας εργασίας, στον οποίο θα μελετηθεί η κινητική του πολλαπλασιασμού του HCV ιού κατά την *in vitro* μόλυνση με μολυσματικά στελέχη του, σε σύγκριση με μη μολυσμένα κύτταρα HuH7.5 τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρας. Από τους HuH7.5

κλώνους παρατηρούμε επίσης ότι ο Hu2d παρουσιάζει επίσης πολύ μεγάλη υπερέκφραση, ενώ από τους HepG2 κλώνους ο η LSD1 υπερεκφράζεται περισσότερο στον κλώνο Hep2d.

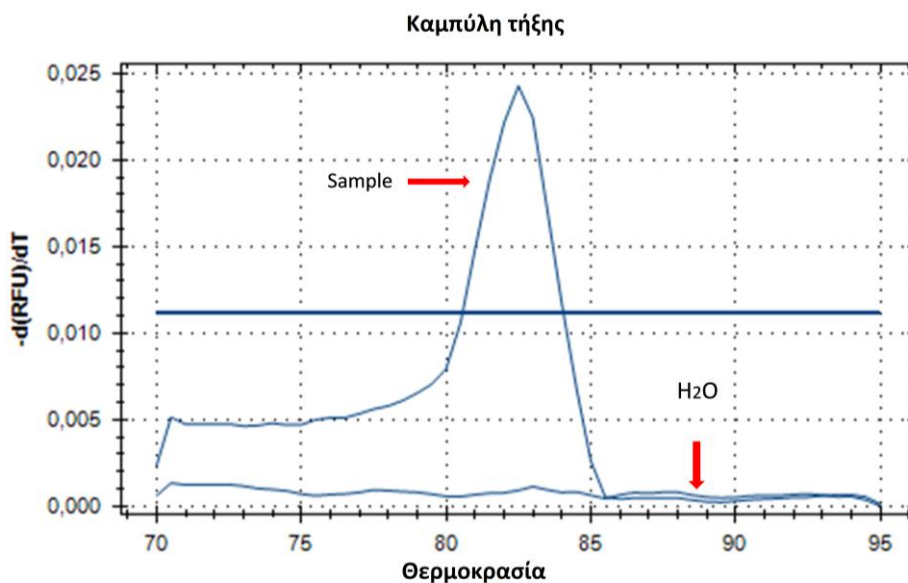
3.7.2 Έλεγχος της έκφρασης των κλώνων με χρήση της μεθόδου RT-qPCR

Για τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου που εισάγαμε, μετρήσαμε και τα επίπεδα mRNA της LSD1 με τη μέθοδο της RT-qPCR. Μέρος των κυττάρων από την κάθε κυτταροσειρά υπέστη λύση και απομονώθηκε το συνολικό RNA με χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol. Έπειτα, με τη χρήση του ενζύμου M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση παράξαμε cDNAs από τα αντίστοιχα δείγματα mRNA και στη συνέχεια προσδιορίσαμε ποσοτικά το cDNA από LSD1, που είναι αντίστοιχο σε ποσότητα με το mRNA από LSD1. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη βοήθεια ενός δεύτερου γονιδίου που χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση του αποτελέσματος και είναι το 18S rRNA.

Εκτός από ποσοτική ανάλυση, με μία Real-Time PCR μπορούμε να κάνουμε και ποιοτική ανάλυση, ή να ελέγξουμε ότι το προϊόν (αμπλικόνιο) που έχουμε είναι ειδικό. Αυτό μπορεί να γίνει με έλεγχο της καμπύλης τήξεως των αμπλικονίων. Το σημείο τήξεως είναι συνάρτηση του μήκους και της σύστασης μιας αλληλουχίας και είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία. Έτσι, με βάση αυτό μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την προς μελέτη αλληλουχία. Επίσης, ποιοτικός έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί με ηλεκτροφόρηση των αμπλικονίων της αντίδρασης, γνωρίζοντας προηγουμένως το μέγεθος τους. Η ακρίβεια της μεθόδου ελέγχθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων και μέσω ελέγχου της καμπύλης τήξης και απεικονίζονται παρακάτω.

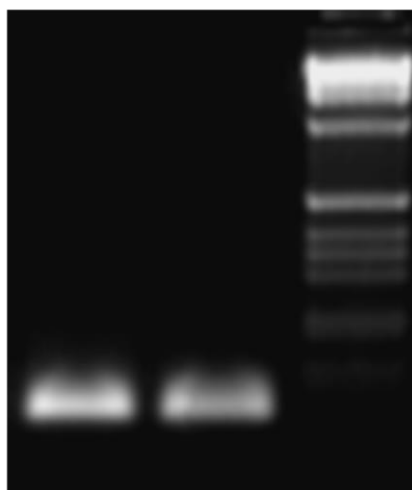


Εικόνα 58: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης του LSD1. Μετά το πέρας της Real-Time PCR επιλέξαμε δύο τυχαία δείγματα και τα ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αгарόζης 4% (κ.β.). Στην ηλεκτροφόρηση ως DNA μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε τον 1Kb DNA Ladder της Invitrogen. Γνωρίζουμε ότι το cDNA του LSD1 αποτελείται από 224 bp. Τα δύο δείγματα που απεικονίζονται στην εικόνα υπολογίζονται στο ίδιο μέγεθος, επομένως διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος είναι ειδική για την LSD1.

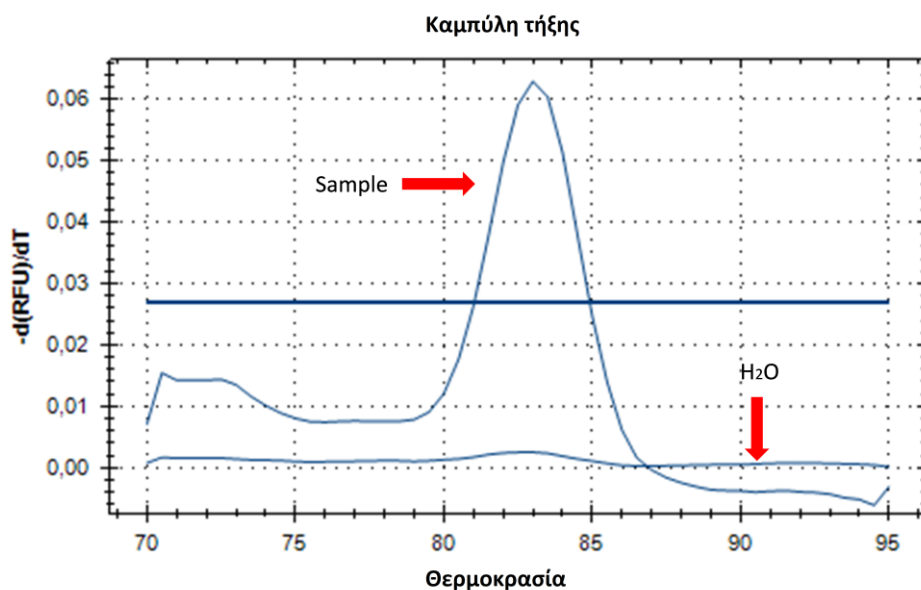


Εικόνα 59: Καμπύλη τήξεως της αντίδρασης ενίσχυσης του LSD1. Στην εικόνα απεικονίζεται η καμπύλη τήξεως ενός τυχαίου δείγματος από την αντίδραση, καθώς και η καμπύλη τήξεως του αρνητικού μάρτυρα, που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια της Real-Time PCR εκτός από cDNA, το οποίο αντικαταστήσαμε με H₂O. Παρατηρούμε ότι η κορυφή της καμπύλης του δείγματος που αντιπροσωπεύει το σημείο τήξεως είναι στους 83°C. Παράλληλα παρατηρούμε ότι ο αρνητικός μάρτυρας δεν ξεπερνά το κατώφλι, επομένως θεωρούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην αντίδραση.

Δείγμα 1 Δείγμα 2 Ladder

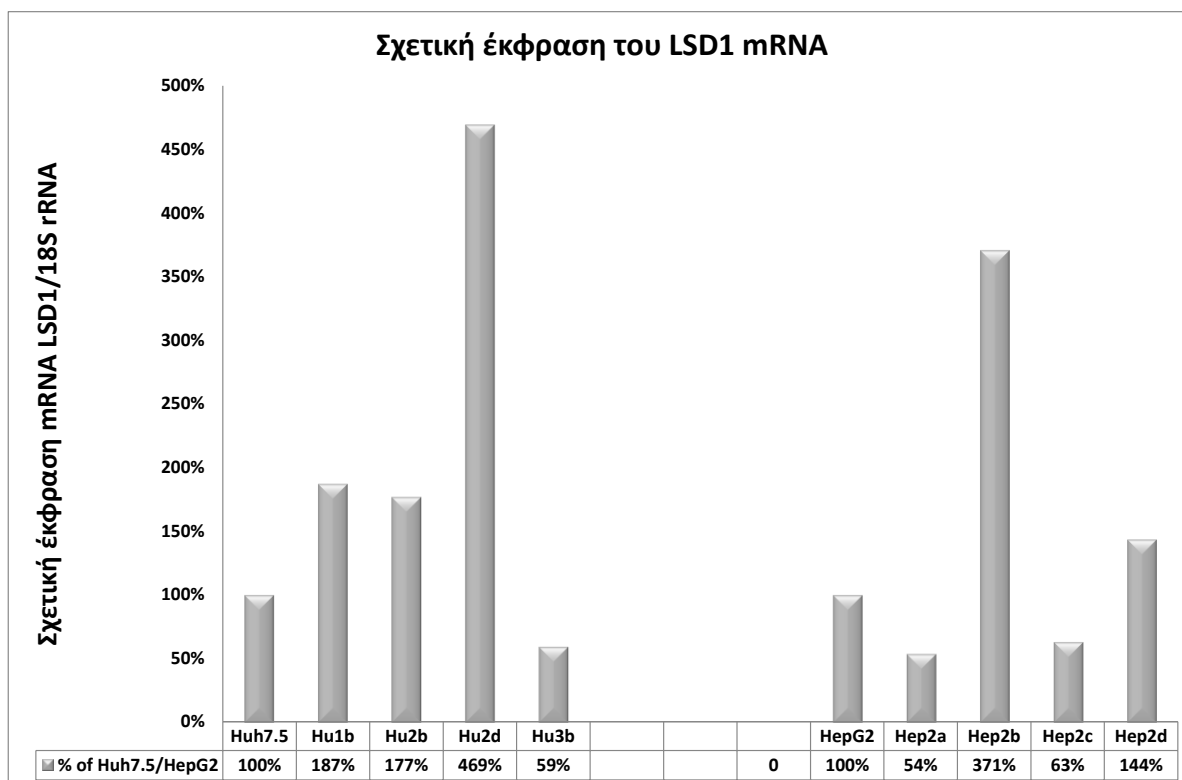


Εικόνα 60: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης του 18S rRNA. Μετά το πέρας της Real-Time PCR επιλέξαμε δύο τυχαία δείγματα και τα ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αгарόζης 4% (κ.β.). Στην ηλεκτροφόρηση ως DNA μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε τον 1Kb DNA Ladder της Invitrogen.



Εικόνα 61: Καμπύλη τήξεως της αντίδρασης ενίσχυσης του 18S rRNA. Στην εικόνα απεικονίζεται η καμπύλη τήξεως ενός τυχαίου δείγματος από την αντίδραση, καθώς και η καμπύλη τήξεως του αρνητικού μάρτυρα, που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια της Real-Time PCR εκτός από cDNA, το οποίο αντικαταστήσαμε με H₂O. Παρατηρούμε ότι η κορυφή της καμπύλης του δείγματος που αντιπροσωπεύει το σημείο τήξεως είναι στους 83,5°C. Παράλληλα παρατηρούμε ότι ο αρνητικός μάρτυρας δεν ξεπερνά το κατώφλι, επομένως θεωρούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην αντίδραση.

Αφού βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες για τις αντιδράσεις Real-Time PCR, τόσο του LSD1 όσο και του 18S rRNA που χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση, μπορέσαμε και μετρήσαμε την mRNA έκφραση της LSD1 που υπήρχε στα δείγματα των κλώνων. Για την κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του 18S rRNA σε πραγματικό χρόνο. Με τον τρόπο αυτό μετρήσαμε τη σχετική έκφραση mRNA του LSD1 στα δείγματα των κλώνων με σκοπό να δούμε ποιοι από αυτούς έχουν υπερέκφραση, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 62: Σχετική έκφραση του LSD1 mRNA μετά από RT-qPCR. Στο γράφημα απεικονίζονται οι κλώνοι Huh7.5 και HepG2 των οποίων μετρήθηκε η ποσότητα LSD1 mRNA σε σχέση με μη μολυσμένα ηπατοκύτταρα μάρτυρες, τα οποία ήταν κύτταρα Huh7.5 για τους Huh7.5 κλώνους και κύτταρα HepG2 για τους HepG2 κλώνους.

Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι από τους HepG2 κλώνους ο Hep2b παρουσιάζει υπερέκφραση, ενώ από τους Huh7.5 κλώνους υπερεκφράζουν όλοι εκτός του Hu3b. Από τους υπόλοιπους μεγαλύτερη υπερέκφραση παρουσιάζει ο Hu2d και ακολουθούν κατά σειρά ο Hu1b και ο Hu2b.

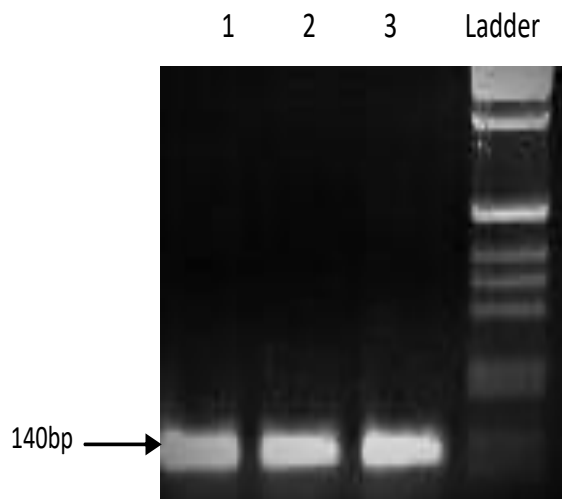
3.8 Μόλυνση κυττάρων HuH7.5 που υπερεκφράζουν την LSD1 με μολυσματικά στελέχη του HCV ιού, JFH1 και 3a, και παρακολούθηση των επιπέδων της NS3 ιικής πρωτεΐνης

Αφού έχουμε ελέγξει τους κλώνους ως προς την υπερέκφραση της LSD1, επιλέξαμε έναν από αυτούς, τον Hu1b όπως προαναφέρθηκε, και τον μολύναμε με δύο μολυσματικά στελέχη του ιού ξεχωριστά, το HCV-JFH1 και το HCV-3a, όπως περιγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τα μολυσμένα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκα 12 φρεατίων ώστε να μπορέσουμε να απομονώσουμε μολυσμένα κύτταρα σε διαφορετικές ώρες επώασης (24, 48, 72 και 96 ώρες) και με τον τρόπο αυτό να παρακολουθήσουμε την αλλαγή της έκφρασης της LSD1 από τα κύτταρα κατά τη μόλυνση με τον HCV ιό, καθώς και το ρυθμό αναδιπλασιασμού του ιού. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης φρεάτια στα οποία καλλιεργήθηκαν κύτταρα του κλώνου που δε μολύνθηκαν με τον ιό υπό τις ίδιες συνθήκες ως μάρτυρες

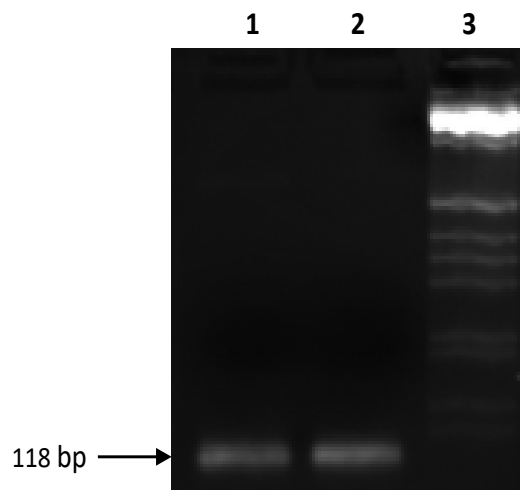
(Mock) και απομονώθηκαν στις ίδιες ώρες επώασης. Παράλληλα, η διαδικασία της μόλυνσης με τα δύο στελέχη του ιού ακολουθήθηκε και σε κύτταρα Huh7.5, με σκοπό να συγκριθεί με τον κλώνο.

Κατά αυτό τον τρόπο προέκυψαν ιζήματα κυττάρων (pellets) που περιείχαν κύτταρα κλώνου (Hu1b) ή μάρτυρα (Huh7.5), τα οποία επώαστηκαν μαζί με το εκάστοτε μολυσματικό στέλεχος (JFH1 ή 3a) σε διαφορετικούς χρόνους (24, 48, 72 και 96 ώρες). Από τα δείγματα αυτά στη συνέχεια απομονώσαμε ολικό RNA με τη μέθοδο TRIzol και παρασκευάσαμε cDNAs με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής με το ένζυμο M-MLV αντίστροφη μεταγραφάση. Έπειτα, για το κάθε δείγμα cDNA πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου με ειδικούς εκκινητές για την LSD1 και για το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA.

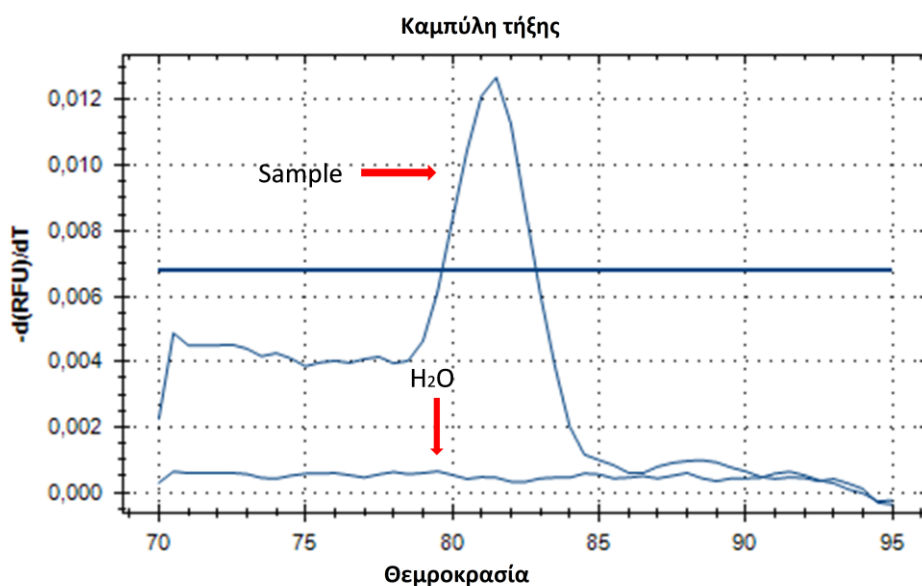
Παράλληλα με τα παραπάνω μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ιικής μη δομικής πρωτεΐνης NS3, τόσο του στελέχους HCV-JFH1 όσο και του HCV-3a στα δείγματα. Η πρακτική αυτή μας προσφέρει αφενός μεν τον έλεγχο του αναδιπλασιασμού του ιού και κατ' επέκταση της επιτυχίας της μόλυνσης με τον ιό, αφετέρου δε τη συσχέτιση του ρυθμού αναδιπλασιασμού του ιού με τη μεταβολή των επιπέδων της έκφρασης του LSD1 στα κύτταρα που το εκφράζουν. Για τις μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκε Real time PCR με ειδικούς εκκινητές για την HCV-JFH-1 NS3 και την HCV-3a NS3. Όπως στο προηγούμενο βήμα, χρειάστηκε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων ποσοτικοποίησης των επιπέδων mRNA της NS3 καθώς και να ελεγχθεί η ειδικότητά τους. Παρακάτω απεικονίζεται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, καθώς και η καμπύλη τήξεως των αμπλικονίων.



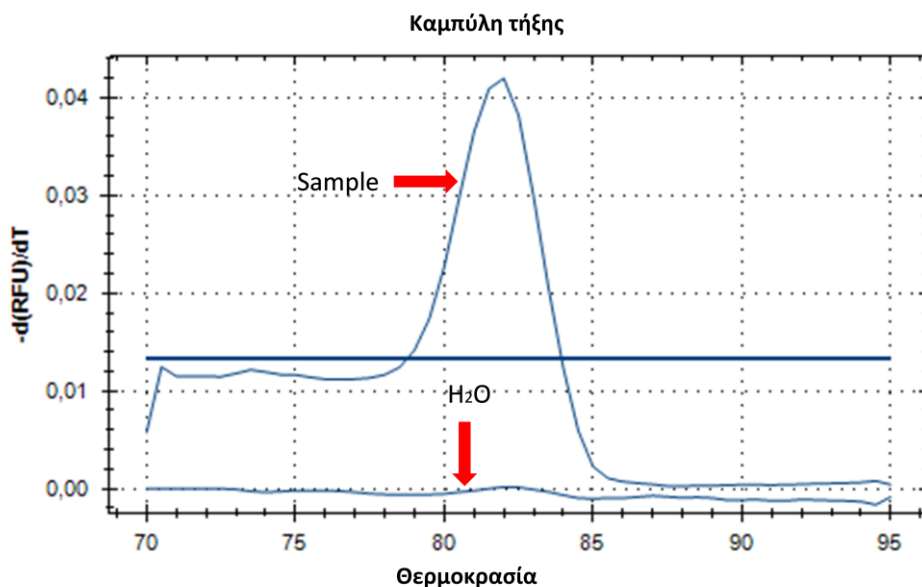
Εικόνα 63: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης του NS3-JFH1. Μετά το πέρας της Real-Time PCR επιλέξαμε τρία τυχαία δείγματα και τα ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αгарόζης 4% (κ.β.). Στην ηλεκτροφόρηση ως DNA μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε τον 1Kb DNA Ladder της Invitrogen. Γνωρίζουμε ότι το αμπλικόνιο του HCV-JFH1 NS3 έχει μέγεθος 140 bp. Τα δύο δείγματα που απεικονίζονται στην εικόνα υπολογίζονται στο ίδιο μέγεθος, επομένως διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος είναι ειδική για την HCV-JFH-1 NS3.



Εικόνα 64: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης ενίσχυσης του NS3-3α. Μετά το πέρας της Real-Time PCR επιλέξαμε τρία τυχαία δείγματα και τα ηλεκτροφορήσαμε σε πηκτή αгарόζης 4% (κ.β.). Στην ηλεκτροφόρηση ως DNA μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε τον 1Kb DNA Ladder της Invitrogen. Γνωρίζουμε ότι το cDNA του HCV-3a NS3 αποτελείται από 118 bp. Τα δύο δείγματα που απεικονίζονται στην εικόνα υπολογίζονται στο ίδιο μέγεθος, επομένως διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος είναι ειδική για την HCV-3a NS3.



Εικόνα 65: Καμπύλη τήξεως της αντίδρασης ενίσχυσης του HCV-JFH-1 NS3. Στην εικόνα απεικονίζεται η καμπύλη τήξεως ενός τυχαίου δείγματος από την αντίδραση, καθώς και η καμπύλη τήξεως του αρνητικού μάρτυρα, που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια της Real-Time PCR εκτός από cDNA, το οποίο αντικαταστήσαμε με H₂O. Παρατηρούμε ότι η κορυφή της καμπύλης του δείγματος που αντιπροσωπεύει το σημείο τήξεως είναι στους 81,5°C. Παράλληλα παρατηρούμε ότι ο αρνητικός μάρτυρας δεν ξεπερνά το κατώφλι, επομένως θεωρούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην αντίδραση.



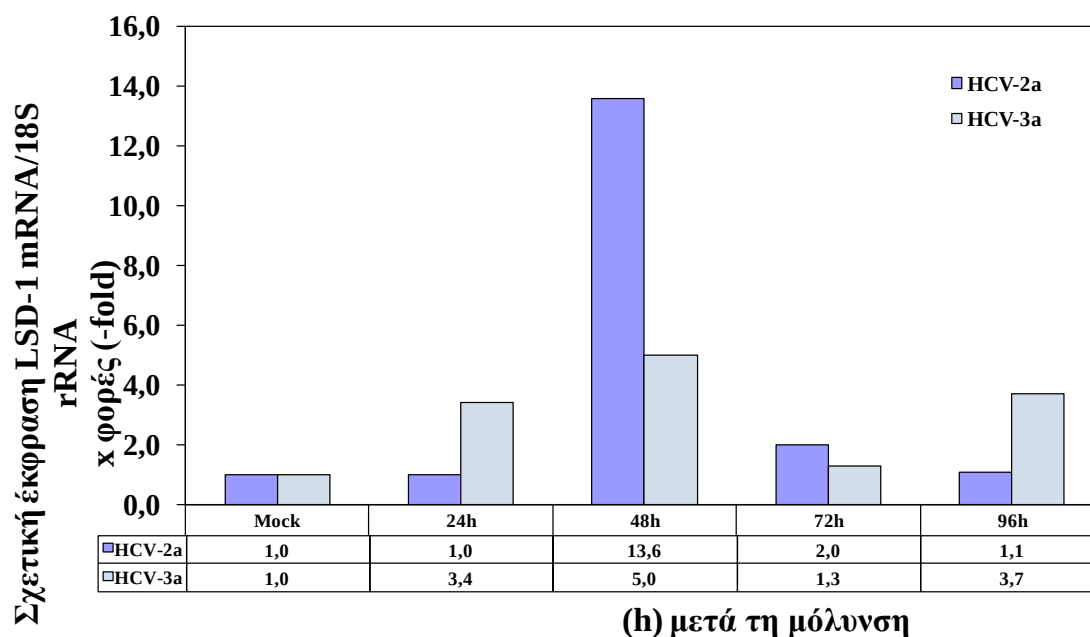
Εικόνα 66: Καμπύλη τήξεως της αντίδρασης ενίσχυσης του HCV-3a NS3. Στην εικόνα απεικονίζεται η καμπύλη τήξεως ενός τυχαίου δείγματος από την αντίδραση, καθώς και η καμπύλη τήξεως του αρνητικού μάρτυρα, που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια της Real-Time PCR εκτός από cDNA, το οποίο αντικαταστήσαμε με H₂O. Παρατηρούμε ότι η κορυφή της καμπύλης του δείγματος που αντιπροσωπεύει το σημείο τήξεως είναι στους 82°C. Παράλληλα παρατηρούμε ότι ο αρνητικός μάρτυρας δεν ξεπερνά το κατώφλι, επομένως θεωρούμε ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην αντίδραση.

Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων Real-Time PCR επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Office Excel και κανονικοποιήθηκαν με βάση το 18S rRNA. Έτσι, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες κινητικής για την NS3, που μας δείχνει την πορεία του αναδιπλασιασμού του ιού για 96 ώρες, καθώς και την κινητική μεταβολής των επιπέδων της LSD1 μέσα σε 96 ώρες μετά την *in vitro* μόλυνση με τα μολυσματικά στελέχη του HCV ιού JFH1 και 3a.

3.8.1 Επίπεδα της LSD1 κατά τη λοίμωξη με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού

Αρχικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του LSD1 mRNA μέσω RT-qPCR σε κύτταρα Huh7.5 που καλλιεργήθηκαν σε πλάκα καλλιέργειας 12 φρεατίων και μολύνθηκαν με τα στελέχη του HCV ιού, JFH1 και 3a και απομονώθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους μόλυνσης, συγκεκριμένα 24, 48, 72 και 96 ώρες. Παράλληλα καλλιεργήθηκαν και κύτταρα Huh7.5 που δε μολύνθηκαν με κάποιο στέλεχος και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (Mock). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην παρακάτω εικόνα.

Σχετική έκφραση mRNA LSD1 σε μολυσμένα κύτταρα Huh7.5

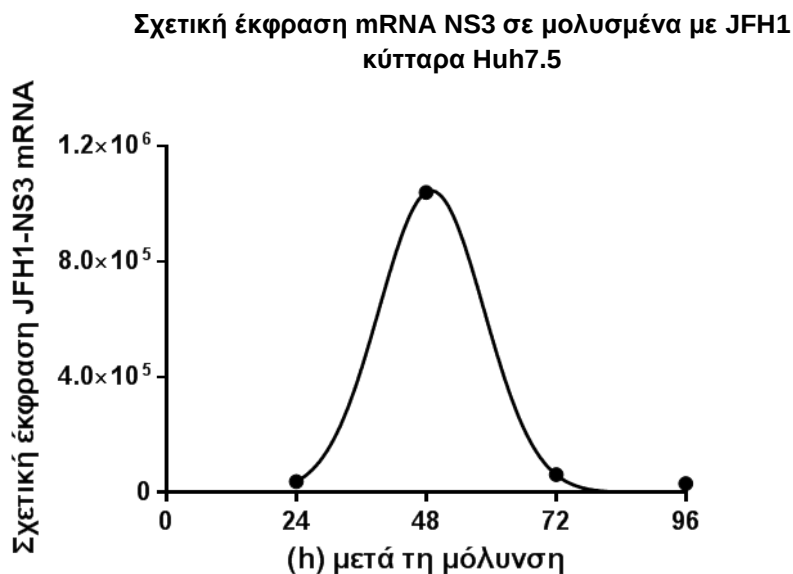


Εικόνα 67: Έκφραση της LSD1 κατά τη λοίμωξη με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού.

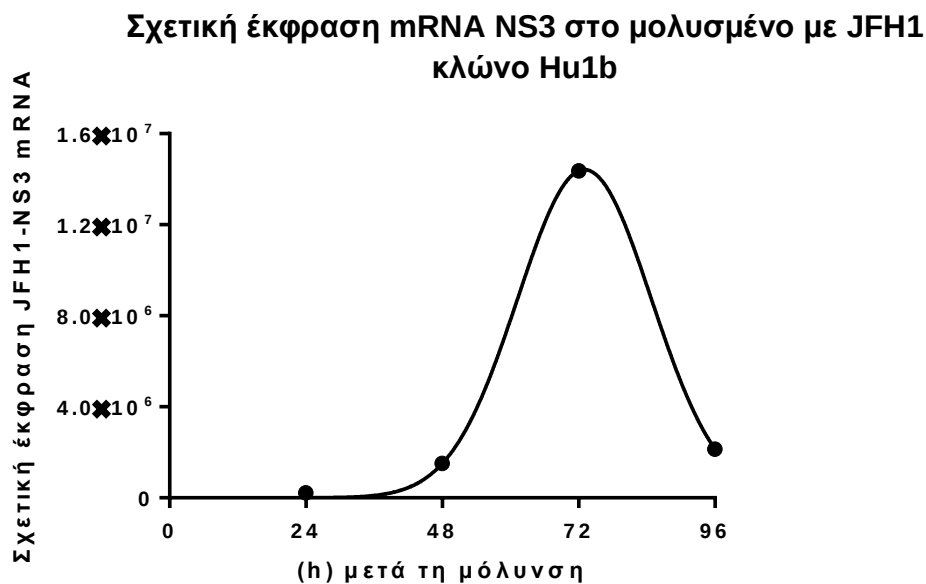
Φαίνεται ότι τα επίπεδα της LSD1 μεταβάλλονται κατά τη λοίμωξη με τον HCV ιό και ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών του ιού. Παρατηρούμε ότι κατά τη λοίμωξη με τον HCV JFH1 η έκφραση της LSD1 επάγεται στις 48 ώρες μετά τη λοίμωξη και τα επίπεδά της αυξάνονται ραγδαία και μετά σταδιακά επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντιθέτως, κατά τη λοίμωξη με τον 3a παρατηρούμε μια πιο σταδιακή αύξηση των επιπέδων LSD1 mRNA, που ωστόσο μετά τις 96 ώρες παραμένουν υψηλά.

3.8.2 Μόλυνση του κλώνου Hu1b με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού

Όπως πραγματοποιήθηκε με τις καλλιέργειες μάρτυρες HuH7.5 παραπάνω, έτσι και ο κλώνος Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1, μολύνθηκε με τα στελέχη JFH1 και 3a του HCV ιού. Η μόλυνση έγινε σε πλάκα καλλιέργειας 12 φρεατίων και τα κύτταρα απομονώθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επώασης, συγκεκριμένα 24, 48, 72 και 96 ώρες. Μετρήθηκαν στη συνέχεια τα επίπεδα mRNA των HCV-JFH1 NS3 και HCV-3a NS3 στους χρόνους αυτούς, ώστε να καταγραφεί ο ρυθμός αναδιπλασιασμού των ιικών στελεχών. Οι γραφικές παραστάσεις παρακάτω κατασκευάστηκαν με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 6.

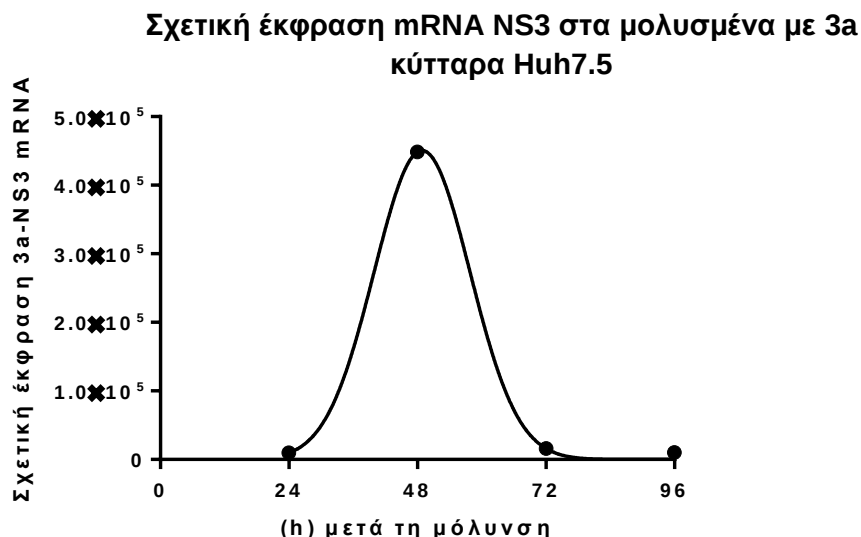


Εικόνα 68: Σχετική έκφραση επιπέδων mRNA NS3 στα μολυσμένα με HCV-JFH1 ηπατοκύτταρα Huh7.5. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-JFH1 NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων Huh7.5 με τον HCV-JFH1, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-JFH1 NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

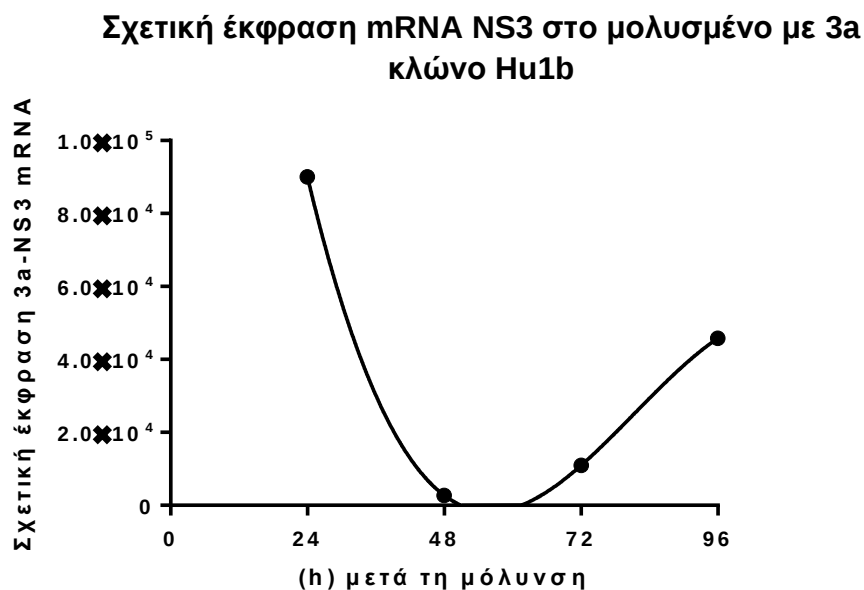


Εικόνα 69: Σχετική έκφραση HCV-JFH-1 με NS3 στα μολυσμένα με HCV-JFH1 ηπατοκύτταρα κλώνου Hu1b. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-JFH1 NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση του κλώνου Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1 με τον HCV-JFH1, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-JFH1 NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

Παρατηρούμε ότι στα κύτταρα που υπερεκφράζουν LSD1 εμφανίζεται μια μεταβολή στην κινητική αναδιπλασιασμού του HCV ιού, καθώς η κορύφωση στα επίπεδα NS3 φαίνεται να εμφανίζεται καθυστερημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ παράλληλα η αύξηση είναι μικρότερη.



Εικόνα 70: Σχετική έκφραση HCV-3a NS3 στα μολυσμένα με HCV-3a ηπατοκύτταρα Huh7.5. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-3a NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων Huh7.5 με τον HCV-3a, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-3a NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

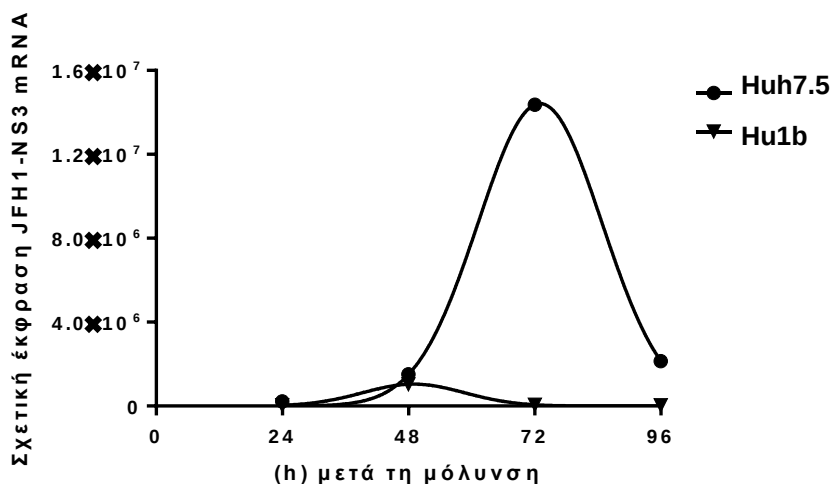


Εικόνα 71: Σχετική έκφραση HCV-3a NS3 στο μολυσμένο με HCV-3a κλώνο Hu1b. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-3a NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση του κλώνου Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1 με τον HCV-3a, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-3a NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

Η κινητική αναδιπλασιασμού του στελέχους 3a του HCV ιού είναι παρόμοια με αυτή του JFH1 παραπάνω. Ωστόσο στην περίπτωση των κυττάρων που υπερεκφράζουν την LSD1 εμφανίζεται μια ραγδαία άνοδος της NS3 στις πρώτες 24 ώρες, που στη συνέχεια επανέρχεται απότομα σε χαμηλά επίπεδα και

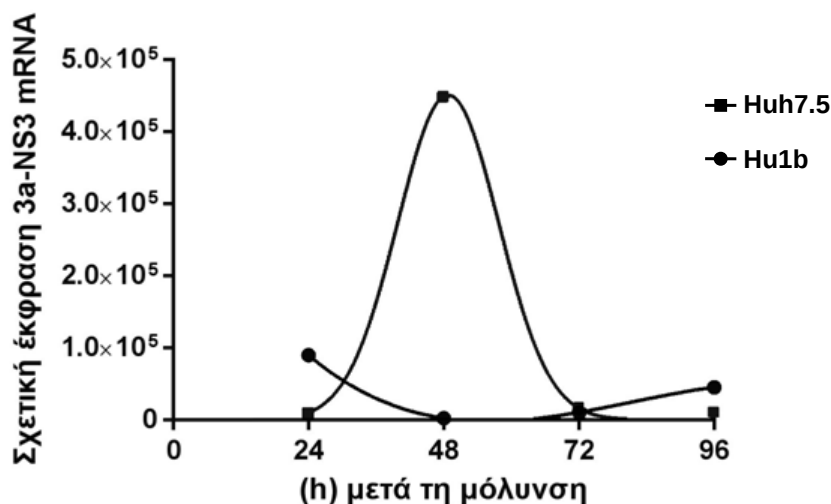
αυξάνεται πάλι προς το τέλος την ιικής μόλυνσης. Στις παρακάτω δύο εικόνες φαίνονται συνδυαστικά οι καμπύλες κινητικής του αναδιπλασιασμού του ιού HCV ανά γονότυπο.

Σχετική έκφραση mRNA του ιικού γονιδίου NS3-JFH1



Εικόνα 72: Σχετική έκφραση mRNA NS3-JFH1 σε κύτταρα Huh7.5 και στον κλώνο Hu1b, μολυσμένων με τον γονότυπο JFH1. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-JFH1 NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση με τον HCV-JFH1, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές, συνδυαστικά για τα κύτταρα Huh7.5 που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας και για τον κλώνο Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-JFH1 NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

Σχετική έκφραση mRNA του ιικού γονιδίου NS3-3a



Εικόνα 73: Σχετική έκφραση mRNA HCV-3a NS3 σε ηπατοκύτταρα Huh7.5 και στον κλώνο Hu1b, μολυσμένων με τον γονότυπο HCV-3a. Στο παρόν γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του HCV-3a NS3 mRNA για τις πρώτες 96 ώρες μετά τη μόλυνση με τον HCV-3a, που αντιστοιχεί στο ρυθμό αναδιπλασιασμού του για τις ώρες αυτές, συνδυαστικά για τα κύτταρα Huh7.5 που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας και για τον κλώνο Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1. Οι ποσότητες των δειγμάτων κανονικοποιήθηκαν με μέτρηση του 18S rRNA και η μέτρηση της σχετικής έκφρασης των δειγμάτων έγινε με βάση τους λόγους του HCV-3a NS3 mRNA προς το 18S rRNA για το κάθε δείγμα.

Στις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε ότι κατά τη μόλυνση του κλώνου Hu1b με τον γονότυπο HCV-JFH1 η κορύφωση του ιικού πολλαπλασιασμού, η οποία είναι συνάρτηση της μέγιστης έκφρασης των επιπέδων mRNA της NS3, ήταν κατά 14 φορές υψηλότερη σε σχέση με τις καλλιέργειες μάρτυρες. Παράλληλα διαφάνηκε μια τάση καθυστέρησης στον ιικό ρυθμό πολλαπλασιασμού από τις 48 στις 72 ώρες. Αντιθέτως, ο γονότυπος HCV-3α παρουσιάζει αυξημένο αναδιπλασιασμό στον κλώνο Hu1b σε σχέση με τους μάρτυρες, κατά τις 24 πρώτες ώρες της μόλυνσης. Στη συνέχεια όμως, παρατηρείται σημαντική παρεμπόδιση του ρυθμού ιικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος σχεδόν μηδενίζεται στις 48 ώρες και ανακάμπτει σε μικρό βαθμό μέχρι το τέλος της μόλυνσης. Τέλος, βλέπουμε ότι η καμπύλη κινητικής αναδιπλασιασμού του HCV-3α είναι παρόμοια με αυτή του HCV-JFH1, παρουσιάζοντας μια κορυφή στις 48 ώρες, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. LSD1 και HKK

Αν και για πολλά χρόνια ήταν γνωστό ότι η LSD1 σχετίζεται με διάφορους τύπους καρκίνου, μόλις τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε η ογκογόνος δράση της. Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, νευροβλάστωμα, σαρκώματα και καρκίνο του ήπατος (Zhao ZK et al., 2012). Ωστόσο, μέχρι σήμερα δε γνωρίζουμε πολλά για τη συμμετοχή της LSD1 στην ηπατική καρκινογένεση.

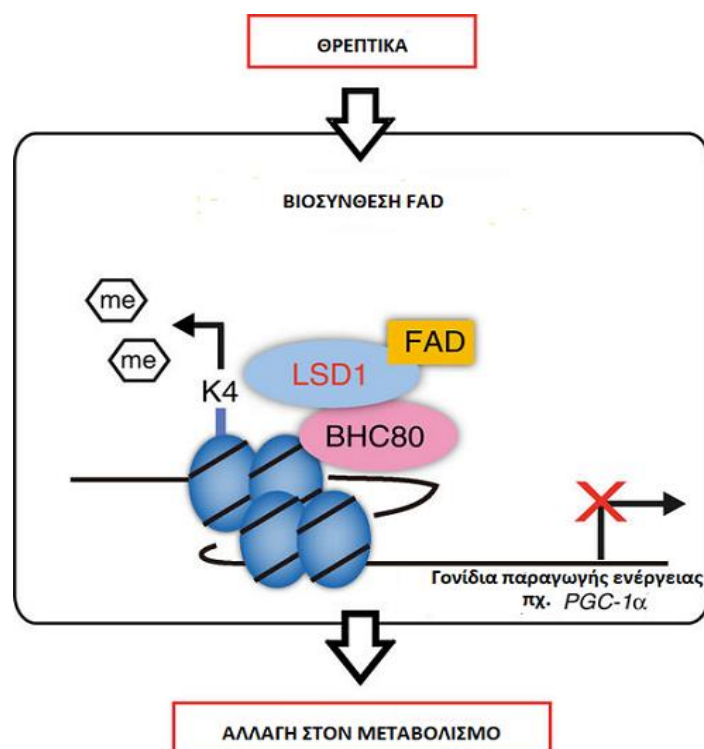
Έχει παρατηρηθεί ότι η παρεμπόδιση της LSD1 στις περιπτώσεις αυτές προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντιθέτως, η υπερέκφρασή της φαίνεται να συμβάλλει στην καρκινογένεση, μέσω των τροποποιήσεων της χρωματίνης και επακόλουθη διατάραξη των επιπέδων έκφρασης διαφόρων γονιδίων, όπως ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Hayami S et al., 2011). Επιπλέον, η LSD1 έχει ενοχοποιηθεί και σε περιπτώσεις υποτροπής των όγκων (Hayami S et al., 2011). Σε πολλές περιπτώσεις συμπαγών όγκων έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της LSD1 και αυτό το χαρακτηριστικό συνδέεται με κακή πρόγνωση. Έτσι, η LSD1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν βιοδείκτης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση μυελοπλαστικών νεοπλασμάτων φαίνεται ότι παρεμπόδιση της LSD1 με τον αναστολέα IMG-7289 οδηγεί σε καλύτερη πρόγνωση, ακόμα και σε πολύ προχωρημένα στάδια. Μάλιστα ο αναστολέας αυτός βρίσκεται σε κλινικά στάδια (Jutzi JS et al., 2017).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι η ανάγκη τους για παραγωγή ενέργειας από το μονοπάτι της γλυκόλυσης, ακόμη και σε αερόβιες συνθήκες, μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης (Ward PS και Thompson CB, 2012). Πρόκειται για μια μεταβολική αναπροσαρμογή στο υποξικό μικροπεριβάλλον όπου βρίσκονται τα καρκινικά κύτταρα, ενώ η έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή φαίνεται ότι είναι διαφορετική σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Dang CV et al., 2011). Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με την αναερόβια γλυκόλυση, όπου το πυροσταφυλικό οξύ γίνεται είτε αιθυλική αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, είτε γαλακτικό οξύ μέσω της γαλακτικής ζύμωσης, στην αερόβια γλυκόλυση το πυροσταφυλικό οξύ οξειδώνεται πλήρως με οξυγόνο παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Επιπλέον, η λειτουργία των μιτοχονδρίων μεταβάλλεται, έτσι ώστε να παράγει μακρομόρια και αντιδραστικά προϊόντα οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) αντί για ATP (Wallace DC, 2012). Οι μεταβολές που συμβαίνουν στα καρκινικά κύτταρα πιστεύεται ότι επιτυγχάνονται μέσω επιγενετικών ρυθμίσεων. Επιπλέον, η μεταβολή αυτή στη λειτουργία του μεταβολισμού προκαλεί μεταβολή και στη λειτουργία των επιγενετικών παραγόντων. Η αμφίδρομη αυτή

δράση συμβάλλει στην απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα (Hino S et al., 2013).

Πρόσφατες μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες δείχνουν ότι η LSD1 συμβάλλει στην κατάσταση αυτή, καταστέλλοντας το μιτοχονδριακό μεταβολισμό και την οξείδωση των λιπαρών οξέων και προωθώντας έτσι την αποθήκευση ενέργειας. Αυτό πραγματοποιείται μέσω απομεθυλίωσης των H3K4 γονιδίων, όπως το PGC-1α, του οποίου το προϊόν εμπλέκεται στον μεταγραφικό έλεγχο του οξειδωτικού μεταβολισμού του μιτοχονδρίου, όπως και του γονιδίου που κωδικοποιεί την αφυδρογονάση του ακυλο-CoA, που συμμετέχει στην οξείδωση των λιπαρών οξέων (Sakamoto A et al., 2015).

Σημαντική επίσης είναι η συμμετοχή της LSD1 στη λιπογένεση. Υπενθυμίζεται ότι για την απομεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης από την LSD1, απαιτείται εκτός των άλλων και η δράση ενός συμπαραγόντα, του FAD. Γνωρίζουμε ότι το FAD προέρχεται από την βιταμίνη B₂ και αποτελεί συμπαραγόντα αποτοξίνωσης σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες, όπως η οξείδωση των λιπαρών οξέων ο κύκλος του κιτρικού οξέως και η αποικοδόμηση των αμινοξέων (Lienhart WD et al., 2013). Έτσι, εύκολα συμπεραίνουμε ότι η μεταβολική κατάσταση του κυττάρου μπορεί να επηρεάζει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης και μελέτες έχουν δείξει ότι η LSD1 ελέγχει γονίδια του μεταβολισμού της ενέργειας ανταποκρινόμενη σε εξωτερικά ερεθίσματα (Duteil D et al., 2014, Hino S et al., 2012).



Εικόνα 74: Η LSD1 ρυθμίζει το μεταβολισμό ενέργειας ανταποκρινόμενη σε διατροφικά ερεθίσματα και στα επίπεδα του FAD. Κατά την πρόσληψη θρεπτικών παράγεται FAD στον οργανισμό και αυτό επιτρέπει τη δράση της LSD1, η οποία εξαρτάται από τα επίπεδα του FAD. Έπειτα η LSD1 μέσω απομεθυλίωσης καταστέλλει την έκφραση διαφόρων γονιδίων του μεταβολισμού (Hino S et al., 2012).

Το ήπαρ παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Τα ηπατοκύτταρα ενσωματώνουν λιπαρά οξέα που προέρχονται είτε από το λιπώδη ιστό είτε από τη διατροφή, τα οποία είτε αποθηκεύονται ως ουδέτερα λιπίδια είτε αναδιανέμονται σε άλλους ιστούς στη μορφή VLDL. Όταν όμως τα ηπατοκύτταρα έρχονται σε επαφή με τεράστια συγκέντρωση λιπαρών οξέων, τότε τα λιπαρά οξέα, καθώς και τα τοξικά τους παράγωγα, συσσωρεύονται μέσα στα ηπατοκύτταρα, οδηγώντας στη μη-αλκοολική λιπώδη ηπατική νόσο (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) (Leamy AK et al., 2013). Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης που οφείλονται στη δράση της LSD1 σχετίζονται με μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων του μεταβολισμού ενέργειας (Hino S et al., 2012, Pan D et al., 2013).

Ο μεταβολισμός των λιπιδίων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος κι έτσι οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους ρυθμίζεται δεν είναι απόλυτα ξεκάθαροι. Μια ομάδα πρωτεϊνών που είναι γνωστές για την ικανότητα ρύθμισης του λιπιδικού μεταβολισμού είναι οι SREBPs. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση μορίων που επάγουν τη λιπογένεση, όπως η FAS (fatty acid synthase) (Jeon TI και Osborne TF, 2012). Επίσης, η πρωτεΐνη SIRT1 (silent information regulator 1) βρέθηκε ότι ρυθμίζει τις SREBPs μέσω αποακετυλίωσης, προωθώντας έτσι την αποικοδόμησή τους στον πυρήνα και την επακόλουθη καταστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους (Ponugoti B et al., 2010). Έχει δειχθεί ότι η LSD1 συμπλοκοποιείται με τη SIRT1 σταθεροποιώντας την. Ωστόσο, παρά την αποικοδόμηση που προκαλεί η LSD1 στην SREBP-1 σταθεροποιώντας τη SIRT1, είναι παράλληλα απαραίτητη για τη δέσμευση της SREBP-1 στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Αθροιστικά, η δράση της LSD1 προκαλεί την επαγωγή της λιπογένεσης στα κύτταρα θηλαστικών (Abdulla A et al., 2014).

Είναι γενικά γνωστό ότι η LSD1 είναι μια FAD-εξαρτώμενη πρωτεΐνη. Πιο πρόσφατα όμως, έχει δειχθεί ότι η LSD1 έχει την ικανότητα να δεσμεύει και φολικό (Luka Z et al., 2011). Μια μελέτη κατά την οποία κύτταρα επωάστηκαν σε DFO (desferoxamine), ο οποίος είναι ένας χηλικός παράγοντας του σιδήρου, έδειξε ότι προκλήθηκαν επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες ενεργοποιούν κυτταρικά αποπτωτικά μονοπάτια κι έτσι αυξάνεται η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Αυτό συνέβη μέσω της αρνητικής ρύθμισης της LSD1 από το DFO. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αλληλοεξάρτηση μεταξύ των μεταβολικών μονοπατιών σιδήρου, φολικού και φλαβινών μπορεί έμμεσα να επηρεάσει τα επίπεδα και τη λειτουργία της LSD1 (Pogribny IP et al., 2013).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων η LSD1 εμπλέκεται στην HCC. Αρχικά, η LSD1 μπορεί να αποτρέψει τη συσσώρευση διμεθυλομάδων στην p53, καταστέλλοντας έτσι τη δράση της ως μεταγραφικός παράγοντας. Έτσι, μέσω τροποποιήσεων της χρωματίνης, εμποδίζεται η απόπτωση. Υπάρχουν πολλές μελέτες μέχρι σήμερα, οι οποίες δείχνουν ότι η LSD1 προωθεί τη μετάβαση της

κυτταρικής φάσης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προωθώντας έτσι την ογκογένεση (Lim S et al., 2010, Scoumanne A και Chen X, 2007). Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, καταστολή της LSD1 σε κυτταροκαλλιέργεια επέφερε μείωση των επιπέδων των Bcl-2 και c-Myc, τα οποία είναι δύο κυρίαρχα ογκογονίδια που προωθούν την καρκινογένεση. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι η LSD1 υπερεκφράζεται σε ιστούς HCC και ότι τα επίπεδα έκφρασής της είναι ευθέως ανάλογα με το στάδιο του όγκου (Zhao Z et al., 2013).

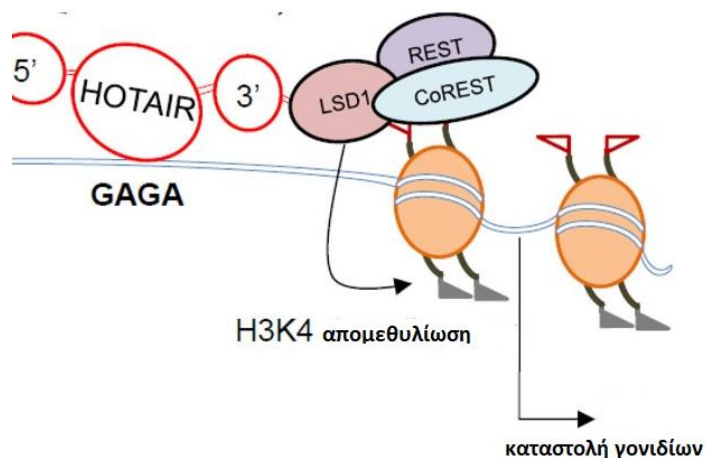
Σε γενικές γραμμές, έχει δειχθεί ότι η LSD1 μεταβάλλει σε πολύ μεγάλο βαθμό την παραγωγή ενέργειας στα HKK κύτταρα, ενεργοποιώντας το μονοπάτι της γλυκόλυσης και καταστέλλοντας τη μιτοχονδριακή αναπνοή. Αυτό συμβαίνει καθώς η LSD1, ως ιστονικός τροποποιητής, καταστέλλει τα γονίδια του μιτοχονδριακού μεταβολισμού μέσω της δράσης απομεθυλίωσης της H3K4 που διαθέτει, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί έμμεσα τα γονίδια που συμμετέχουν στη γλυκόλυση, μέσω ενεργοποίησης του HIF1α, μόριο το οποίο εμφανίζεται αυξημένο σε κύτταρα HKK, προστατεύοντάς το παράλληλα από αποικοδόμηση (Sakamoto A et al., 2012). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα της LSD1 να διατηρεί την πολυδυναμικότητα των καρκινικών κυττάρων παρεμβαίνοντας στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθιστά την LSD1 ένα μόριο που προάγει την ογκογένεση (Harris WJ et al., 2012).

4.2 Επίδραση του HCV ιού στην LSD1

Υπάρχουν διάφορες έρευνες που δείχνουν ότι η LSD1 διαθέτει ενεργό ρόλο σε πολλές ικές διεργασίες όπως ιική λοίμωξη, έκφραση ικών πρωτεϊνών, καθώς και μετάβαση στη λανθάνουσα κατάσταση. Οι ιοί με σκοπό να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιούν εξ ολοκλήρου τον επιγενετικό μηχανισμό των κυττάρων-ξενιστών (Man RJ et al., 2016).

Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο ο HCV επηρεάζει άμεσα την LSD1 είναι μέσω των HCV core και HOTAIR. Το HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) είναι ένα lncRNA (long non-coding RNA), το οποίο είναι ογκογόνο και έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού, του στομάχου και του τραχήλου. Συμμετέχει στην επιγενετική ρύθμιση γονιδίων, καθώς και σε διάφορα κυτταρικά μονοπάτια (Mohammadreza H και Abbas S, 2015). Το HOTAIR έχει τριπλάσια έκφραση σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν την HCV core (Li ZQ et al., 2016). Το HOTAIR παρεμποδίζει την έκφραση της SIRT1 μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή, μεταβάλλοντας έτσι τον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων προς όφελος του πολλαπλασιασμού του HCV (Barriocanal M και Fortes P, 2017). Φαίνεται ότι γενικότερα ρυθμίζει τη δράση πολλών σημαντικών επιγενετικών τροποποιητών, μεταξύ αυτών και της LSD1. Η αλληλεπίδραση του HOTAIR με την LSD1 πραγματοποιείται μέσω του 3' άκρου του πρώτου, το οποίο στη

συνέχεια στρατολογεί την LSD1 προς αποσιώπηση γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης σε H3K4 κατάλοιπα (Bhan A και Mandal S, 2015).



Εικόνα 75: Αλληλεπίδραση του HOTAIR με την LSD1. Το HOTAIR είναι ένα lncRNA (long non-coding RNA) το οποίο έχει ογκογόνο δράση, καθώς μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων τροποποιεί πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχει βρεθεί ότι η έκφρασή του τριπλασιάζεται σε κύτταρα που εκφράζουν την HCV core. Έπειτα το HOTAIR αλληλεπιδρά με διάφορους επιγενετικούς τροποποιητές, μεταξύ αυτών και με την LSD1. Η αλληλεπίδραση του HOTAIR με την LSD1 πραγματοποιείται μέσω του 3' άκρου του πρώτου, το οποίο στη συνέχεια στρατολογεί την LSD1 προς αποσιώπηση γονιδίων μέσω απομεθυλίωσης σε H3K4 κατάλοιπα (Bhan A και Mandal S, 2015).

Μπορούμε να υποθέσουμε μέσω της βιβλιογραφίας μας και έμμεσους μηχανισμούς με τους οποίους ο HCV ιός μπορεί να επηρεάζει την έκφραση ή/και τη λειτουργία της LSD1 προς όφελός του. Αναφέρεται παραπάνω ότι η LSD1 συμπλοκοποιείται με τη SIRT1 επάγοντας τη λιπογένεση (Abdulla A et al., 2014). Πράγματι, μαζί αποτελούν ένα σύμπλοκο το οποίο αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη τροποιώντας έτσι την έκφραση πολλών γονιδίων (Mulligan P et al., 2012). Επιπλέον, πειράματα τα οποία περιλαμβάνουν αναστολείς της SIRT1, έδειξαν ότι η SIRT1 είναι υπεύθυνη για την αποακετυλίωση και την επακόλουθη ενεργοποίηση της LSD1, αυξάνοντας παράλληλα τη σταθερότητα και την έκφρασή της (Liu C et al., 2017). Ένας νέος μηχανισμός που προτείνεται από τους Liu C et al., εξηγεί ότι σε HKK κύτταρα η αυτοανανέωση τους, η οποία είναι χαρακτηριστική δράση της LSD1, επιτυγχάνεται με αποακετυλίωση της LSD1 από τη SIRT1, μέσω του μονοπατιού Notch (Liu C et al., 2017). Από την άλλη μεριά, μελέτες δείχνουν ότι κατά τη διαμόλυνση των κυττάρων με την HCV core πρωτεΐνη, λόγω της μεταβολής της αναλογίας $NAD^+/NADH$ που προκαλείται, μεταβάλλεται η δραστηριότητα της SIRT1, αφού είναι εξαρτώμενη από NAD, και μειώνεται (You J et al., 2013). Έτσι, αν και είναι δύσκολο να διαπιστώσουμε αν πράγματι τα επίπεδα της LSD1 μεταβάλλονται από τη μόλυνση με τον HCV ιό μέσω μηχανισμού που περιλαμβάνει τη SIRT1.

Η κινάση καζεΐνης 2 (casein kinase 2, CK2), είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία αποτελείται από δύο καταλυτικές και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες. Διαθέτει πολλά υποστρώματα και επομένως πολλές κυτταρικές λειτουργίες, μεταξύ αυτών αποφυγή της απόπτωσης (Litchfield DW, 2003). Μεταξύ των πολλών

υποστρωμάτων της, η CK2 έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει και να ρυθμίζει την LSD1. Έτσι, μέσω της LSD1, η CK2 μπορεί να εμπλακεί στην επιγενετική ρύθμιση πολλών γονιδίων (Costa R et al., 2014). Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τον μεταβολισμό της ενέργειας μέσω της LSD1, η CK2 επηρεάζει και το μεταβολισμό του σιδήρου στο ήπαρ, μέσω του μορίου της εψιδίνης, κύριου μορίου-ρυθμιστή της ομοιόστασης του σιδήρου, ενώ μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε για πρώτη φορά σύνδεση μεταξύ της CK2 και της εψιδίνης, καθώς και ενεργοποίηση μέσω της CK2 των μονοπατιών STAT3 και BMP/SMAD από την HCV core πρωτεΐνη (Foka P et al., 2014). Από τη βιβλιογραφία μας βλέπουμε ότι η CK2 αλληλεπιδρά με δύο πρωτεΐνες του HCV ιού, τις NS2 και NS5A. Η CK2 έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει την HCV NS2 πρωτεΐνη, οδηγώντας την έτσι σε απόπτωση μέσω πρωτεασώματος. Η ρύθμιση αυτή της NS2 μπορεί να αποτελεί μηχανισμό του HCV ώστε παράλληλα να επάγει την απόπτωση μέσω CIDEB, αλλά και τη διαφυγή από την άμυνα του κυττάρου-ξενιστή (Franck N et al., 2005). Η CK2 επιδρά στον αναδιπλασιασμό του ιού φωσφορυλιώνοντας επίσης την NS5A, η οποία υπάρχει σε δύο φωσφορυλιωμένες μορφές, 56 και 58 kDa αντίστοιχα, και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μονοπάτι σχηματισμού του ιού (Secci E et al., 2016).

Η αλληλεπίδραση αυτή της CK2 με τις πρωτεΐνες του HCV ιού, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδρασή της με ένα τόσο σημαντικό επιγενετικό ρυθμιστή του μεταβολισμού της ενέργειας όσο η LSD1, μας δημιούργησε το ερώτημα εάν η LSD1 αλληλεπιδρά κατά κάποιο τρόπο με τον ιό μετά από λοίμωξη. Πράγματι, όταν ένα κύτταρο-ξενιστής μολύνεται με τον HCV ιό, η λιπιδική του κατάσταση μεταβάλλεται. Έτσι, υποθέσαμε ότι ίσως ο HCV ιός να αλληλεπιδρά με την LSD1 μέσω της CK2, ώστε να μεταβάλλει την ενεργειακή κατάσταση, καθώς και τη λιπιδική σύσταση ενός κυττάρου προς όφελος του αναδιπλασιασμού του.

Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε ένα πλασμίδιο έκφρασης που να φέρει το γονίδιο της ανθρώπινης LSD1 και με αυτό διαμολύναμε σειρές ηπατοκυττάρων HepG2 και Huh7.5, προς σχηματισμό κυτταρικών κλώνων που να υπερεκφράζουν την LSD1. Η διαφορά στη συγκέντρωση αντιβιοτικού γενετισίνης (G418) μεταξύ των κυτταροσειρών Huh7.5 και HepG2 οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα HepG2 εμφανίζουν μια ενδογενή αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, σε συγκέντρωση 400 µg/ml (Mersch-Sundermann V et al., 2004), κι έτσι για την άσκηση επιλογής χρησιμοποιήσαμε συγκέντρωση γενετισίνης 1000 µg/ml, δηλαδή συγκέντρωση κατά 300 µg/ml μεγαλύτερη από αυτή που χρησιμοποιήσαμε για την επιλογή στα Huh7.5. Αφού συγκρίναμε την έκφραση των κλώνων που κατασκευάσαμε σε σχέση με μη μετασχηματισμένα ηπατοκύτταρα, επιλέξαμε έναν από τους κλώνους Huh7.5 αυτούς, καθώς και μη μετασχηματισμένα κύτταρα Huh7.5, ώστε να τα μολύνουμε με στελέχη του HCV ιού. Ο έλεγχος της υπερέκφρασης έγινε σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω μεθόδου Western blot και σε επίπεδο mRNA με μέθοδο qRT-PCR. Τα στελέχη του HCV ιού που μελετήσαμε στο πείραμα είναι τα JFH1 και 3α. Με μόλυνση των κυττάρων Huh7.5 με τα δύο στελέχη και μέτρηση των επιπέδων της LSD1 σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA

ανά χρονικά διαστήματα (24, 48, 72 και 96 ώρες) μελετήσαμε την επίδραση των στελεχών αυτών του HCV ιού στην ενδογενή LSD1 των κυττάρων. Βλέπουμε στο προηγούμενο κεφάλαιο, στην εικόνα 57 ότι πράγματι η μόλυνση με τα στελέχη JFH1 και 3α του HCV ιού μεταβάλλει τα επίπεδα της LSD1 κατά την οξεία φάση, με αποκορύφωμα στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Στη συνέχεια παρατηρούμε ότι στην περίπτωση του JFH1 η έκφραση της LSD1 επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ στην περίπτωση του 3α από τις 96 ώρες και έπειτα αυξάνεται και πάλι. Υπάρχει μελέτη στην οποία μολύνθηκαν ηπατοκύτταρα με διάφορους γονότυπους του HCV ιού και στη συνέχεια μετρήθηκε η αύξηση των λιπιδίων μέσα στα κύτταρα. Μεταξύ των γονοτύπων που εξετάστηκαν, ο 3α επέφερε τριπλάσια αύξηση των τριγλυκεριδίων στα κύτταρα σε σχέση με άλλους γονότυπους, ενώ ο JFH1 επέφερε στα κύτταρα απλώς μια ανακατανομή των λιπιδίων των κυττάρων (Abid K et al., 2005). Αυτό είναι κάτι που διαπιστώσαμε και στα δικά μας κύτταρα που μολύναμε, καθώς τα κύτταρα οπτικά τουλάχιστον, είχαν αλλάξει μορφολογία, πιθανώς λόγω της συσσώρευσης λιπιδίων, τόσο σε κύτταρα του κλώνου Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1, όσο και σε απλά κύτταρα μετά τη μόλυνσή τους με τον HCV ιό. Το φαινόμενο μάλιστα ήταν ιδιαίτερα έντονο σε κύτταρα του κλώνου Hu1b μετά από μόλυνση με το στέλεχος 3α. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να επαναληφθεί το πείραμα στο μέλλον, παίρνοντας μετρήσεις για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, πέρα από τις 96 ώρες μετά τη μόλυνση, ώστε να βγει και κάποιο συμπέρασμα για τα μεταγενέστερα γεγονότα.

4.3 Επίδραση της LSD1 στον HCV ιό

Σε αυτό το σημείο δυστυχώς υπάρχουν ακόμα λιγότερα δεδομένα. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι το γονιδίωμα των DNA ιών, καθώς αυτοί εισάγονται στο κύτταρο ξενιστή, αποκτά αμέσως δομή χρωματίνης, επομένως υπόκειται σε επιγενετικές ρυθμίσεις, ακριβώς όπως το γονιδίωμα του κυττάρου (Knipe DM και Cliffe A, 2008). Η LSD1 στις περιπτώσεις αυτές δρα ποικιλοτρόπως. Για παράδειγμα, παρεμπόδιση της LSD1 στο γονιδίωμα του ιού του έρπητα (herpes simplex virus, HSV) προκαλεί αυξημένη μεθυλίωση και οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής του γονιδιώματος και παρεμπόδιση της εισόδου στο λυτικό κύκλο (Liang Y et al., 2013). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η LSD1 δρα επάνω στο γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας B (hepatitis B virus, HBV) ενεργοποιώντας τη μεταγραφή του (Alacorn V et al., 2016). Με βάση τα δεδομένα αυτά θα περιμέναμε ενδεχομένως οι RNA ιοί, όπως ο HCV, να μην επηρεάζονται από τη δράση της LSD1. Ωστόσο, η LSD1 ίσως να επηρεάζει τους RNA ιούς μέσω απομεθυλίωσης ενδογενών πρωτεϊνών ή και ιικών πρωτεϊνών.

Στη βιβλιογραφία μας προτείνεται ότι η LSD1 δρα κατά των RNA ιών συμμετέχοντας σε ενδογενείς αντιικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, γνωρίζουμε ότι το μόριο IFITM3, που ανήκει στην οικογένεια γονιδίων IFITM (interferon-inducible transmembrane gene family), έχει βρεθεί ότι επάγεται από την ιντερφερόνη α (interferon α, INFα), βρίσκεται στη μεμβράνη των ενδοσωμάτων, και κατόπιν ενεργοποίησής

της από την IFNα αποκτά αντιικική δράση έναντι των RNA ιών, μπλοκάροντας τα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής των ιών αυτών. Το ενδιαφέρον εδώ είναι ότι η IFNα επάγει την ενεργοποίηση της IFITM3 στρατολογώντας την LSD1, η οποία με τη σειρά της απομεθυλώνει την IFITM3 στο κατάλοιπο λυσίνης K88me1. Η υπόθεση αυτή έχει επιβεβαιωθεί για τον ιό της γρίπης τύπου A (influenza A virus, IAV) (Shan J et al., 2017).

Πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Alexander Bally et al., δείχνει ότι σε καταστάσεις οξείας ιικής λοίμωξης ή καρκίνου, η έκφραση του ανοσοκατασταλτικού υποδοχέα προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD-1 (Programmed cell death-1) στα Τα κύτταρα οδηγεί σε εξάντληση των κυττάρων, τα οποία αδυνατούν να αποκριθούν κατάλληλα στην παρουσία ενός αντιγόνου και ότι στα κύτταρα αυτά, η δράση της LSD1 έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση του PD-1 και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απάντησης έναντι των καρκινικών ή των μολυσμένων από ιό κυττάρων (Bally A et al., 2016).

Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αυτά που πιστεύαμε για την επίδραση της LSD1 στην έκβαση της λοίμωξης από τον HCV ιό, δεδομένου του ρόλου της LSD1 να ρυθμίζει τον λιπιδικό μεταβολισμό του ηπατοκυττάρου σε συνδυασμό με την ανάγκη του ιού για αυξημένα λιπίδια κατά τον αναδιπλασιασμό του. Προχωρήσαμε σε μόλυνση του κλώνου Hu1b που υπερεκφράζει την LSD1 που κατασκευάσαμε, καθώς και μη μετασχηματισμένων ηπατοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας, με τα στελέχη του HCV ιού, JFH1 και 3α. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε απομόνωση του συνολικού RNA των μολυσμένων κυττάρων ανά χρονικά διαστήματα (24, 48, 72 και 96 ώρες). Στη συνέχεια με τη χρήση ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης και Real-time PCR, μετρήσαμε την NS3 ιική πρωτεΐνη σε όλα τα δείγματα και για τα δύο στελέχη, με σκοπό να κατασκευάσουμε μια καμπύλη κινητικής του αναδιπλασιασμού των JFH1 και 3α. οι καμπύλες αυτές απεικονίζονται στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Στη μόλυνση με τον JFH1 παρατηρούμε ότι στις πρώτες 24 ώρες μετά τη λοίμωξη η LSD1 δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τον αναδιπλασιασμό του ιού και μέχρι και τις 48 ώρες μετά τη λοίμωξη η αύξηση της ιικής πρωτεΐνης είναι η ίδια σε κύτταρα Huh7.5 και κύτταρα κλώνου Hu1b. Μάλιστα, στο σημείο αυτό η NS3 παρουσιάζει τη μέγιστη έκφρασή της στα κύτταρα Huh7.5. Έπειτα, οι δύο καμπύλες παίρνουν διαφορετική κατεύθυνση, με αυτή των Huh7.5 να μειώνεται, ενώ η NS3 στον κλώνο Hu1b συνεχίζει να αυξάνεται, φτάνοντας σε μέγιστο αργότερα, στις 72 ώρες. Μετά τις 72 ώρες και πάλι μειώνεται. Αυτό μας δείχνει ότι η LSD1 επιδρά θετικά στον αναδιπλασιασμό του ιού, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με όσα είδαμε παραπάνω. Παρατηρούμε ωστόσο ότι η έκφραση της NS3 στις 96 ώρες είναι πολύ υψηλότερη σε σχέση τα κύτταρα του μάρτυρα. Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να συνεχιστεί το πείραμα για παραπάνω ώρες, ώστε να δούμε τι συμβαίνει αργότερα με τον αναδιπλασιασμό του ιού.

Στη μόλυνση με τον 3α παρατηρούμε κάτι το οποίο είναι τελείως αντίθετο με το παραπάνω αποτέλεσμα. Βλέπουμε ότι στις πρώτες 24 ώρες μετά τη μόλυνση η έκφραση NS3 είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα, ενώ στη συνέχεια, στις 48 ώρες, σχεδόν μηδενίζεται στην περίπτωση του κλώνου Hu1b ενώ τα Huh7.5 παρουσιάζουν το μέγιστο της ποσότητας NS3, όπως ακριβώς συμβαίνει και στην μόλυνση από τον JFH1. Έπειτα, η ποσότητα NS3 στα κύτταρα Huh7.5 μειώνεται απότομα ενώ στον κλώνο αυξάνεται, ώπου οι δύο καμπύλες τέμνονται στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση, και αυξάνονται παράλληλα κατά το επόμενο χρονικό διάστημα μέχρι τις 96 ώρες. Εδώ θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να υπάρχει μια επιπλέον τιμή πριν τις 24 ώρες, που να μας δείχνει πώς αυξάνεται η NS3 στον κλώνο μέχρι τις 24 ώρες, καθώς και τιμές σε χρονικά διαστήματα πέραν των 96 ωρών που να μας δείχνουν τη μετέπειτα πορεία της καμπύλης ανασυνδυασμού του ιού, αν αυτή θα συνεχίσει να αυξάνεται και σε πόσες ώρες μετά τη λοίμωξη θα μειώνεται. Το αποτέλεσμα αυτό μας δείχνει ότι η LSD1 όταν υπερεκφράζεται παρεμποδίζει τον αναδιπλασιασμό του 3α σε κύτταρα που μολύνονται με αυτόν.

Συνοπτικά, έχουμε ένα πείραμα το οποίο περιλαμβάνει έναν κλώνο που υπερεκφράζει την LSD1, τον Hu1b, και κύτταρα Huh7.5 που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας, τα οποία μολύναμε με δύο στελέχη του HCV ιού, τα JFH1 και 3α. Έτσι, συγκρίναμε το ρυθμό αναδιπλασιασμού των στελεχών αυτών μεταξύ του κλώνου και του μάρτυρα, ώστε να καταλήξουμε σε ένα πρώτο συμπέρασμα για την επίδραση της LSD1 στον HCV ιό. Βλέπουμε ότι πράγματι, εφόσον μεταβάλλονται οι καμπύλες κινητικής, υπάρχει επίδραση. Το παράδοξο είναι ότι η επίδραση αυτή είναι θετική στον JFH1 και αρνητική στον 3α. Δηλαδή η LSD1 αυξάνει τον αναδιπλασιασμό του JFH1, αλλά παρεμποδίζει, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, τον αναδιπλασιασμό του 3α. Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία μας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ότι ο 3α επάγει μετά τη μόλυνση τη συσσώρευση λιπιδίων μέσα στο κύτταρο. Θεωρητικά, πιστεύουμε ότι η υπερέκφραση της LSD1 μπορεί να επάγει επίσης τη συσσώρευση λιπιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Αν ισχύει αυτό, τότε κατά τη μόλυνση με τον 3α μπορεί η συσσώρευση λιπιδίων να είναι αθροιστική και αυτό να καθιστά δύσκολο τον αναδιπλασιασμό του ιού, αφού λιπίδια και ιοσωμάτια χρησιμοποιούν κοινές πρωτεΐνες για να εκκριθούν από το κύτταρο μέσω του εκκριτικού μονοπατιού. Στη συνέχεια μπορεί να ενεργοποιείται ένας εναλλακτικός μηχανισμός και ο αναδιπλασιασμός να αυξάνεται και πάλι. Αντιθέτως, ο JFH1 δεν έχει την ιδιότητα να συσσωρεύει λιπίδια στο κύτταρο, ίσως αυτός είναι και ο λόγος που δεν εμποδίζεται ο αναδιπλασιασμός του.

4.4 Συμπεράσματα-μελλοντικοί στόχοι

Όλα τα παραπάνω αποτελούν απλώς μια υπόθεση. Ενδέχεται να υπάρχουν πολλοί άγνωστοι μηχανισμοί με τους οποίους η LSD1 και ο HCV ιός να αλληλεπιδρούν, οι οποίοι να συμβάλλουν είτε θετικά είτε αρνητικά στη λοίμωξη με τον ιό και να προκύπτει έτσι ένα αθροιστικό αποτέλεσμα. Έτσι, είναι

ιδιαίτερα δύσκολο να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της LSD1 στην ιική λοίμωξη. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν για ακόμη μια φορά τη σημασία της μελέτης και της κατανόησης των επιγενετικών μηχανισμών του κυττάρου και αποτελούν έναυσμα ώστε να ασχοληθούμε περισσότερο με την αλληλεπίδραση της LSD1 με τον HCV ιό, που ίσως να αποτελεί έναν από τους πολλούς μηχανισμούς του κυττάρου που χρησιμοποιεί ο ιός προς όφελός του. Από την άλλη πλευρά, μπορεί η LSD1 να συμμετέχει σε αντιϊκούς μηχανισμούς του κυττάρου και να δρα κατά του HCV. Το πείραμα της παρούσας εργασίας μπορεί στο μέλλον να επαναληφθεί στον ίδιο ή και σε άλλους κλώνους που υπερεκφράζουν την LSD1 από αυτούς που κατασκευάσαμε, ώστε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματά μας και να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα σχετικά με το ρυθμό αναδιπλασιασμού του HCV ιού σε συνθήκες υπερέκφρασης της LSD1. Παράλληλα, θα μπορούμε να προσθέσουμε στην καμπύλη επιπλέον σημεία χρόνου μόλυνσης (time points) ώστε να δούμε τα πολύ πρώιμα ή τα μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης από τον ιό.

Η καμπύλη της κινητικής του αναδιπλασιασμού του ιού μπορεί να κατασκευαστεί και σε επίπεδο πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Western blot, ώστε σε συνδυασμό με τη μέτρηση mRNA με τη μέθοδο qRT-PCR να έχουμε μια πιο πλήρη εικόνα του αναδιπλασιασμού του ιού.

Μια καλύτερη εικόνα της αλληλεπίδρασης LSD1 και ιού μπορεί να μας δώσει η μέτρηση λιπιδίων μέσα στο κύτταρο με χρήση της χρωστικής Bodipy, η οποία είναι ειδική για χρώση λιπιδίων. Έτσι θα μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν η υπερέκφραση της LSD1 στους κλώνους προκαλεί όντως συσσώρευση λιπιδίων, καθώς και να παρακολουθήσουμε την πιθανή συσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα των κλώνων αλλά και σε μάρτυρα κατά τη μόλυνσή τους με στελέχη του ιού.

Ενδιαφέρον επίσης θα είχε να μετρηθεί η ενζυμική δραστικότητα της LSD1, τόσο ανάμεσα στους κλώνους όσο και κατά τη μόλυνση κλώνων με στελέχη του ιού. υπάρχουν πολλές μέθοδοι με τις οποίες μπορούμε να μετρήσουμε την ενζυμική δραστικότητα ενός ενζύμου. Υπάρχουν φασματοφωτομετρικές, φθορισμομετρικές, ανοσοενζυμικές κά μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στη μέτρηση υποστρώματος το οποίο καταναλώνεται από το προς μελέτη ένζυμο.

Σε γενικές γραμμές, η παρούσα εργασία έχει ανοίξει πολλούς νέους δρόμους οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ιού με το κύτταρο ξενιστή. Έχουμε βρει ότι η LSD1, πρωτεΐνη που ως επιγενετικός ρυθμιστής κατέχει πολλαπλές δράσεις στην ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων, παίζει έναν όχι τόσο σαφή, αλλά πολύ σημαντικό ρόλο στη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C. Η LSD1 μπορεί να αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για τον HCV ιό, διότι είναι ρυθμιστής του λιπιδικού μεταβολισμού που έχει πολύ μεγάλη σημασία για τον κύκλο ζωής του HCV, αλλά και πολλών άλλων σημαντικών γονιδίων. Για τον ίδιο λόγο ωστόσο, μπορεί να αποτελεί σημαντικό εργαλείο άμυνας του κυττάρου ξενιστή έναντι του ιού. Δεν έχουμε αρκετά δεδομένα ώστε να καταλήξουμε σε ένα

σαφές συμπέρασμα. Ωστόσο, καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης LSD1 και HCV ιού μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον πολύτιμο εργαλείο για μια καλύτερη αντιική θεραπεία που να στοχεύει την LSD1 για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C και του ΗΚΚ.

Βιβλιογραφία

- Abdulla A, Zhang Y, Hsu F, Xiaoli AM, Zhao X, Yang EST, Yang F (2014). Regulation of Lipogenic Gene Expression by Lysine-specific Histone Demethylase-1 (LSD1), 289(43), 29937–29947.
- Abid K, Pazienza V, de Gottardi A, Rubbia-Brandt L, Conne B, Pugnale P, Rossi C, Mangria A, Negro F (2005). An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation. *Journal of Hepatology* 42 (2005) 744–751
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
- Adamo A, Sesi B, Boue S et al (2011). LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 13(6), 652–659.
- Alarcon V, Hernández S, Rubio L, Alvarez F, Flores Y, Varas-Godoy M, De Ferrari GV, Kann M, Villanueva RA, Loyola A (2016). The enzymes LSD1 and Set1A cooperate with the viral protein HBx to establish an active hepatitis B viral chromatin state. *Sci Rep.* 2016 May 13; 6():25901.
- Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, et al. (2012). Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 55:998-1007.
- Alter HJ et al. (1975). Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*, 1975. 2(7940): p. 838-41.
- Alter MJ (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13(17):2436–41
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al. (1992). The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327(27): 1899-905
- Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. (2011). Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol* 2011;8:258-269.
- Amente S, Lania L, & Majello B (2013). The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(10), 981–986.
- Appel N, Schaller T, Penin F & Bartenschlager R (2006). From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J. Biol. Chem.* 281, 9833–9836.
- Aravind L, Iyer LM (2002). The SWIRM domain: a conserved module found in chromosomal proteins points to novel chromatin-modifying activities. *Genome Biol.* 3(8), 0039.1–0039.7.
- Arunoday Bhan and Subhrangsu S. Mandal (2015). LncRNA HOTAIR: a master regulator of chromatin dynamics and cancer *Biochim Biophys Acta.* 1856(1): 151–164.
- Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, et al. (1999). Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1999; 29(4): 1272-9.

AT Quiñones-Coello, LN Petrella, K Ayers, A Melillo, S Mazzalupo, AM Hudson, S Wang, C Castiblanco, M Buszczak, RA Hoskins, L Cooley (2006). Exploring strategies for protein trapping in *Drosophila*. *Genetics*, 175(175).

Averhoff FM, Glass N, Holtzman D (2012). Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States. *Clin Infect Dis*. 2012;55 (Suppl 1):S10–5

Bally A, Austin JW, Lu P, Boss J (2016). The histone demethylase LSD1 inhibits PD-1 expression in acute viral infections. *J Immunol* May 1, 2016, 196 (1 Supplement) 129.7;

Bar T, Kubista M, Tichopad A (2011). Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Research*. 40: gkr778.

Barrera JM, Bruguera M, Ercilla MG, et al. (1995). Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology* 1995; 21(3): 639-44

Bartenschlager R and V Lohmann (2001). Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Res*, 2001. 52(1): p. 1-17.

Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*. 2004;63:71-180.

Bartenschlager R. and V. Lohmann (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 7): p. 1631-48.

Bartenschlager, R, V Lohmann, and F Peni (2013)., The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol*. 11(7): p. 482-96.

Bartosch B & Dubuisson J (2010). Recent advances in hepatitis C virus cell entry. *Viruses* 2, 692–709.

Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. (1999). Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. *Hepatology* 1999; 30(4): 1054-8.

Benvegnù L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A (1997). Lack of correlation between hepatitis C virus genotypes and clinical course of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Hepatology* 1997; 25(1): 211-5.

Biswas D, Milne TA, Basrur V, Kim J, Elenitoba-Johnson KS, Allis CD, Roeder RG (2008). Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 15751–15756.

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin mediated endocytosis. *J Virol* 80:6964-6972.

Blanchard E, et al. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 2006. 80(14): p. 6964-72.

Blight KJ and CM Rice (1997). Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, 1997. 71(10): p. 7345-52.

Bonis PA, Tong MJ, Blatt LM, Conrad A, Griffith JL (1999). A predictive model for the development of hepatocellular carcinoma, liver failure, or liver transplantation for patients presenting to clinic with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(6): 1605-12.

Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J (2008). Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 2008;9:1268-1282.

Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP (2005). Hepatitis C virus core protein is a dimeric α -helical protein exhibiting membrane protein features. *J Virol* 79:11353–11365.

Boyer JL et al. Liver cirrhosis and its development: proceedings of the Falk Symposium 115

Bradford Marion (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F & Walewski JL (2005). The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. *Semin. Liver Dis.* 25, 105–117.

Brass V, Bieck E, Montserret R, Wolk B, Hellings JA, Blum HE, Penin F, Moradpour D (2002). An Amino-terminal Amphipathic α -Helix Mediates Membrane Association of the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *J. Biol. Chem.* 277, 8130–8139.

Bressanelli S, Tomei L, Rey FA, and De Francesco R (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* 76, 3482–3492.

Bressanelli S, Tomei L, Roussel A, Incitti I, Vitale RL, Mathieu M, De Francesco R, and Rey FA (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13034–13039.

Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G (1999). Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med* 1999; 341(1): 22-6.

Carrère-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J (2002). Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol* 76:3720–3730.

Chang Wook Kim, Kyong-Mi Chang (2013). Hepatitis C virus: virology and life cycle, *Clin Mol Hepatol* 19(1), 17-25.

Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R (1994). Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (12): 5695–5699.

Chin M., Hogan C., Nguyen D. (2016). The Natural History of Hepatitis C Viral Infection: Clinical Evaluation and Monitoring. Division of Gastroenterology and Hepatology, University of California Irvine, Irvine, CA, United States

Chong JX, Yu J-H, Lorentzen P et al (2016). Gene discovery for Mendelian conditions via social networking: de novo variants in KDM1A cause developmental delay and distinctive facial features. *Genet. Med.* 2016 Aug; 18(8): 788–795.

Choo QL et al (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome". *Science* April 1989

Chu CM, Yeh CT, Liaw YF (1999). Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut* 1999; 45(4): 613-7

Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, et al. (2002). Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *The EMBO Journal*. 2002;21(12):2893-2902. doi:10.1093/emboj/cdf295.

Cocquerel L, Op de Beeck A, Lambot M, Roussel J, Delgrange D, Pillez A, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J (2002). Topologic changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO J* 21:2893–2902.

Cohen I, Poreba E, Kamieniarz K, Schneider R (2011). Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes Cancer* 2 631–647.

Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyoud-Kraemer L, Bailley F, Trepo C HEPATITIS Group (2001). Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: An analysis of the literature. *J Viral Hepat.* 2001;8:87–95.

Cornberg M et al. (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int.* 31 (Suppl. 2), 30–60.

Costa FF, Paixão VA, Cavalher FP, et al (2006). SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;165(2):135–143.

Costa R, Arrigoni G, Cozza G, Lolli G, Battistutta R, Izpisua Belmonte JC, ... Sarno S (2014). The lysine-specific demethylase 1 is a novel substrate of protein kinase CK2. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(4), 722–729.

Cristofari G, et al. (2004). The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(8): p. 2623-31.

Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne JP, Penin F, Darlix JL (2004). The hepatitis C virus core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 32:2623–2631.

Culhane JC, Cole PA(2007). LSD1 and the chemistry of histone demethylation. *Curr. Opin. Chem. Biol* 11(5), 561–568

Culhane JC, Cole PA(2007). LSD1 and the chemistry of histone demethylation. *Curr. Opin. Chem. Biol* 11(5), 561–568.

- Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P (2011). Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Mar;89(3):205-12.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol*. 2002 ;319(5):1097–1113.
- Drazan KE (2000). Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl*, 2000. 6(4): p. 396-406.
- Duteil D, Metzger E, Willmann D, Karagianni P, Friedrichs N, Greschik H, Günther T, Buettner R, Talianidis I, Metzger D, Schüle R (2014). LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. *Nat Commun*. 10;5:4093.
- EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection (2011). *J Hepatol*. 60(2): p. 392-420.
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D and Bienz K (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol*. 76: 5974-5984.
- Einav S, Elazar M, Danieli T, and Glenn JS (2004). A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J. Virol*. 78, 11288-11295.
- Ekwall K (2005). Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends Genet*. 2005 Nov;21(11):608-15.
- Esteller M (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):286–298.
- Fattovich G, Giustina G, Degos F, et al. (1997). Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112(2): 463-72.
- Feil R, Fraga MF (2011). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2011; 13: 97–109.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89–92
- Feinstone SM et al. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*, 1975. 292(15): p. 767-70.
- Feng Q, Wang H, Ng HH, et al (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol*. 2002;12:1052–1058
- Feng S et al. (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330, 622–627.
- Franck N, Seyec J Le Guguen-guillouzo C, Erdtmann L (2005). Hepatitis C Virus NS2 Protein Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 and Targeted for Degradation to the Proteasome, 79(5), 2700–2708.
- Foka P, Dimitriadis A, Kyratzopoulou E, Giannimaras DA, Sarno S, Simos G, ... Mamalaki A (2014). A complex signaling network involving protein kinase CK2 is required for hepatitis C virus core protein-mediated

modulation of the iron-regulatory hepcidin gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(21), 4243–4258.

Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Battaglioli E, Mattevi A (2005). Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J. Biol. Chem.* 280(50), 41360–41365.

Forton, D.M., et al. (2002). New insights into hepatitis C. *Clin Med*, 2002. 2(6): p. 554-9.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005 Apr;37(4):391-400.

Friebe P, and R Bartenschlager (2002). Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J. Virol.* 76:5326-5338.

Gale M Jr, Blakely CM, Kwieciszewski B, Tan SL, Dossett M, Tang NM, Korth MJ, Polyak SJ, Gretch DR, and Katze MG (1998). Control of PKR Protein Kinase by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein: Molecular Mechanisms of Kinase Regulation *Mol. Cell. Biol.* 18, 5208–5218.

Gale M, Jr, et al. (1997). Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology*, 1997. 230(2): p. 217-27.

Garcia-Bassets I, Kwon YS, Telese F, Prefontaine GG, Hutt KR, Cheng CS, Ju BG, Ohgi KA, Wang J, Escoubet-Lozach L, Rose DW, Glass CK, Fu XD, Rosenfeld MG (2007). Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors, *Cell* 128 505–518.

Gastaminza P, Cheng G, Wieland S, Zhong J, Liao W, Chisari FV (2008). Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J Virol* 2008;82:2120-2129.

Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, et al. (2010). Ultrastructural and Biophysical Characterization of Hepatitis C Virus Particles Produced in Cell Culture. *Journal of Virology*. 2010;84(21):10999-11009. doi:10.1128/JVI.00526-10.

Ge D et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 2009. 461(7262): p. 399-401.

Georgopoulou U, Tsitoura P, Kalamvoki M, & Mavromara P. (2006). The protein phosphatase 2A represents a novel cellular target for hepatitis C virus NS5A protein. *Biochimie*, 88(6), 651–662.

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. (2003). Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125(1): 80-8

Gogos CA, Fouka KP, Nikiforidis G, Avgeridis K, Sakellaropoulos G, Bassaris H, Maniatis A, Skoutelis A (2003). Prevalence of hepatitis B and C virus infection in the general population and selected groups in South-Western Greece. *Eur J Epidemiol.* 2003;18:551–557

Goll MG, Bestor TH (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 2005;74:481–514

- Gosert R et al. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol*, 2003. 77(9): p. 5487-92.
- Gottwein, JM and Bukh, J (2008). Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv. Virus Res.* 71, 51–133.
- Griffin SD et al. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 535, 34–38.
- Guerra J, Garenne M, Mohamed MK, Fontanet A (2012). HCV burden of infection in Egypt: results from a nationwide survey. *J Viral Hepat.* 2012;19(8):560–7
- Gupta E, Bajpai M, Choudhary A (2014). Hepatitis C virus: Screening, diagnosis, and interpretation of laboratory assays. *Asian Journal of Transfusion Science.* 2014;8(1):19-25. doi:10.4103/0973-6247.126683.
- Hagan LM, Schinazi RF (2013). Best strategies for global HCV eradication. *Liver Int* 2013
- Hagan, H., E.R. Pouget, and D.C. Des Jarlais (2011). A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *J Infect Dis.* 204(1): p. 74-83.
- Hamamoto R, Saloura V, Nakamura Y (2015). Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 110–24.
- Harris HJ, Davis C, Mullins JG, Hu K, Goodall M, Farquhar MJ (2010). Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 2010;285:21092-21102.
- Harris WJ, Huang X, Lynch JT, Spencer GJ, Hitchin JR, Li Y, et al. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell* 2012;21:473–87
- Harrus D, et al. (2010). Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis. *J Biol Chem.* 285(43): p. 32906-18.
- Hatzakis A, Katsoulidou A, Kaklamani E, et al. (1996). Hepatitis C virus 1b is the dominant genotype in HCV-related carcinogenesis: a case-control study. *Int J Cancer* 1996; 68(1): 51-3.
- Hatzakis A, Wait S, Bruix J, et al. (2011). The state of hepatitis B and C in Europe: report from the hepatitis B and C summit conference. *J Viral Hepat.* 2011;18 (Suppl 1):1–16
- Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, et al (2011). Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *Int J Cancer.* 2011;128:574–86.
- Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R (2011). Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers, *Int. J. Cancer* 128 574–586.
- Hayashi N, Takehara T (2006). Antiviral therapy for chronic hepatitis C: Past, present, and future. *J Gastroenterol.* 2006;41:17–27.

- Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, et al. (2008). Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134(2): 432-9.
- Hino S, Nagaoka K, Nakao M (2013). Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J Hum Genet.* 2013 Jul;58(7):410-5.
- Hino S, Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Nakao, M (2012). FAD-dependent lysine-specific demethylase-1 regulates cellular energy expenditure. *Nature Communications*, 3, 758.
- Hojfeldt JW, Agger K, Helin K (2013). Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 917–30.
- Houghton M (2009). Discovery of the hepatitis C virus. *Liver Int.* 29:82-8
- Hourigan LF, Macdonald GA, Purdie D, et al. (1999). Fibrosis in chronic hepatitis C correlates significantly with body mass index and steatosis. *Hepatology* 1999; 29(4): 1215-9
- Hsu M, et al. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(12): p. 7271-6.
- Hu KQ, Tong MJ (1999). The long-term outcomes of patients with compensated hepatitis C virus-related cirrhosis and history of parenteral exposure in the United States. *Hepatology* 1999; 29(4): 1311-6.
- Huang J, Sengupta R, Espejo AB et al (2007). p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 449(7158), 105–108.
- Isagulants, M.G. (2003). Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003. 4(3): p. 169-83.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2012; 86: 45– 93.
- James M. Heather and Benjamin Chain (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 107(1): 1–8.
- Jeo, TI, and Osborne TF (2012). SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 65–72.
- Jirasko V, Montserret R, Appel N, Janvier A, Eustachi L, Brohm C, Steinmann E, Pietschmann T, Penin F, Bartenschlager R (2008). Structural and functional characterization of nonstructural protein 2 for its role in hepatitis C virus assembly. *J Biol Chem* 283:28546–28562.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews. Microbiology*. 12 (3): 181–96.
- Jones PA (1985). Altering gene expression with 5-azacytidine. *Cell*. 1985;40(3):485–486.
- Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415–428.

- Jutzi SJ, Rienhoff H, Pahl HL (2017). Effectiveness of LSD1 inhibition for the treatment of MPN. EHA Learning Center. Jutzi J. Jun 24, 2017; 181705
- Kapadia SB and FV Chisari (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(7): p. 2561-6.
- Kapoor A et al. (2011). Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(28): p. 11608-13.
- Kato N, et al. (1992). Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 189(1): p. 119-27.
- Kato T et al. (2003). Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* 125, 1808–1817.
- Kelley RI (1973). Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973 Oct 15;54(4):1588-94.
- Kerenyi MA, Shao Z, Hsu Y-JJ et al (2013). Histone demethylase Lsd1 represses hematopoietic stem and progenitor cell signatures during blood cell maturation. *Elife* 2, e00633.
- Knipe DM, Cliffe A (2008). Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(3):211–21.
- Knodell RG et al. (1975). Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology*, 1975. 69(6): p. 1278-85.
- Kolykhalov AA, SM Feinstone and CM Rice (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, 1996. 70(6): p. 3363-71.
- Konovalov S, & Garcia-Bassets I (2013). Analysis of the levels of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) mRNA in human ovarian tumors and the effects of chemical LSD1 inhibitors in ovarian cancer cell lines. *Journal of Ovarian Research*, 6(1), 1.
- Kontaki H, Talianidis I (2010). Cross-talk between post-translational modifications regulate life or death decisions by E2F1, *Cell Cycle* 9 3836–3837.
- Kontaki H, Talianidis I(2010). Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol. Cell* 39(1), 152–160.
- Kopp M, Murray CL, Jones CT, Rice CM (2010). Genetic analysis of the carboxy-terminal region of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 84:1666–1673.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):285-94.
- Koulentaki M, Ergazaki M, Moschandrea J, Spanoudakis S, Tzagarakis N, Drandakis PE, Spandidos DA, Kouroumalis EA (2001). Prevalence of hepatitis B and C markers in high-risk hospitalised patients in Crete: a five-year observational study. *BMC Public Health*. 2001;1:17

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4), 693–705.

Krey T, d'Alayer J, Kikuti CM, Saulnier A, Damier-Piolle L, Petitpas I, Johansson DX, Tawar RG, Baron B, Robert B, England P, Persson MA, Martin A, Rey FA (2010) The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog* 6:e1000762

Laemmli UK (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680–685.

Leamy AK, Egnatchik RA, Young JD (2013). Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* 52:165–174.

Lee KK, Workman JL (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4):284-95.

Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ (2014). Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20:9270–9280

Lefrere JJ, Guiramand S, Lefrere F, Mariotti M, Aumont P, Lerable J, et al. (1997). Full or partial seroreversion in patients infected by hepatitis C virus. *J Infect Dis*. 1997;175:316–22.

Leigh JP, Bowlus CL, Leistikow BN, Schenker M (2001). Costs of hepatitis C. *Arch Intern Med* 2001; 161(18): 2231-7

Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, and Weber PC (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat. Struct. Biol.* 6, 937–943.

Li HC, Ma HC, Yang CH, Lo SY (2014). Production and pathogenicity of hepatitis C virus core gene products. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7104– 7122.

Li ZQ, Gu XY, Hu JX, Ping Y, Li H, Yan JY et al. (2016). Hepatitis C virus core protein impairs metabolic disorder of liver cell via HOTAIR-Sirt1 signalling. *Biosci. Rep.* 36:e00336 10.1042/BSR20160088.

Liang Y, Quenelle D, Vogel JL, Mascaro C, Ortega A, Kristie TM (2013). A novel selective LSD1/KDM1A inhibitor epigenetically blocks herpes simplex virus lytic replication and reactivation from latency. *MBio*. 2013;4(1):e00558–12.

Lienhart WD, Gudipati V, Macheroux P (2013). The human flavoproteome. *Arch Biochem Biophys*. 15;535(2):150-62.

Lim S, Metzger E, Schüle R, Kirfel J, Buettner R (2010). Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases. *Int J Cancer*. 127:1991–8.

Lindenbach BD and CM Rice (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 2005. 436(7053): p. 933-8.

Lindenbach BD, Rice CM (2001). Flaviviridae: The viruses and Their replication. In: KDM Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Strauss SE, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2001. pp. 991–1042.

Litchfield DW (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003 Jan 1; 369(Pt 1): 1–15.

Liu C, Liu L, Chen X, Cheng J, Zhang H, Zhang C, ... Qian C (2017). LSD1 stimulates cancer-associated fibroblasts to drive Notch3-dependent self-renewal of liver cancer stem-like cells. *Cancer Research*, canres.1236.2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1236>.

Lohmann V et al. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285, 110–113.

Lohmann V, Körner F, Dobierzewska A & Bartenschlager R (2001). Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J. Virol.* 75, 1437–1449.

Lohmann V, Körner F, Koch J O, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999;285:110–113.

Loidl P (1994). Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma.* 1994 Dec;103(7):441-9.

Luka Z, Moss F, Loukachevitch LV, Bornhop DJ and Wagner C (2011). Histone demethylase LSD1 is a folate-binding protein. *Biochemistry* 50: 4750-4756.

Lundin M, Monne M, Widell A Von Heijne G and Persson MA (2003). Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* 77, 5428–5438.

Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med* 2011;17:589-595.

Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, Shanmugam S, Singh SM, Lemon SM, Yi M (2011). Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol* 85:86–97.

Macdonald A, et al. (2004). The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 3): p. 721-9.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30 (6): 1292–305.

Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ (2008). Acute hepatitis C. *Lancet* 2008; 372(9635): 321-32

Maiques-diaz, A. (2016). LSD1 : biologic roles and therapeutic targeting, 1, 1103–1116.

Man RJ, Chen LW, & Zhu HL (2016). Telomerase inhibitors: a patent review (2010–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 26(6), 679–688.

Mandel M, Higa A (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology.* 53 (1): 159–62.

- Marcellin P (1993). The clinical spectrum of the disease. *J Hepatol* 1993; 31(1): 9-16
- Marina Barriocanal and Puri Fortes (2017). Long Non-coding RNAs in Hepatitis C Virus-Infected Cells *Front Microbiol.* 8: 1833.
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21:3980–3988.
- Meredith LW, Wilson GK, Fletcher NF, McKeating JA (2012). Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Rev Med Virol* 2012;22:182-193.
- Merican I, Sherlock S, McIntyre N, Dusheiko GM (1993). Clinical, biochemical and histological features in 102 patients with chronic hepatitis C virus infection. *Q J Med* 1993; 86(2): 119-25.
- Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology.* 198 (1–3): 329–340.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N et al(2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptordependent transcription. *Nature* 437(7057), 436–439
- Miyanari Y et al (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*, 9(9): p. 1089-97.
- MJ Roth, N Tanese, SP Goff (1985). Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82.
- Modorich P, Lehman IR. (1973). Deoxyribonucleic acid ligase. A steady state kinetic analysis of the reaction catalyzed by the enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 248 (21): 7502–11
- Mohammadreza Hajjari and Abbas Salavaty (2015). *HOTAIR*: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers *Cancer Biol Med.* 12(1): 1–9.
- Monga HK, Rodriguez-Barradas MC, Breaux K, et al. (2001). Hepatitis C virus infection-related morbidity and mortality among patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001; 33(2): 240-7.
- Moradpour D, et al. (2004). Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*, 2004. 78(23): p. 13278-84.
- Moradpour D, Penin F (2013). Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. In: Bartenschlager R. (eds) *Hepatitis C Virus: From Molecular Virology to Antiviral Therapy*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 369.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol.* 5: 453–463
- Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, Moradpour D (2011) Nonstructural protein 3–4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 18:305–315

- Mulligan P, Yang F, Stefano L Di, Ji J, Ouyang J, Nishikawa JL, ... Näär AM (2012). NIH Public Access, 42(5), 689–699.
- Mullis KB et al. (1987). Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences U.S. Patent 4,683,195.
- Murray K (1964). The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry*. 1964 Jan;3:10-5.
- MW Pfaff, A Tichopad, C Prgomet and TP Neuvians (2005). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations *Biotechnology Letters* 26:509-515.
- Nagase T, Ishikawa K, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 5: 31-39.
- Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E (2010). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation, *Mol. Cell* 10 1119–1128.
- Nakano T et al. (2012). An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver Int.* 32(2): p. 339-45.
- National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology*, 1997. 26(3 Suppl 1): p. 2S-10S.
- Niepmann M (2013). Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 369: 143– 166.
- Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*. 1989 May 5;57(3):449-57.
- Nousbaum JB, Pol S, Nalpas B, Landais P, Berthelot P, Bréchet C (1995). Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995; 122(3): 161-8.
- Olins AL, Olins DE (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*. 1974 Jan 25;183(4122):330-2.
- Ostapowicz G, Watson KJ, Locarnini SA, Desmond PV (1998). Role of alcohol in the progression of liver disease caused by hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1998; 27(6): 1730-5.
- Otto GA & Puglisi JD (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 119, 369–380.
- Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M Jr. (2009). Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 394:99-108.
- Ozaras, R. and V. Tahan (2009). Acute hepatitis C: prevention and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009. 7(3): p. 351-61.

Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004). Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol.* 2004;24:9630–9645.

Pan D, Mao C, Wang YX (2013). Suppression of gluconeogenic gene expression by LSD1-mediated histone demethylation. *PLoS One* 8:e66294.

Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, and Yong Hoon Kim (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp.* (62): 3923.

Penin F et al. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2004. 39(1): p. 5-19.

Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. (2004). Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 279, 40835–40843.

Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006;45(4):529–38.

Pessione F, Degos F, Marcellin P, et al. (1998). Effect of alcohol consumption on serum hepatitis C virus RNA and histological lesions in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27(6): 1717-22.

Peter J. Russel (2005). *iGenetics: A Molecular Approach*. San Francisco, California, United States of America: Pearson Education

Petracca R, Falugi F, Galli G, Norais N, Rosa D, Campagnoli S, et al (2000). Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* 2000;74:4824-4830.

Pileri P, et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998. 282(5390): p. 938-41.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 2007 Mar;17(3):118-26.

Planas R, Ballesté B, Alvarez MA, et al. (2004). Natural history of decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis. A study of 200 patients. *J Hepatol* 2004; 40(5): 823-30.

Poenisch, M. and R. Bartenschlager (2010). New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Semin Liver Dis*, 2010. 30(4): p. 333-47.

Pogribny IP, Tryndyak VP, Pogribna M, Shpileva S, Surratt G, Gamboa G, Beland FA (2013). Modulation of intracellular iron metabolism by iron chelation affects chromatin remodeling proteins and corresponding epigenetic modifications in breast cancer cells and increases their sensitivity to chemotherapeutic agents, (ii), 1822–1832.

Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, Wu SY, Chiang CM, Veenstra TD, and Kemper JK (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 33959–33970.

Popescu C-I, Callens N, Trinel D, Roingeard P, Moradpour D, Descamps V, Duverlie G, Penin F, Hélot L, Rouillé Y, Dubuisson J (2011). NS2 protein of hepatitis C virus interacts with structural and nonstructural proteins towards virus assembly. *PLoS Pathog* 7:e1001278.

Popescu CI, Rouille Y, Dubuisson J. (2011). Hepatitis C virus assembly imaging. *Viruses* 2011;3:2238-2254.

Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, et al. (2000). Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31(4): 828-33.

Press D (2010). Epigenomics in cancer management, 255–265.

Prince A.M et al. (1974). Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*, 1974. 2(7875): p. 241-6.

Raptopoulou M, Touloumi G, Tzourmakliotis D, Nikolopoulou G, Dimopoulou M, Giannoulis G, Vasiliadis T, Skoutelis A, Anagnostou O, Hatzis G, et al. (2011). Significant epidemiological changes in chronic hepatitis C infection: results of the nationwide HEPNET-GREECE cohort study. *Hippokratia*. 2011;15:26–31

Rice CM (2011). New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Top Antivir Med*. 19(3): p. 117-20.

Rijnbrand RC, Lemon SM (2000). Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;242:85–116.

Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*.pdb.prot5439.

RJ Roberts, T Vincze, J Posfai et al. (2015). REBASE—adatabase for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 43;298–299.

Romero-Brey I, Merz A, Chiramel A, Lee JY, Chlanda P, Haselman U, et al. (2012). Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication. *PLoS Pathog* 2012;8:e1003056.

Rosen HR (2011). Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 364(25): p. 2429-38.

Roudot-Thoraval F, Bastie A, Pawlotsky JM, Dhumeaux D (1997). Epidemiological factors affecting the severity of hepatitis C virus-related liver disease: a French survey of 6,664 patients. *Hepatology* 1997; 26(2): 485-90.

Secci E, Luchinat E, Banci L (2016). The Casein Kinase 2-Dependent Phosphorylation of NS5A Domain 3 from Hepatitis C Virus Followed by Time-Resolved NMR Spectroscopy. *Chembiochem*. 2016 Feb 15;17(4):328-33.

Sadler, MD and Lee SS (2015). Revolution in hepatitis C antiviral therapy. *Br Med Bull*. 113(1): p. 31-44.

Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839): 487–491.

Sainz B, Tencate V, Uprichard SL (2009). "Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection". *Virology Journal*. 6: 103.

Sakamoto A, Hino S, Nagaoka K et al (2015). Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*. 75(7), 1445–1456.

Sakamoto A, Hino S, Nagaoka K, Anan K, Takase R, Matsumori H, Ojima H, Kanai Y, Arita K, Nakao M (2015). Lysine Demethylase LSD1 Coordinates Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 2015 Apr 1;75(7):1445-56.

Saleque S, Kim J, Rooke HM, Orkin SH (2007). Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol. Cell* 27(4), 562–572.

Santolini E, Migliaccio G, La Monica N (1994). Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 68:3631–3641.

Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, et al (2009). Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16:17–22

Schiff J (2002). An unsung hero of medical research. *Yale Alumni Magazine*.

Schiff, E.R., M. de Medina, and R.S. Kahn (1999). New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Semin Liver Dis*, 19 Suppl 1: p. 3-15.

Schmidt DMZ, McCafferty DG (2007). Trans-2- Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1. *Biochemistry* 46(14), 4408–4416.

Schmidt-Mende J et al. (2001). Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem*, 2001. 276(47): p. 44052-63.

Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N (2009). Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:5342–5347.

Scoumanne A, Chen X (2007). The lysine-specific demethylase 1 is required for cell proliferation in both p53-dependent and -independent manners, *J. Biol. Chem*. 282 15471–15475.

Shakil AO, Conry-Cantilena C, Alter HJ, et al. (1995). Volunteer blood donors with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic, and histologic features. The hepatitis C study group. *Ann Intern Med* 1995; 125(5): 330.

Shan J, Zhao B, Shan Z, Nie J, Deng R, Xiong R, Tsun A, Pan W, Zhao H, Chen L, Jin Y, Qian Z, Lui K, Liang R, Li D, Sun B, Lavillette D, Xu K, Li B (2017). Histone demethylase LSD1 restricts influenza A virus infection by erasing IFITM3-K88 monomethylation. *PLoS Pathog*. 2017 Dec 27;13(12):e1006773.

Sharif J, Muto M, Takebayashi S, et al (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 2007;450(7171):908–912.4

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941-953.

- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar B, Whetstone JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex, *Nature* 422 735–738.
- Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, & Shi Y (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Molecular Cell*, 19(6), 857–864.
- Shi YJY, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi YJY (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell* 19(6), 857–864 (2005).
- Shimoike T et al. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol*, 1999. 73(12): p. 9718-25.
- Spahn CM et al. (2001). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* 291, 1959–1962.
- Spangberg K, L Wiklund and S Schwartz (2001). Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *J Gen Virol*, 2001. 82(Pt 1): p. 113-20.
- Stavropoulos P, Blobel G, Hoelz A (2006). Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(7), 626–632.
- Steinmann E, Pietschmann T (2010). Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses* 2:2078–2095.
- Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S (2014). DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front. Oncol.* 2014;4:80.
- Sun G, Alzayady K, Stewart R et al (2010). Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* 30(8), 1997–2005.
- Swain, M.G., et al. (2011). A sustained virologic response is durable in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon alfa-2a and ribavirin. *Gastroenterology*. 139(5): p. 1593-601.
- Sypsa V, Touloumi G, Tassopoulos NC, Ketikoglou I, Vafiadis I, Hatzis G, Tsantoulas D, Akriviadis E, Delladetsima J, Demonakou M, et al. (2004). Reconstructing and predicting the hepatitis C virus epidemic in Greece: increasing trends of cirrhosis and hepatocellular carcinoma despite the decline in incidence of HCV infection. *J Viral Hepat.* 2004;11:366–374
- Tai CL, Chi WK, Chen DS, and Hwang LH (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* 70, 8477–8484.
- Takacs CN, Andreo U, Dao Thi VL, Wu X, Gleason CE, Itano MS, Spitz-Becker GS, Belote RL, Hedin BR, Scull MA, Rice CM, Simon SM. (2017). Differential Regulation of Lipoprotein and Hepatitis C Virus Secretion by Rab1b. *Cell Rep.* 2017 Oct 10;21(2):431-441. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.053
- Takeuchi MM, Fuse Y, Watanabe M et al (2015). LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblasts through downregulation of Etv2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*

- Tanaka T, et al. (1995). A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 215(2): p. 744-9.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, and Rice CM (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374–379.
- Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM (2004). The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 48576–48587.
- Thimme R, Binder M & Bartenschlager R (2012). Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 663–683.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 76 (9): 4350–54.
- Tsitoura E, Thomas J, Cuchet D, Thoinet K, Mavromara P, Epstein AL (2009). Infection with herpes simplex type 1-based amplicon vectors results in an IRF3/7-dependent, TLR-independent activation of the innate antiviral response in primary human fibroblasts. *J Gen Virol* 90:2209-2220.
- Tu X, Das K, Han Q, Bauman JD, Clark AD, Hou X, Frenkel YV, Gaffney BL, Jones RA, Boyer PL, Hughes SH, Sarafianos SG, Arnold E (2010). Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17.
- V. G. Allfrey, R. Faulkner, and A. E. Mirsky (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964 May; 51(5): 786–794.
- Van Holde KE, et al (1974). A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic Acids Research* 1, 1579–1586.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al (2001). The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304–1351.
- Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL (1999). Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1999; 29(3): 908-14.
- Voisset C, Dubuisson J (2004). Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell* 96:413–420.
- W. Arber (1965). Host-controlled modification of bacteriophage. *Annu. Rev. Microbiol.* 19, 365–378.
- Walewski JL, et al. (2002). Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *RNA*, 2002. 8(5): p. 557-71.
- Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ (2008). Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *J Cell Biochem*. 2008 Aug 1;104(5):1541-52.
- Wallace DC (2012). Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685-98.

- Wang J, Hevi S, Kurash JK et al (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* 41(1), 125–129.
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation, *Nat. Genet.* 41 125–129.
- Ward PS, Thompson CB (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):297-308.
- Weiss VH, McBride AE, Soriano MA, Filman DJ, Silver PA, Hogle JM (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat Struct Biol.* 2000 Dec;7(12):1165-71.
- Wilkins T et al. (2010). Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 81(11): p. 1351-7.
- Yang M, Culhane JC, Szewczuk LM et al (2007). Structural basis of histone demethylation by LSD1 revealed by suicide inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14(6), 535–539.
- Yang M, Gocke CB, Luo X et al (2006). Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase. *Mol. Cell* 23(3), 377–387.
- Yano M, Kumada H, Kage M, et al. (1996). The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996; 23(6): 1334-40.
- Yi M and SM Lemon (2003). Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA*, 2003. 9(3): p. 331-45.
- Yi M, and SM Lemon (2003). 3' Nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* 77:3557-3568.
- Yoneyama M, Tochio N, Umehara T et al (2007). Structural and functional differences of SWIRM domain subtypes. *J. Mol. Biol.* 369(1), 222–238.
- Yong Chen, Yuting Yang, Feng Wang, Ke Wan, Kenichi Yamane, Yi Zhang, Ming Lei (2006). Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 19; 103(38): 13956–13961
- Young Zoon Kim (2014). Altered Histone Modifications in Gliomas. *Brain Tumor Res Treat.* 2014 Apr; 2(1): 7–21.
- Yu-Jiang Shi, Caitlin Matson, Fei Lan, Shigeki Iwase, Tadashi Baba Yang Shi (2005). Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors. *Molecular Cell*, Vol. 19, 857–864.
- Yu J, Sun L, Liu W, Zhao Y, Kang P, Yan B (2013). International Journal of Infectious Diseases Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1 – AMPK signaling pathway. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(7), e539–e545.
- Yusim K, Richardson R, Tao N, Dalwani A, Agrawal A, Szinger J, Funkhouser R, Korber B, Kuiken C (2005). Los alamos hepatitis C immunology database. *Appl Bioinformatics.* 4:217-225.

Zhao Z, Dong P, Gu J, & Chen L (2013). Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma : a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma, 3, 173–180.

Zhao ZK, Dong P, Gu J, Chen L, Zhuang M, Lu WJ, Wang DR, Liu YB (2012). Overexpression of LSD1 in hepatocellular carcinoma: a latent target for the diagnosis and therapy of hepatoma, Tumour Biol.

Zhou VW, Goren A, Bernstein BE (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. Nat Rev Genet 2011; 12: 7–18.

Zignego, A.L., et al. (2007). Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. Dig Liver Dis, 2007. 39(1): p. 2-17.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Μελέτη του ρόλου του επιγενετικού παράγοντα LSD1 στη λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C».

Γεωργία Παπαδοπούλου

Η ηπατίτιδα C είναι ιογενής νόσος που προσβάλλει κυρίως το ήπαρ και οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C virus, HCV). Υπολογίζεται ότι σήμερα το 3% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού έχει εκτεθεί στον HCV ιό. Μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί πάνω από 300.000 θάνατοι που οφείλονται στον HCV ιό, οι περισσότεροι λόγω κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ). Παράλληλα, οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C ανέρχονται σε πάνω από 170 εκατομύρια και αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη κίρρωσης και ΗΚΚ. Στατιστικά, μετά την αρχική μόλυνση με τον HCV, 75-85% των ασθενών αναπτύσσει χρόνια νόσο. Από τους ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, το 20-30% αναπτύσσουν κίρρωση μετά από 20-25 χρόνια από την αρχική μόλυνση. Τέλος, από τους ασθενείς με κίρρωση που σχετίζεται με τον HCV, το 2-7% αναπτύσσει ΗΚΚ.

Ο HCV ανήκει στο γένος Hepacivirus της οικογένειας Flaviviridae. Το ιικό σωματίδιο αποτελείται από ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας μόριο RNA μήκους 10 Kb περίπου, που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικής σύστασης περίβλημα με εικοσαεδρική (σφαιρική), το καψίδιο. Το γονιδίωμα του HCV κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μήκους 3000 αμινοξέων. Το γονιδίωμα περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) το οποίο μεταφράζεται μέσω μιας εσωτερικής θέσης πρόσδεσης ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) στο 5' άκρο, και περιβάλλεται από τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions, UTRs). Η πολυπρωτεΐνη που προκύπτει στη συνέχεια ωριμάζει μέσω πρωτεολύσεων και παράγονται οι δομικές πρωτεΐνες, δηλαδή οι core, E1 και E2, και οι μη δομικές πρωτεΐνες, δηλαδή οι p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B.

Η πρωτεΐνη LSD1 (Lysine-specific demethylase 1, επίσης KDM1A, AOF2, BHC110, KIA0601), είναι ένα πυρηνικό ένζυμο, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση μεθυλομάδων από ιστονικά και μη ιστονικά κατάλοιπα λυσίνης, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση μορίων που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Υπάρχουν διάφορες έρευνες που δείχνουν ότι η LSD1 διαθέτει ενεργό ρόλο σε πολλές ιικές διεργασίες όπως ιική λοίμωξη, έκφραση ιικών πρωτεϊνών, καθώς και μετάβαση στη λανθάνουσα κατάσταση. Οι ιοί με σκοπό να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιούν εξ ολοκλήρου τον επιγενετικό μηχανισμό των κυττάρων-ξενιστών. Ταυτόχρονα, η LSD1 υπερεκφράζεται σε ιστούς ΗΚΚ και τα επίπεδα έκφρασής της είναι ευθέως ανάλογα με το στάδιο του όγκου. Γνωρίζουμε επίσης πόσο σημαντικό ρόλο παίζει ο λιπιδικός μεταβολισμός στον αναδιπλασιασμό του HCV ιού στα ηπατοκύτταρα και ότι η LSD1

είναι από τους κύριους ρυθμιστές του μεταβολισμού της ενέργειας των κυττάρων. Με βάση όλα τα παραπάνω, στην παρούσα εργασία κατασκευάσαμε κυτταροσειρές Huh7.5 και HepG2 που να υπερεκφράζουν την LSD1, με χρήση πλασμιδιακού φορέα έκφρασης που να φέρει το γονίδιο της LSD1. Στη συνέχεια, μολύναμε με τους γονότυπους HCV-JFH1 και HCV-3a κλώνους Huh7.5 που υπερεκφράζουν την LSD1 με σκοπό να παρατηρήσουμε πώς επιδρά η υπερέκφραση της LSD1 στον αναδιπλασιασμό του ιού, σε σχέση με μολυσμένα κύτταρα Huh7.5. Παράλληλα, μελετήσαμε τη μεταβολή των επιπέδων της LSD1 κατά τη μόλυνση κυττάρων Huh7.5 με τους HCV-JFH1 και HCV-3a γονότυπους.

Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της LSD1, μετά τη λοίμωξη με τους δύο γονότυπους, αυξάνεται στις πρώτες 48 ώρες και μετά επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα. Παρατηρήσαμε επίσης, ότι όταν ο γονότυπος HCV-JFH1 μολύνει κυτταρικό κλώνο που υπερεκφράζει την LSD1, η κορύφωση του ιικού πολλαπλασιασμού ήταν 14 φορές υψηλότερη σε σχέση με τις καλλιέργειες-μάρτυρες, ενώ υπήρχε καθυστέρηση στο ρυθμό του ιικού πολλαπλασιασμού από τις 48 στις 72 ώρες. Αντιθέτως, ο γονότυπος HCV-3a παρουσιάζει αυξημένο αναδιπλασιασμό στον κλώνο Hu1b σε σχέση με τους μάρτυρες, κατά τις 24 πρώτες ώρες της μόλυνσης. Στη συνέχεια όμως, παρατηρείται σημαντική παρεμπόδιση του ρυθμού ιικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος σχεδόν μηδενίζεται στις 48 ώρες και ανακάμπτει σε μικρό βαθμό μέχρι το τέλος της μόλυνσης.

Υπάρχουν στη βιβλιογραφία μελέτες που αναδεικνύουν το ρόλο της LSD1 σε ιικές λοιμώξεις. Σε κάποιες αναφέρεται ως εργαλείο που χρησιμοποιεί ο ιός για να επιβιώσει και σε άλλες αναφέρεται ως εργαλείο άμυνας του οργανισμού. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα που να αποσαφηνίζουν αλληλεπίδραση μεταξύ LSD1 και HCV ιού. Το παραπάνω πείραμα έχει ανοίξει νέους δρόμους για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης του HCV ιού με το κύτταρο-ξενιστή, η οποία μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον πολύτιμο εργαλείο για μια καλύτερη αντιική θεραπεία που να στοχεύει την LSD1 για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C και του ΗΚΚ.

ABSTRACT

“Study of the role of epigenetic factor LSD1 in hepatitis C virus infection”.

Papadopoulou Georgia

Hepatitis C is an infectious disease caused by the hepatitis C virus (HCV) that primarily affects the liver. At the same time, patients with chronic hepatitis C are over 170 million and are a high-risk group for cirrhosis and HCC. Statistically, after initial infection with HCV, 75-85% of patients develop chronic disease. Of patients with chronic hepatitis C, 20-30% develop cirrhosis after 20-25 years of initial infection. Finally, from patients with cirrhosis associated with HCV, 2-7% develop HCC. To date, over 300,000 deaths have been reported, most due to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC).

HCV belongs to the genus Hepacivirus of the Flaviviridae family. The viral particle consists of a 10 kb single-stranded RNA molecule surrounded by an icosahedral protective shell of protein, the capsid. The genome of HCV encodes a 3000 amino acid polyprotein. The genome includes an open reading frame (ORF) which translates through an internal ribosome entry site (IRES) at the 5' end, and is surrounded by the 5' and 3' untranslated regions (UTRs). The resulting polyprotein is then matured by proteolysis and structural proteins, core, E1 and E2, and non-structural proteins, i.e. p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A and NS5B, are produced.

The LSD1 protein (Lysine-specific demethylase 1, also KDM1A, AOF2, BHC110, KIA0601) is a nuclear enzyme that catalyzes the removal of methyl groups from histone and non-histone lysine residues, thereby affecting the expression of molecules that regulate important cell functions. Recent studies indicate that LSD1 plays an active role in many viral processes such as viral replication, viral protein expression, as well as viral latency. Viruses in order to support their proliferation entirely use the epigenetic mechanism of host cells. At the same time, LSD1 is overexpressed in HCC tissues and its expression levels are directly related to the tumor stage. Also, we know how important role lipid metabolism plays in HCV replication in hepatocytes and that LSD1 is one of the main regulators of cellular energy metabolism. Based on the above, in the present work we constructed Huh7.5 and HepG2 cell clones overexpressing LSD1, using a plasmid expression vector carrying the LSD1 coding sequence. We then infected the Huh7.5 overexpressing clones with HCV viruses (JFH1 and HCV-3a strain genotypes) in order to investigate how LSD1 overexpression affects viral replication compared to infected Huh7.5 cells. At the same time, we studied the change in LSD1 levels when infecting Huh7.5 cells with HCV-JFH1 and HCV-3a genotypes.

We noticed that the expression of LSD1, after infection with the two genotypes above, increases in the first 48 hours and then returns to normal levels. We also noticed that when HCV-JFH1 genotype infects a cell clone overexpressing LSD1, the peak of viral proliferation was 14-fold higher than control cultures, while there was a delay in viral replication from 48 to 72 hours. In contrast, the HCV-3a genotype exhibits increased replication in clone Hu1b compared to control culture during the first 24 hours of infection. Subsequently, there is significant inhibition of the viral replication rate, which is almost zero at 48 hours and recurs to a small extent until the end of the infection.

There are studies that highlight the role of LSD1 in viral infections. Some of those are referred to as a tool used by the virus to survive and others are referred to as the host cell's defense tool. So far, there is not enough data to elucidate the interaction between LSD1 and HCV virus. The present study has opened new ways to better understand the interaction of the HCV virus with the host cell, which may in future be a valuable tool for a better antiviral therapy targeting LSD1 to treat hepatitis C and HCC.