



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΚΑΘΟΡΙΖΟΥΝ ΤΗ
ΣΧΕΣΗ ΠΚΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ, ΙΣΤΙΚΗΣ ΝΟΡΜΟΕΙΑΣ ΚΑΙ L-
DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΓΙΑ ΗΠΑΤΟΤΡΟΠΟΥΣ ΙΟΥΣ**

ΜΑΡΙΑ ΜΩΡΑΪΤΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

**Μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη σχέση ιικής
μόλυνσης, ιστικής νορμοξίας και L-Dopa αποκαρβοξυλάσης για
ηπατοτρόπους ιούς**

ΜΑΡΙΑ ΜΩΡΑΪΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Βασιλακοπούλου Διδώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Βασιλάκη Νίκη, Ερευνήτρια Γ', Εργαστήριο
Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Βασιλακοπούλου Διδώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ
- Βασιλάκη Νίκη, Ερευνήτρια Γ', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
- Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που στάθηκαν αρωγοί για την ολοκλήρωσή της.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω την επιστημονική μου υπεύθυνη στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (ΕΙΠ) Δρ. Νίκη Βασιλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο τον καιρό που πέρασα στο εργαστήριο και για όλες τις χρήσιμες συμβουλές που μου έδωσε επί του θέματος της διπλωματικής εργασίας και μη.

Ευχαριστώ θερμά την Δρ. Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών που μου εμπιστεύθηκε να αναλάβω το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση και το ενδιαφέρον της.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην διδακτορική φοιτήτρια Ευσεβεία Φρακολάκη για την πολύτιμη βοήθειά της στην πειραματική διαδικασία όσο και για τον χρόνο που αφιέρωσε ώστε να αναπτύξω τις δεξιότητές μου σε επίπεδο εργαστηριακό, ερευνητικό και γνωστικό.

Επιπλέον, δεν μπορώ να μην αναφερθώ στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου - παλιά και νέα- για την άψογη συνεργασία. Ιδιαίτερα τους Νίκο Κολαίτη και Χρήστο Καρακώστα με τους οποίους μοιραστήκαμε το ίδιο εργαστήριο για περισσότερο από ένα χρόνο, τους Παναγιώτα Κάιμου, Γιώργο Νιώτη και Μάριο Δημητρίου πρώην μέλη του εργαστηρίου για την βοήθειά τους, αλλά και τα νέα μέλη Άννα Χάλαρη και Βασίλη Σιώζο στους οποίους εύχομαι τα καλύτερα.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου Παναγιώτη και Σοφία και τον αδερφό μου Αντώνη για την υποστήριξή και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Abstract	9
Περίληψη	10
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV).....	11
1.1. Γενικά στοιχεία.....	11
1.1.1. Ιστορικά στοιχεία	12
1.1.2. Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης.....	12
1.1.3. Πρόληψη - Διάγνωση	13
1.2. Δ.....	14
1.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου.....	14
1.2.2. Γονιδίωμα.....	15
1.2.3. Ιικές πρωτεΐνες.....	16
1.2.4. Γονότυποι	19
1.3. Κύκλος ζωής.....	20
1.4. Συστήματα μελέτης του HCV.....	22
1.5. Θεραπείες για τον HCV.....	24
2. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ B (HBV).....	25
2.1. Γενικά στοιχεία.....	25
2.1.1. Ιστορικά στοιχεία	25
2.1.2. Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης.....	26
2.2. Δομή του HBV.....	27
2.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου.....	27
2.2.2. Γονιδίωμα.....	29
2.2.3. Ιικές πρωτεΐνες.....	30
2.2.4. Γονότυποι	32

2.3.	Κύκλος ζωής.....	32
2.4.	Συστήματα μελέτης του HBV.....	35
2.5.	Πρόληψη-θεραπείες για τον HBV	36
2.5.1.	Εμβολιασμός	36
2.5.2.	Εγκεκριμένες αντι-HBV θεραπείες	36
2.5.3.	Αναπτυσσόμενες θεραπείες έναντι του HBV.....	37
3.	ΤΟ ENZYMO DDC (L-Dopa Decarboxylase).....	38
3.1.	Γενικά Στοιχεία	38
3.2.	Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά.....	40
3.2.1.	Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ	40
3.2.2.	Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης σε περιφερικούς ιστούς.....	41
3.3.	Χαρακτηριστικά του ενζύμου	41
3.3.1.	Προσδιορισμός της μοριακής μάζας του ενζύμου.....	41
3.3.2.	Υποστρωματική εξειδίκευση του ενζύμου.....	43
3.3.3.	Χημικές ουσίες που επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου	45
3.4.	Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης	46
3.4.1.	Δομή του γονιδίου – μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση.....	46
3.5.	Συσχέτιση της μεταβολικής και σηματοδοτικής οδού της Ντοπαμίνης με τον ιό HCV. 49	
3.6.	Συσχέτιση της DDC με παράγοντες της υποξίας	50
3.7.	Το μονοπάτι PI3K-AKT και η εμπλοκή του στη μόλυνση με ιούς.....	51
4.	ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K-AKT	51
4.1.	Γενικά στοιχεία.....	51
4.2.	Το PI3K/AKT στην αντιϊκή απόκριση	54
4.3.	Το μονοπάτι PI3K/AKT και ο ιός HCV	54
5.	Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΝΟΡΜΟΞΙΑΣ.....	58
5.1.	Γενικά στοιχεία.....	58
5.2.	Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιϊκό πολλαπλασιασμό και την υποξία.....	59
5.3.	Η επίδραση της υποξίας στον ιϊκό κυτταρικό κύκλο	64

5.3.1.	Θετική ρύθμιση των ιών σε μηχανισμό ανεξάρτητο του HIF	64
5.3.2.	Επαγόμενη από τον ιό κυτταρική υποξική απόκριση και επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού	65
II.	ΣΤΟΧΟΙ.....	67
III.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	70
1.	ΥΛΙΚΑ.....	70
1.1.	Κυτταρικές σειρές.....	70
1.2.	Ιικές αλληλουχίες	71
1.3.	Εκκινητές	71
1.4.	Αντισώματα	73
1.5.	Χημικές ουσίες	73
1.6.	Διαλύματα	73
2.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	74
2.1.	Καθαρισμός DNA από περιοριστικά ένζυμα με φαινόλη – χλωροφόρμιο	74
2.2.	Μεταγραφή <i>in vitro</i>	76
2.3.	Καθαρισμός RNA από τα ένζυμα της <i>in vitro</i> μεταγραφής.....	77
2.4.	Διαίρεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)	78
2.5.	Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων για μελλοντική χρήση.....	79
2.6.	Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων	80
2.7.	Επώαση σταθερών υπογονιδιωματικών κυτταρικών σειρών με αναστολείς σε μολυσμένα ή μη κύτταρα.....	80
2.8.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	81
2.9.	Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC)	82
2.10.	Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP 83	
2.11.	Συλλογή και λύση κυττάρων Huh7/HepG2-NTCP με χρήση διαλύματος Trizol 84	
2.12.	Απομόνωση RNA από δείγματα που λύθηκαν με χρήση διαλύματος Trizol..	84
2.13.	Αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	85
2.14.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)	86

2.15.	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	88
2.16.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page	89
2.17.	Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη.....	91
2.18.	Ανοσοσύπωση τύπου Western.....	92
2.19.	Υποκυτταρική κλασματοποίηση.....	93
2.20.	Εισαγωγή νουκλεϊκού οξέος σε κύτταρα θηλαστικών με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)	95
2.21.	Παραγωγή ιού από το stock, τιτλοποίηση και μόλυνση.....	96
2.21.1.	Παραγωγή του ιού HCV.....	96
2.21.2.	Τιτλοποίηση HCV JC1.....	97
2.21.3.	Μόλυνση των κυττάρων με HCV	97
2.21.4.	Παραγωγή του ιού HBV.....	97
2.21.5.	Τιτλοποίηση του ιού HBV	98
2.21.6.	Μόλυνση των κυττάρων με HBV	99
2.21.7.	Απομόνωση ιικού DNA από πυρηνικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα λύσης 100	
2.21.7.1.	Απομόνωση ιικού DNA από πυρηνικό κλάσμα.....	100
2.21.7.2.	Απομόνωση ιικού DNA από κυτταροπλασματικό κλάσμα	100
2.22.	Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	101
2.23.	Στατιστική ανάλυση.....	103
IV.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	104
1.	ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV. 104	
1.1.	Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα mRNA της DDC	104
1.2.	Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα πρωτεΐνης της DDC.....	105
1.3.	Διερεύνηση του σταδίου του κύκλου ζωής του HCV που ενισχύει την θετική ρύθμιση της DDC.....	107
2.	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HCV ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ DDC ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ	108
2.1.	Επίδραση του HCV στην υποκυτταρική κατανομή των διάφορων ισομορφών της DDC πρωτεΐνης.....	109

2.2. Πρωτεϊνική κατανομή της DDC πρωτεΐνης σχετικά με τις θέσεις αντιγραφής του HCV	111
3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ DDC ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΟΥ HCV	113
3.1. Επίδραση της καρβιντόπας, αναστολέα της DDC, στην αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του HCV	113
3.2. Επίδραση της καρβιντόπας, στην σχέση της DDC με τον HCV	115
4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΡΙ3Κ ΣΤΗΝ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC	117
4.1. Επίδραση του ΡΙ3Κ, στην σχέση της DDC με τον HCV	117
4.2. Επίδραση της αναστολής του ΡΙ3Κ, στην αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του HCV	118
5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΚΤ ΣΤΗΝ ΣΧΕΣΗ ΙΟΥ-ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC	120
6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗΙΦ ΣΤΗΝ ΣΧΕΣΗ ΙΟΥ-ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC	122
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΗΒV ΣΤΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΗΣ DDC	123
8. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΗΒV	125
8.1. Επίδραση των αντικών ανάλογων στα επίπεδα του rcDNA του ΗΒV	125
8.2. Κανονικοποίηση δραστικών αντι-ΗΒV ουσιών	129
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	131
Βιβλιογραφία	138

Abstract

L-Dopa decarboxylase (DDC), the enzyme that catalyzes dopamine biosynthesis, is expressed in the nervous system and 27 more peripheral tissues, including the liver, where its physiological role remains unknown. Recently, this enzyme was related to the signaling PI3K protein. In this study, we show the involvement of DDC in viral infections and more specific with Hepatitis C (HCV) virus. In liver cells we observed negative association between DDC and HCV infection. Specifically, it seems that viral infection reduces DDC mRNA levels and the levels of 120 kDa SDS-resistant immunoreactive DDC complex and increase the intracellular levels of the ~50 kDa DDC monomer. This effect appears to be dependent on the PI3K/AKT pathway. In addition, viral infection doesn't affect the DDC neuronal/non neuronal types or the distribution of the protein in the cell, while it seems that there is no co-localization of DDC and the viral replicase site. Finally, chemical inhibition of DDC increases viral replication and infectivity.

Hepatitis B virus (HBV) infection is the most common cause of chronic liver disease worldwide, despite the availability of safe and effective vaccines. The best way to reduce morbidity and mortality from cirrhosis and hepatocellular carcinoma is with proper antiviral treatment. Currently, two major classes of agents are utilized in chronic hepatitis B: the interferons and the nucleotide analogues. However, the side effects of interferons and the high emergence of HBV drug-resistant strains arising from nucleoside analogues, indicates the clinical need for the discovery of novel classes of antiviral agents for the treatment of hepatitis B. The development of a series of non-nucleoside bezimidazoles is a promising therapeutic strategy. In an effort to contribute to the structure-activity relationship studies we did screening to a number of novel analogues bearing the more purine-like imidazo[4,5-b]pyridine scaffold and investigated their biological activity as potential HBV inhibitors. Some of them showed considerable antiviral effect with low cytotoxicity.

Περίληψη

Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC), η οποία καταλύει τη βιοσύνθεση της κατεχολαμίνης ντοπαμίνης, εκφράζεται στο νευρικό σύστημα και σε 27 ακόμα περιφερικούς ιστούς, όπως το ήπαρ, όπου ο ρόλος της παραμένει άγνωστος. Πρόσφατα, το ένζυμο συσχετίστηκε με το σηματοδοτικό μόριο της PI3K. Στην συγκεκριμένη εργασία επιβεβαιώνεται η συμμετοχή της DDC σε ικές μολύνσεις και συγκεκριμένα σε μολύνσεις με τον ιό της ηπατίτιδας C. Σε ηπατικά κύτταρα παρατηρήθηκε αρνητική σχέση μεταξύ της DDC και της ικής αντιγραφής. Ειδικότερα, η ική αντιγραφή φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα του mRNA και τα επίπεδα του 120 kDa πρωτεϊνικού συμπλόκου της DDC, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει το 50 kDa πρωτεϊνικό μονομερές της DDC. Η συσσώρευση του 50 kDa DDC μονομερούς είναι PI3K-εξαρτώμενο. Επιπλέον, η ική μόλυνση δεν αλλάζει το είδος των μεταγράφων DDC που κωδικοποιούνται, ούτε την υποκυτταρική τοπολογία της DDC, ενώ δεν παρατηρείται συνεντοπισμός του ενζύμου με τις θέσεις αντιγραφής του HCV. Η χημική αναστολή της DDC αυξάνει την αντιγραφή και την μολυσματικότητα του HCV.

Η μόλυνση με ιό της ηπατίτιδας B (HBV) είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου, παρά την ύπαρξη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων. Ο καταλληλότερος τρόπος αντιμετώπισης για τη μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας από κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο, είναι η ανάπτυξη αντιικής θεραπείας. Αυτή τη στιγμή δύο κατηγορίες αντιικών παραγόντων χρησιμοποιούνται έναντι της λοίμωξης με HBV: ιντερφερόνες και νουκλεοζιτικοί/νουκλεοτιδικοί αναστολείς του πολλαπλασιασμού του ιού. Ωστόσο, οι ανεπιθύμητες ενέργειες των ιντερφερονών, αλλά και η συνήθης εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού HBV κατά τη χρήση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, αυξάνουν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων αντιικών ουσιών για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας B. Η ανάπτυξη μη-νουκλεοζιτικών βενζιμιδαζολικών αναλόγων παρέχει μία πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική. Στην προσπάθεια επέκτασης των σχέσεων δομής-δράσης αυτών των μορίων, αξιολογήσαμε τη βιολογική δράση νέων αναλόγων που φέρουν ιμιδαζο[4,5-b]πυριδινικό δακτύλιο, ως πιθανών αναστολέων έναντι του HBV. Κάποια από τα ανάλογα παρουσίασαν αξιόλογη αντιική δράση με χαμηλή κυτταροτοξικότητα.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), η ηπατίτιδα αποτελεί φλεγμονή του ήπατος, η οποία βαθμιαία μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση των ηπατικών κυττάρων. Οφείλεται, κυρίως, σε μόλυνση από κάποιον ηπατοτρόπο ιό, ωστόσο προκαλείται και από έκθεση του οργανισμού σε τοξικούς παράγοντες/φάρμακα ή σε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (1). Έχει, επίσης, παρατηρηθεί ηπατίτιδα αυτοάνοσης προέλευσης, όταν αντισώματα του ίδιου του οργανισμού αναγνωρίζουν επιτόπους των ηπατικών κυττάρων και προκαλούν αλλοιώσεις και τελικά καταστροφή του ιστού (2).

Η ιογενής ηπατίτιδα αποτελεί την πιο συχνή αιτιολογία της νόσου. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε υπεύθυνοι ιοί, οι ιοί της ηπατίτιδας Α-Ε, με διαφορές ως προς τον τρόπο μετάδοσης αλλά και ως προς την κλινική εικόνα που προκαλούν (3). Συγκεκριμένα, οι Α και Ε μεταδίδονται μέσω της πεπτικής οδού, οι Β και C με σεξουαλική επαφή ή από μολυσμένο αίμα, ενώ αναγκαία είναι η συλλοίμωξη με Β, για την είσοδό και τον πολλαπλασιασμό του HDV στα ηπατικά κύτταρα (4). Μόνο οι ιοί της ηπατίτιδας Β, C και D μπορούν να προκαλέσουν χρόνια νόσο και απαιτούν φαρμακευτική αγωγή, ενώ οι Α και Ε οδηγούν σε οξείες λοιμώξεις, που αντιμετωπίζονται με συμπτωματική θεραπεία (5).

1. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV)

1.1. Γενικά στοιχεία

Ο ιός της Ηπατίτιδας C (HCV) ανήκει στο γένος *Hepacivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Το γένος *Hepacivirus* αποτελείται από έξι είδη, μεταξύ των οποίων ο HCV και οι ηπατοϊοί των μη πρωτεύοντων (σκύλων, τρωκτικών, ιπποειδών). Μέχρι πρότινος, ο HCV και ο GBV ήταν οι μόνοι γνωστοί ιοί που ανήκαν στο γένος *Hepacivirus*. Μελέτες για συναφείς ιούς σε πρωτεύοντα θηλαστικά κατέληξαν άκαρπες, αφήνοντας την καταγωγή και την εξέλιξη του HCV άγνωστη. Προσφάτως, η ανάπτυξη των μεθόδων βαθιάς αλληλούχισης επιτάχυνε την ανακάλυψη συναφών ιών (6).

1.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ηπατίτιδα C αποτελεί λοίμωξη, που προσβάλλει κατά κύριο λόγο το ήπαρ και προκαλείται από μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C virus, HCV). Ο χαρακτηρισμός του HCV έγινε το 1975, όπου περιγράφηκε σαν μεταδιδόμενος παράγοντας που οδηγεί σε ασθένεια του ήπατος και πήρε το όνομα ιός της ηπατίτιδας μη-A μη-B. Παρά την εξέλιξη αυτή, οι ερευνητικές προσπάθειες που διεξήχθησαν διεθνώς για την ταυτοποίηση του ιού, τα επόμενα δέκα χρόνια, απέτυχαν. Το 1987 χρησιμοποιήθηκε μια νέα προσέγγιση μοριακής κλωνοποίησης για να εντοπιστεί ο άγνωστος μικροοργανισμός και να αναπτυχθεί διαγνωστικός έλεγχος. Το 1988 επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του ιού και μόλις το 1989 κατορθώθηκε η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του γονιδιώματός του (7-11).

1.1.2. Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης

Ασθενείς με ηπατίτιδα C εμφανίζουν, στο 20% των περιπτώσεων, ήπια και ασαφή συμπτώματα, όπως αυτό της μειωμένης όρεξης, της ναυτίας, της κούρασης, των πόνων στους μύες ή τις αρθρώσεις αλλά και της απώλειας βάρους, ενώ σε ελάχιστες περιπτώσεις η οξεία λοίμωξη συνδέεται με ίκτερο. Το χρονικό διάστημα μεταξύ της έκθεσης στον HCV και της εκδήλωσης συμπτωμάτων της οξείας λοίμωξης υπολογίζεται στις 7 εβδομάδες. Η λοίμωξη υποχωρεί με ή χωρίς θεραπεία στο 25% περίπου των περιπτώσεων, πιο συχνά στις νέες γυναίκες, ενώ στο 75% περίπου των ασθενών η λοίμωξη μεταπίπτει σε χρόνια. Το στάδιο της χρόνιας λοίμωξης είναι μη συμπτωματικό για μεγάλο χρονικό διάστημα και είναι η βασική αιτία της κίρρωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (HCC). Η κίρρωση του ήπατος είναι δυνατόν να προκαλέσει υψηλή αρτηριακή πίεση στις φλέβες που βρίσκονται σε σύνδεση με το ήπαρ, συσώρευση υγρού στην κοιλιακή χώρα, εύκολο μωλωπισμό ή αιμορραγία, διευρυμένες φλέβες ιδιαίτερα στο στομάχι και τον οισοφάγο, ίκτερο (κιτρίνισμα του δέρματος), αλλά και εγκεφαλική βλάβη (12-15). Η λοίμωξη από HCV έχει συνδεθεί, επίσης, με αυτοάνοσα νοσήματα, αιματολογικές διαταραχές (π.χ. χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων), χρόνιες παθήσεις του δέρματος ή διαταραχές του θυρεοειδή αδένος, σακχαρώδη διαβήτη και λεμφοϋπερπλασία (π.χ. μη-Hodgkin λεμφώματα) (16, 17).

Ο ιός HCV προσβάλλει μόνο ανθρώπους (*Homo sapiens*) και χιμπατζήδες (*Pan troglodytes*). Ο κύριος τρόπος μετάδοσης στον ανεπτυγμένο κόσμο είναι η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών. Σημαντικό κίνδυνο για μόλυνση (10%), κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο, παρουσιάζουν οι μεταγγίσεις αίματος οι μεταμοσχεύσεις οργάνων χωρίς έλεγχο για τον ιό, αλλά και η έκθεση του ιατρικού προσωπικού σε μολυσμένο υλικό (4%) (18). Η δερματοστιξία και τα τρυπήματα στο σώμα συνδέονται με δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο έκθεσης σε ηπατίτιδα C (μη αποστειρωμένος εξοπλισμός). Τα στοιχεία αναφέρουν πως είναι μηδαμινός ο κίνδυνος για μετάδοση του ιού με σεξουαλική επαφή για ετερόφυλα ζευγάρια, που δεν έχουν άλλους σεξουαλικούς συντρόφους (19). Η κάθετη μετάδοση της ηπατίτιδας C, από τη μητέρα - φορέα της ασθένειας στο παιδί της, συμβαίνει περίπου στο 5% των εγκυμοσυνών κατά τη διάρκεια της κυοφορίας ή του τοκετού. Και στις δύο περιπτώσεις, συχνά πρόκειται με συμόλυνση με τον HIV (20-24). Ο ιός HCV δεν μεταδίδεται μέσω της συνήθους επαφής, όπως η αγκαλιά, τα φιλιά, η ανταλλαγή σκευών τροφίμων ή μαγειρέματος.

1.1.3. Πρόληψη - Διάγνωση

Ακόμα και σήμερα, δεν υπάρχει εγκεκριμένο διαθέσιμο εμβόλιο για την ηπατίτιδα C. Η δημιουργία εμβολίων βρίσκεται ακόμα υπό ανάπτυξη, ενώ κάποια εμβόλια δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (25). Μια σειρά προληπτικών μέτρων, όπως τα προγράμματα ανταλλαγής βελόνων και συρίγγων, καθώς και οι θεραπείες ανεξάρτησης, ελαττώνουν τον κίνδυνο ηπατίτιδας C μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ουσιών κατά περίπου 75%. Οι αιμοδότες οφείλουν να εξετάζονται, ενώ σε χώρες με ανεπαρκή παροχή αποστειρωμένων συρίγγων, οι υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης θα πρέπει να προτιμούν τη λήψη φαρμάκων δια της γαστρεντερικής οδού, αντί για ενέσιμα (24, 26). Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C θα πρέπει να εμβολιάζονται για την ηπατίτιδα A και την ηπατίτιδα B, αλλά και να αποφεύγουν το αλκοόλ και τα φάρμακα που επιβαρύνουν το συκώτι.

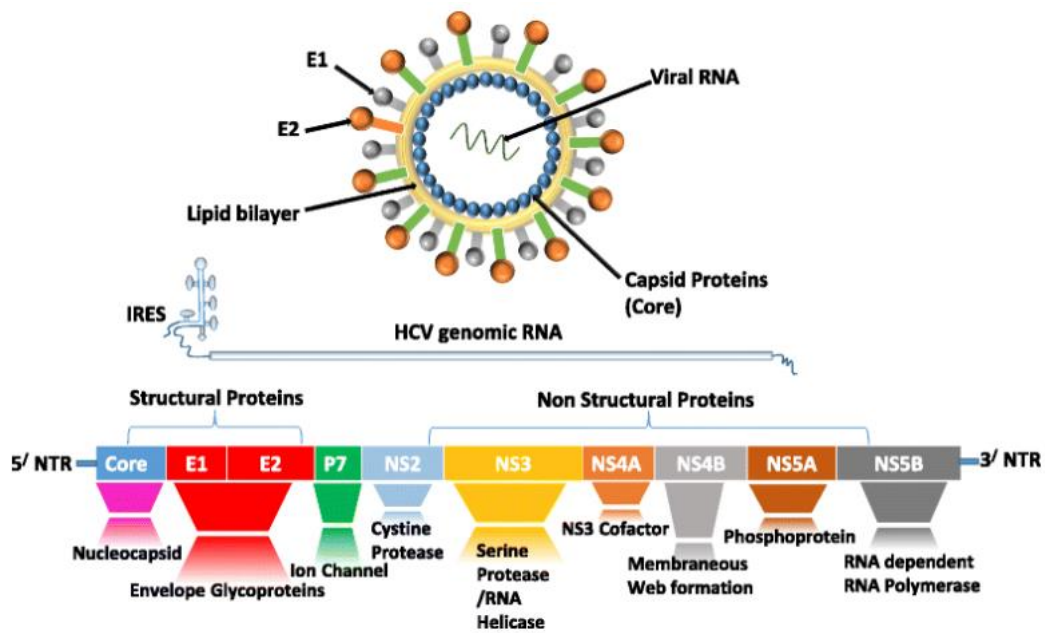
Η διάγνωση της ασθένειας μπορεί να γίνει, από δείγμα αίματος, με δύο τρόπους: με ανίχνευση είτε αντί-HCV αντισωμάτων 4-10 εβδομάδες μετά την μόλυνση ή με ανίχνευση αντιγράφων του γενετικού υλικού του ιού 1-2 εβδομάδες μετά την μόλυνση.

Μετά από την αρχική εμφάνιση των αντί-HCV αντισωμάτων, οι φορείς παραμένουν οροθετικοί, πέραν ορισμένων περιπτώσεων που ο ιός εξαλείφεται αυτόματα. Τα αντισώματα ανιχνεύονται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA ή με την ανοσοαποτύπωση τύπου Western, για τις οποίες υπάρχουν ειδικά διαγνωστικά τεστ. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του ιικού RNA γίνεται με μεθόδους που χρησιμοποιούν την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν λιγότερα από 1.000 αντίγραφα ιικού RNA ανά ml δείγματος (27, 28). Ένας σημαντικός και παράλληλα απλός τρόπος διάγνωσης της ηπατίτιδας είναι η αλλαγή στα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων του ορού (π.χ. αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, ALT). Τα ηπατικά ένζυμα μεταβάλλονται κατά το πρώτο διάστημα της λοίμωξης, ενώ αρχίζουν να αυξάνουν σχεδόν 7 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη. Ωστόσο, η εξέταση αυτή δεν μπορεί να διακρίνει την οξεία και χρόνια λοίμωξη (24, 29). Επίσης, οι βιοψίες του ήπατος μπορούν να προσδιορίσουν το μέγεθος της βλάβης του ήπατος και να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου, πριν τη θεραπεία ή μετά την αποτυχία μιας αντί-ιικής θεραπείας (27, 28).

1.2. Δομή του HCV

1.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου

Σύμφωνα με φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, ο ιός έχει σχήμα σφαιρικών σωματιδίων, μέγεθος διαμέτρου 50 nm κι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μολυσμένων ηπατικών κυττάρων (30). Το ιικό σωματίδιο αποτελείται από ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο μόριο RNA [(+) ssRNA] το οποίο περιβάλλεται από ένα περίβλημα πρωτεϊνικής σύστασης με εικοσαεδρική (σφαιρική) δομή, το καψίδιο. Οι αλληλεπιδράσεις του νουκλεϊκού οξέος με τις πρωτεΐνες του καψιδίου δημιουργούν το νουκλεοκαψίδιο. Το νουκλεοκαψίδιο εγκλείεται περαιτέρω σε ένα λιποπρωτεϊνικής φύσης περίβλημα, το έλυτρο. Πρόκειται για μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία ενσωματώνονται οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου του ιού, ενώ υπάρχουν αποδείξεις ότι έχει κυτταρική προέλευση και υποστηρίζεται ότι προέρχεται από εσωτερική μεμβράνη του ξενιστή (31). Στο ιικό σωματίδιο είναι συνδεδεμένες και απολιποπρωτεΐνες, όπως η ApoE (32).



Εικόνα 1: Δομή του νουκλεοκαψιδίου και του γονιδιώματος του HCV (33).

1.2.2. Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του HCV περιλαμβάνει ένα (+)ssRNA μεγέθους 9,6 Kb, το οποίο κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη περίπου 3.000 αμινοξέων. Στα άκρα του RNA υπάρχουν οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (untranslated regions - UTRs), ενώ μεταξύ των UTRs βρίσκεται η κωδική περιοχή, ένα μεγάλο μεγέθους ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη. Το πρώτο προϊόν της μετάφρασης ωριμάζει συν- και μετα-μεταφραστικά με τη βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών και δίνει τις δομικές (core, E1, E2) και τις μη δομικές (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) πρωτεΐνες του ιού, που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό ώριμων σωματιδίων του ή την αντιγραφή του εντός του κυττάρου – ξενιστή (34-38).

Στο αμινοτελικό άκρο, η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR) αποτελείται από 341 νουκλεοτίδια και είναι η μία από τις δύο πιο συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος του HCV, με σχεδόν 90% ομολογία ανάμεσα στους διαφορετικούς γονότυπους. Η 5' UTR περιοχή διαθέτει έντονη δευτεροταγή δομή και αποτελεί το τμήμα έναρξης της μετάφρασης του ιικού γονιδιώματος, που όμως δεν πραγματοποιείται με τη βοήθεια της δομής καπέλου (στο 5' άκρο δεν υπάρχει καπέλο)

κι έτσι το ριβόσωμα δεν προσδένεται στο 5' άκρο. Ο ιός φέρει περιοχή εσωτερικής πρόσδεσης ριβοσωμάτων (IRES), η οποία καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα της 5' UTR, αλλά και τις 44 πρώτες βάσεις της κωδικής περιοχής που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη core. Κύριο ρόλο στη μετάφραση του HCV μέσω IRES παίζει η RNA δευτεροταγής δομή της core αλληλουχίας (39). Επιπλέον, η 5' UTR είναι υπεύθυνη και για άλλες σημαντικές λειτουργίες στον κύκλο του ιού, όπως για τη ρύθμιση της αντιγραφής, αφού η συμπληρωματική της αλληλουχία αποτελεί την περιοχή έναρξης της αντιγραφής για παραγωγή ιικού RNA από το ενδιάμεσο μόριο αρνητικής πολικότητας, αλλά και για τη συγκρότηση ιικών σωματιδίων, μιας και αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη του καψιδίου του ιού (31, 40, 41).

Στο καρβοξυτελικό άκρο, η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) περιλαμβάνει 3 διακριτές περιοχές. Αρχικά, υπάρχει μια περιοχή χαμηλής συντηρητικότητας 40 περίπου βάσεων, που έχει σταθερή δομή στελέχους θηλιάς και είναι σημαντική για τη λήξη της μετάφρασης. Αμέσως μετά βρίσκεται μια polyU/C αλληλουχία πλούσια σε πυριμιδίνες κι έπειτα η 3' UTR καταλήγει με μια συντηρητική ουρά μήκους 98 νουκλεοτιδίων (98X). Η 98X ουρά διαφαίνεται σημαντική στην έναρξη της αντιγραφής, αφού αποτελεί τη θέση εισόδου για την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση κατά την αντιγραφή της θετικής αλυσίδας του RNA του ιού. Επιπρόσθετα, υπάρχει αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη core και συμμετοχή της στην ρύθμιση της μετάφρασης του HCV, μιας και η παρουσία της ανεβάζει 3 έως 5 φορές τα επίπεδα μετάφρασης (42-46).

1.2.3. Ιικές πρωτεΐνες

Core: Είναι η πιο βασική και συντηρητική πρωτεΐνη του HCV. Συνδέεται στο RNA του ιού και είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση του ιικού καψιδίου. Η απελευθέρωση της ώριμης core από την ιική πολυπρωτεΐνη γίνεται μέσω της δράσης δύο πεπτιδασών του κυττάρου στο 3' και στο 5' άκρο της. Πρόκειται για μια διμερή μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία σταθεροποιείται με το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού στο αμινοξύ Cys 128 και αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές (47, 48). Η αμινοτελική υδρόφιλη περιοχή D1 θεωρείται υπεύθυνη τόσο για τη σύνδεση της με το RNA όσο και για τον ομοδιμερισμό, προωθώντας την συγκρότηση του

νουκλεοκασιδίου. Επίσης, εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με πολυάριθμους κυτταρικούς παράγοντες (49). Η D2 περιοχή περιλαμβάνει μια κεντρική υδρόφοβη θηλιά που συνδέει δύο αμφιπαθείς α-έλικες και αλληλοεπιδρά με τα φωσφολιπίδια των λιπιδικών σταγονιδίων (50). Η περιοχή D3, που αποτελείται από τα τελευταία 20 αμινοξέα χρησιμεύει ως πεπτίδιο σηματοδότησης της πρωτεΐνης E1 στη μεμβράνη του ER (48).

E1, E2: Πρόκειται για διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν στον φάκελο του HCV, με μήκος 192 και 363 αμινοξέα αντίστοιχα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Τα υδρόφοβα καρβοξυτελικά άκρα τους αγκυροβολούν στο εσωτερικό του ιικού φακέλου, ενώ τα αμινοτελικά άκρα τους προεξέχουν. Οι E1 και E2 είναι γλυκοζυλιωμένες σε μεγάλο βαθμό και δημιουργούν μη ομοιοπολικό ετεροδιμερές, που λειτουργεί σαν υποδοχέας που διευκολύνει την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, την σύντηξη ιικών και κυτταρικών μεμβρανών και την κλαθρίνη-εξαρτώμενη ενδοκύττωση του ιού (51-53).

p7: Μέλος της οικογένειας των ιικών πορινών, αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές α-έλικες που βρίσκονται σε σύνδεση με μια θετικά φορτισμένη κυτταροπλασματική θηλιά, την ώρα που το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκονται προσανατολισμένα προς τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (54). Δημιουργεί εξαμερή ή επταμερή με την ιδιότητα του καναλιού κατιόντων και βοηθά την παραγωγή του ιού (55-57). Η παρουσία της πρωτεΐνης p7 απαιτείται τόσο για τη συναρμολόγηση και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων *in vitro*, όσο και για παραγωγική μόλυνση *in vivo* (58).

NS2: Κωδικοποιείται ως πρωτεάση κυστεΐνης, η οποία διαχωρίζει την πρόδρομη πολυπρωτεΐνη στην περιοχή σύνδεσης των NS2/NS3 και της οποίας η λειτουργία ενισχύεται από το 1/3 του αμινοτελικού άκρου της NS3 (59). Η ίδια η πρωτεάση NS2 δεν χρειάζεται για την αντιγραφή του RNA, ωστόσο η διάσπαση στην περιοχή σύνδεσης των NS2/NS3 είναι αναγκαία για απελευθέρωση της πλήρους λειτουργικής πρωτεΐνης NS3 και, συνεπώς, για προώθηση της ιικής αντιγραφής. Πέρα από την καταλυτική της δράση, η NS2 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη συγκρότηση του ιού, μέσω της αλληλεπίδρασής της με άλλες ιικές πρωτεΐνες (60).

NS3: Είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 67 kDa με πολλές ενζυμικές λειτουργίες. Το αμινοτελικό άκρο της έχει δραστικότητα πρωτεάσης σερίνης, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο έχει δραστικότητα NTPάσης/ελικάσης (61). Παρόλο που η NS3 έχει και από μόνη της ενζυμική δράση, με τη δέσμευση του συμπαραγόντα NS4A αποκτά αποτελεσματική πρωτεολυτική δραστικότητα (62). Τα τελευταία 185 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της βοηθούν στον διαχωρισμό των NS3-4A, 4A-4B, 4B-5A και 5A-5B. Η περιοχή της που έχει δραστικότητα NTPάσης/ελικάσης είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA, καθώς ξετυλίγει το δίκλωνο RNA που σχηματίζεται κατά την αντιγραφή (63, 64).

NS4A: Πρωτεϊνικό μόριο 54 αμινοξέων, που δρα σαν συμπαραγόντας για την NS3. Επίσης, η πρωτεΐνη NS4A είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση της NS5A και μπορεί να αλληλεπιδρά με αυτήν άμεσα (NS4A-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της NS5A (65)).

NS4B: Πρόκειται για μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη μεγέθους 27 kDa, πλήρως μεμβρανική με 4 διαμεμβρανικές περιοχές (66). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υπέδειξαν πως η NS4B προκαλεί τη δημιουργία ενός μεμβρανώδους δικτύου, αποτελούμενο από τοπικά περιορισμένα μεμβρανικά κυστίδια που χρησιμεύει σαν ικρίωμα στο σύμπλεγμα αντιγραφής του HCV (67, 68). Η NS4B αλληλοεπιδρά με την NS4A και συνεπώς έμμεσα με τις NS3 και NS5A, ενώ υπάρχουν αναφορές ότι δεσμεύει το RNA του ιού (69, 70). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη NS4B φαίνεται να έχει και ιδιότητα NTPάσης, καθώς επίσης και πως συμμετέχει στην ική συγκρότηση (71-73).

NS5A: Είναι μία υδρόφιλη φωσφοπρωτεΐνη, που παίζει καίριο ρόλο στην αντιγραφή του HCV, στη ρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης καθώς και στην ανταπόκριση σε ιντερφερόνη (74, 75). Οργανώνεται σε τρεις διακριτές περιοχές, τις D1, D2 και D3, με τις D1 και D2 να είναι απαραίτητες για την ική αντιγραφή και την D3 βασική για την συγκρότηση του ικού σωματιδίου. Μέσω μίας αμφίφιλης α-έλικας στο αμινοτελικό της άκρο, η NS5A προσδένεται στη μεμβράνη. Η D1 σχηματίζει διμερές, το οποίο δημιουργεί μια αύλακα μέσα από την οποία περνά το RNA. Τέλος, η

δομή της NS5A σταθεροποιείται από ένα δισθενές κατιόν ψευδαργύρου (Zn^{2+}) (60, 76).

NS5B: Η αντιγραφή του HCV στηρίζεται στην παραγωγή μιας συμπληρωματικής RNA αλυσίδας αρνητικής πολικότητας, χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο την θετικής πολικότητας αλυσίδα, και την διαδοχική σύνθεση του γονιδιωματικού RNA θετικής πολικότητας από την αλυσίδα αρνητικής πολικότητας. Το υπεύθυνο ένζυμο για αυτή τη διαδικασία είναι η NS5B RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp). Το συγκεκριμένο ένζυμο μοριακού βάρους 67 kDa και μήκους 591 αμινοξέων, έχει ευρέως χαρακτηριστεί σαν σημαντικός στόχος για αντική παρέμβαση (77-80). Η καταλυτική περιοχή της NS5B περιλαμβάνει μοτίβα κοινά για όλες τις RdRps, όπως των υποπεριοχών με οργάνωση δεξιού χεριού (δάχτυλα, παλάμη και αντίχειρας). Η περιοχή αυτή μπορεί *in vitro* να εκτελεί *de novo* και εξαρτώμενη από εκκινητή σύνθεση του RNA, με μόνη προϋπόθεση να έχει ως συμπαραγόντες δισθενή μέταλλα (μαγνήσιο ή μαγγάνιο), που προσδέονται στα αμινοξέα Asp 220 και Asp 318, του καταλυτικού κέντρου. Το μονόκλωνο RNA εκμαγείο ή το σύμπλοκο εκκινητή-εκμαγείου προσδέεται σε μία αύλακα μεταξύ της περιοχής των δακτύλων και του αντίχειρα που καταλήγει στο ενεργό κέντρο. Στο ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από την παλάμη, θα εισέλθουν τα νουκλεοτίδια μέσω ενός «τούνελ» από την περιφέρεια προς την παλάμη. Η NS5B αγκυροβολείται στη μεμβράνη, μέσω μιας άγκυρας 21 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό της άκρο, που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή μέσα σε κύτταρα (60, 79).

1.2.4. Γονότυποι

Σύμφωνα με τις γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών του ιού, ο HCV διακρίνεται σε επτά γονότυπους και 67 υπότυπους (81). Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και ένας όγδοος γονότυπος (82), ενώ έχουν αναγνωριστεί και νέοι υπότυποι (83), που έχουν αυξήσει τον αριθμό τους στους 86 (84). Οι ιικοί γονότυποι διαφέρουν κατά 30-35% σε όλο το μήκος του γονιδιώματος (85-87). Οι διαφορές δεν κατανέμονται ομοιόμορφα, αφού οι UTRs και ο γενετικός τόπος της core πρωτεΐνης φέρουν την μικρότερη ποικιλομορφία, σε αντίθεση με την περιοχή του αμινοτελικού άκρου της E2 που είναι η πιο μεταβλητή. Επιπλέον, το μέγεθος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης είναι

διαφορετικό μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων (88, 89). Η παγκόσμια κατανομή των παραπάνω γονοτύπων, υποδεικνύει πως ο γονότυπος 1 είναι ο πιο συχνός, αποτελώντας το 49,1% των λοιμώξεων παγκοσμίως και ακολουθούν οι γονότυποι 3 (17.9%), 4 (16.8%) και 2 (11.0%). Ωστόσο, η γεωγραφική τους κατανομή ποικίλλει, με τους γονοτύπους 4 και 5 να εμφανίζονται αυξημένοι σε ασθενέστερες οικονομικά χώρες (90). Στην Ελλάδα, ο επικρατέστερος γονότυπος είναι ο 1 (45-47%), ακολουθεί ο 3 (~33%), και σε μικρά ποσοστά εμφανίζονται οι γονότυποι 4 (13%), 2 (9%), και 5 (1.2%) (91).

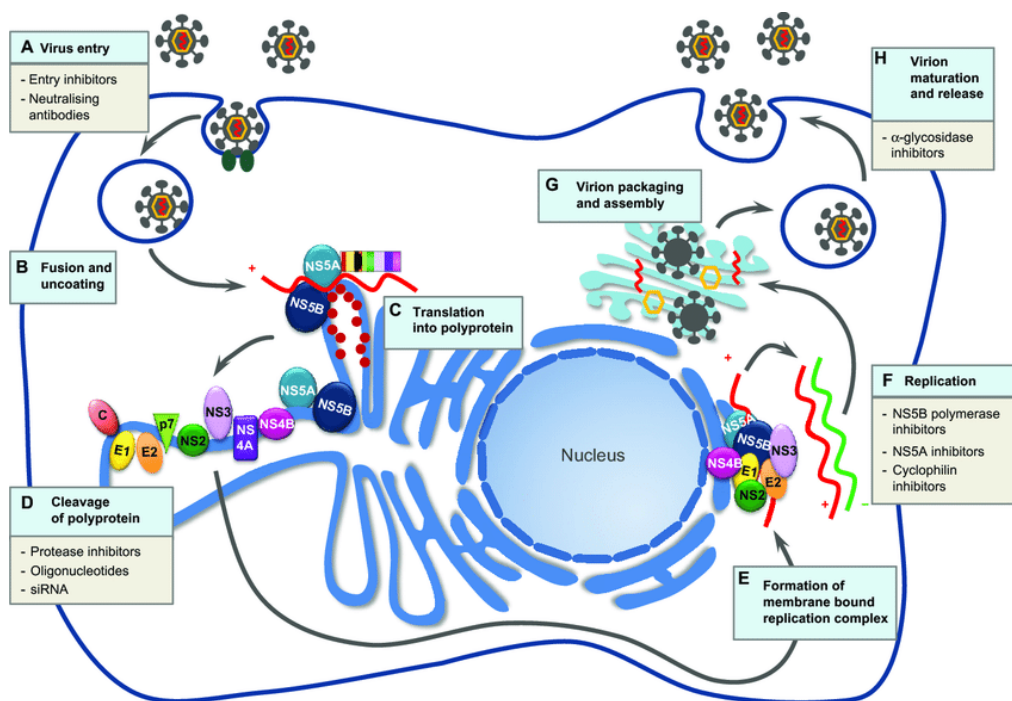
1.3. Κύκλος ζωής

Ο πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας C αποτελείται από διάφορα στάδια. Ο ιός έχει το ήπαρ σαν κύριο όργανο-στόχο. Το 25-73% των ηπατικών κυττάρων είναι ικανά να υποστηρίξουν την αντιγραφή του. Αν και γενετικό υλικό του ιού έχει εντοπιστεί σε μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού συστήματος, πολυμορφοπύρηνα, λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα (παγκρέατος, θυρεοειδή, επινεφριδίων, σπλήνα, χοληφόρων), κύτταρα στοματικού βλεννογόνου, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), δεν είναι ωστόσο επιβεβαιωμένη η ικανότητα αντιγραφής του ιού στα κύτταρα αυτά (92-94). Τα υψηλά επίπεδα ανοσολογικών διαταραχών που εντοπίστηκαν σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη HCV φαίνεται να οφείλονται στον πολλαπλασιασμό του ιού στα ηπατικά και στα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (95).

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο γίνεται με τη βοήθεια ειδικών υποδοχέων (LDL-R, SR-BI, DGSIGN) και μορίων (CD81, claudin-1 και occludin) της κυτταρικής μεμβράνης που διαθέτει το κύτταρο-ξενιστής (96-98). Επιπρόσθετοι παράγοντες, όπως ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ο ephrin receptor type A2 απαιτούνται για την είσοδο HCV και ενδεχομένως διαμορφώνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ CD81 και claudin-1 (97, 99, 100). Σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του ιού παίζουν οι ικές γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2, καθώς και οι απολιποπρωτεΐνες του ικού φακέλου (101). Η πρόσληψη γίνεται με ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης, τα ιικά σώματα ενδοκυττάρωνονται, γίνεται μεταφορά τους σε ενδοσώματα, όπου λόγω του

όξινο περιβάλλοντος ο ικός φάκελος συντήκεται με τη μεμβράνη του ενδοσώματος, προκαλώντας απελευθέρωση του ιικού καψιδίου στο κυτταρόπλασμα (99).

Ο ιός κατ'ανάγκη χρησιμοποιεί σύστημα μετάφρασης του κυττάρου, εφόσον ούτε κωδικοποιεί, ούτε φέρει δικό του αντίστοιχο σύστημα. Έτσι, για να αποφύγει τον ανταγωνισμό από την πληθώρα των κυτταρικών μηνυμάτων, χρησιμοποιεί ένα χαρακτηριστικό μηχανισμό για την έναρξη της μετάφρασης, τον μηχανισμό IRES, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα (102-106). Από τη μετάφραση του ιικού RNA παράγεται μια πολυπρωτεΐνη μήκους περίπου 3000 αμινοξέων, η οποία ωριμάζει συν- και μετα-μεταφραστικά με τη συνδρομή κυτταρικών και ιικών πρωτεασών, στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου, κωδικοποιώντας 10 ώριμες πρωτεΐνες: NH₂-core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του HCV (107).

Η αντιγραφή του RNA πραγματοποιείται στο μεμβρανικό δίκτυο (MW), εγκλωπώσεις της μεμβράνης του ER, η δημιουργία του οποίου επάγεται από τις NS4B και NS5A. Η NS5B πολυμεράση είναι κυρίαρχη στο σύμπλοκο της αντιγραφής του HCV, στο οποίο συμμετέχει επίσης η NS3 με ρόλο NTPάσης/ελικάσης. Το θετικής πολικότητας RNA(+) αντιγράφεται σε αρνητικής πολικότητας, RNA(-), που

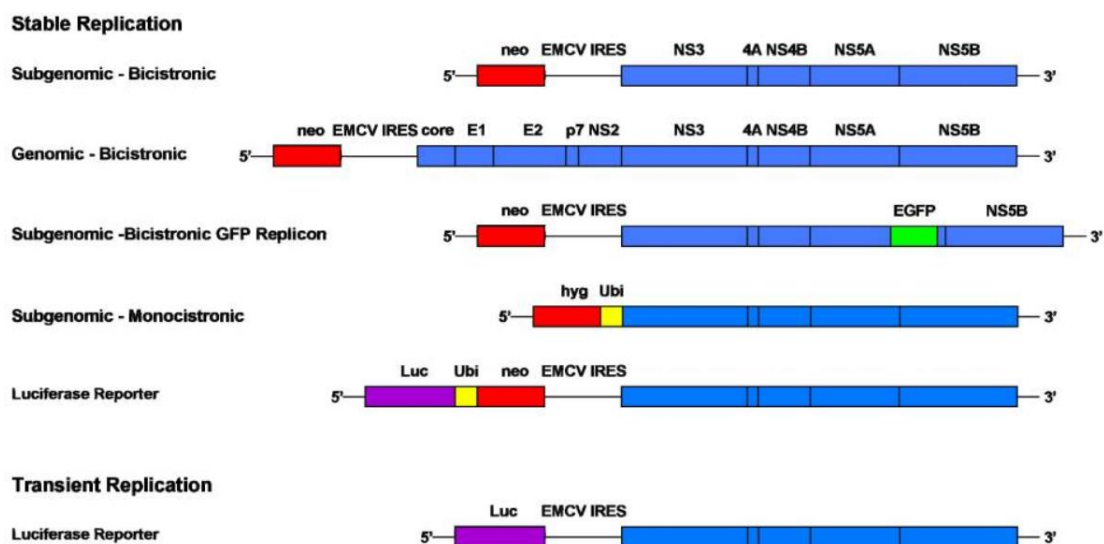
χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την παραγωγή νέων μορίων RNA(+). Για την έναρξη της σύνθεσης του RNA απαιτούνται εκτεταμένης δευτεροταγούς δομής στοιχεία στο 3' UTR του κάθε κλώνου. Τα νέα μόρια RNA χρησιμοποιούνται για μετάφραση (παραγωγή νέων ικών πρωτεϊνών), αντιγραφή του RNA ή σχηματισμό νέων μολυσματικών ικών σωματιδίων (108). Η αντιγραφή του ικού γονιδιώματος είναι επιρρεπής σε λάθη, καθώς η πολυμεράση (RdRp) δεν έχει ικανότητα επιδιόρθωσης (109).

Η δημιουργία των ικών σωματιδίων απαιτεί αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης core και του ικού RNA (31). Για την απελευθέρωση των σωματιδίων του HCV δεν απαιτείται λύση των κυττάρων, κάτι που εξηγεί τη χρονιότητα της λοίμωξης. Η σύνδεση του ιού με λιποπρωτεΐνες του ορού του αίματος, χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (LDL, VLDL), φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην είσοδο του ιού στα κύτταρα, αλλά και στη συγκρότηση του ικού σωματιδίου και πιθανώς στην διαφυγή του από το ανοσοποιητικό σύστημα. (110). Ο HCV εισάγεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και μέσω της εκκριτικής μηχανής του κυττάρου, ελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο (111).

1.4. Συστήματα μελέτης του HCV

Τροχοπέδη στην μελέτη HCV ήταν για πολύ καιρό η έλλειψη απλών και αποτελεσματικών συστημάτων μελέτης του ιού, αφού ήταν αδύνατος ο πολλαπλασιασμός μολυσματικών στελεχών σε κάποια κυτταρική σειρά (112). Σημαντικό βήμα για τη μελέτη της αντιγραφής του HCV RNA, αποτέλεσε η κατασκευή συνθετικών αυτοαντιγραφόμενων μορίων HCV RNA (ρεπλικόνια - replicons) σε κυτταροκαλλιέργεια. Έτσι, το 1999 κατασκευάστηκε το δισιστρονικό ρεπλικόνιο (replicon), ένα μόριο RNA το οποίο αποτελείται από το 5' UTR, τις NS3-NS5B και το 3' UTR του στελέχους Con1 (γονότυπος 1b) του HCV και έχει τη δυνατότητα αυτοαντιγραφής στην καρκινική σειρά ηπατικών κυττάρων Huh7 (113). Προσαρμοστικές μεταλλάξεις που αναπτύσσονται στο ικό ρεπλικόνιο κατά τη συνεχή αντιγραφή του αυξάνουν το ρυθμό αντιγραφής (114). Με βάση τα δεδομένα αυτά, συντέθηκαν ρεπλικόνια και για άλλους γονοτύπους του HCV (υπότυπος 1a και γονότυποι 2-6), που μεταγράφονται *in vitro* και εισάγονται στα κύτταρα με διαμόλυνση

(transfection) (115-119). Τα ρεπλικόνια αυτά μπορεί να περιέχουν τμήμα (υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια) ή ολόκληρο το γονιδίωμα του HCV. Επιπλέον, μπορεί να διαθέτουν το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης (neo), που βοηθά στη σταθερή αντιγραφή του ρεπλικονίου στα κύτταρα χρησιμοποιώντας αντιβιοτικό επιλογής, ή το γονίδιο της λουσιφεράσης (Luc) για την εύκολη ποσοτικοποίηση της αντιγραφής τους, σαν γονίδιο αναφοράς. Στα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια, τα γονίδια αυτά αντικαθιστούν το τμήμα Core-NS2 και η μετάφρασή τους ελέγχεται από το IRES του HCV, ενώ η μετάφραση των μη δομικών ικών πρωτεϊνών ελέγχεται από ένα ετερόλογο IRES προερχόμενο από τον ιό της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (EMCV) (120).



Εικόνα 3: Ρεπλικόνια του HCV (121).

Ωστόσο, ήταν αδύνατη η δημιουργία και παραγωγή ενός αποτελεσματικά μολυσματικού HCV στην κυτταροκαλλιέργεια, καθώς όλα τα συστήματα που δοκιμάστηκαν μειονεκτούσαν σε απόδοση ιού και επαναληψιμότητα (112). Τελικά, ο πρώτος μολυσματικός κλώνος κυτταροκαλλιέργειας (HCVcc), ικανός να πραγματοποιεί ολόκληρο τον κύκλο ζωής του HCV, κατασκευάστηκε το 2005 χρησιμοποιώντας το στέλεχος JFH1 γονοτύπου 2a, που είχε την ιδιαιτερότητα να μπορεί να αντιγράφεται αποτελεσματικά σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα Huh7, χωρίς προσαρμοστικές μεταλλάξεις (122-124). Έπειτα, βασισμένοι στο στέλεχος JFH1, οι ερευνητές δημιούργησαν χμιαρικούς κλώνους, στους οποίους έχει αντικατασταθεί τμήμα της αλληλουχίας με το αντίστοιχο τμήμα άλλων γονοτύπων (112), ενώ τα

τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μολυσματικοί κλώνοι, ανεξάρτητοι του JFH1, για τους γονότυπους 1, 3 και άλλους υποτύπους του γονότυπου 2 (125, 126).

Τέλος, πέραν της μελέτης μόλυνσης κυτταρικών σειρών, χρησιμοποιούνται και συστήματα μελέτης του ιού σε ζωικά μοντέλα. Για πολλά χρόνια, ο χιμπατζής ήταν το μοναδικό διαθέσιμο μοντέλο, λόγω της ομοιότητάς του με τον άνθρωπο, ωστόσο δεν χρησιμοποιείται πια για τη μελέτη του HCV. Εντούτοις, δύο νέα μοντέλα ζώων για τη μελέτη του ιού, όχι ευρέως χρησιμοποιούμενα, είναι τα διαγονιδιακά και τα χιμαιρικά ποντίκια τα οποία εκφράζουν ιικές πρωτεΐνες ή φέρουν ανθρωποποιημένο ήπαρ, αντίστοιχα (127, 128).

1.5. Θεραπείες για τον HCV

Ο απώτερος στόχος της θεραπείας ενάντια στη χρόνια λοίμωξη με HCV, είναι η μακροπρόθεσμη ιική εξάλειψη, μια κατάσταση που περιγράφεται καλύτερα με τον όρο παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση (Sustained Virological Response, SVR ή SVR24), και η οποία ορίζεται ως μη ανιχνεύσιμο HCV RNA στο αίμα του ασθενούς 24 εβδομάδες μετά τη λήξη της θεραπείας.

Αν και η μέχρι πρόσφατα καθιερωμένη θεραπεία 24 εβδομάδων με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-άλφα (PEG-IFN-α) και ριμπαβιρίνη (RBV) παρέχει ένα SVR 75% ή περισσότερο σε ασθενείς μολυσμένους με γονότυπους 2 και 3, τα ποσοστά SVR για άτομα μολυσμένα με γονότυπο 1 είναι μόλις 40-50%, παρά τη αυξημένη διάρκεια θεραπείας (48 εβδομάδες) (129, 130). Η ιντερφερόνη δεν στοχεύει απευθείας τον ιό HCV, αλλά προκαλεί την ενεργοποίηση ανοσολογικών μηχανισμών με στόχο την απαλοιφή του. Ωστόσο, το πλήθος δυσμενών παρενεργειών και τα μειωμένα ποσοστά SVR οδήγησαν στην αναζήτηση νέων θεραπειών.

Έτσι, συντέθηκαν αναστολείς (direct-acting antivirals, DAAs) έναντι ειδικών ιικών στόχων, που είναι απαραίτητοι για την αντιγραφή του ιού. Οι αναστολείς αυτοί στοχεύουν άμεσα κάποια ιική πρωτεΐνη με ρόλο στον ιικό πολλαπλασιασμό, όπως την ιική πρωτεάση NS3A/4A, την πολυμεράση NS5B και την φωσφοπρωτεΐνη NS5A. Μέχρι στιγμής είναι διαθέσιμες δια του στόματος αντι-ιικές αγωγές, χωρίς ιντερφερόνη για όλους τους γονότυπους. Ωστόσο, η θεραπεία ατόμων μολυσμένων με τον γονότυπο 3 και με κίρρωση περιλαμβάνει, ακόμα και σήμερα, χορήγηση ιντερφερόνης (131).

Εκτός από τα DAAs, μελετούνται και αναστολείς που στοχεύουν κυτταρικούς παράγοντες, όπως είναι η κυκλοφιρίνη ή το miR122, παρέχοντας εναλλακτικές στις θεραπείες κατά του HCV (132).

Ωστόσο, παρά τη υψηλή αποτελεσματικότητα των DAAs, τα τελευταία χρόνια έχουν αναδυθεί και προβλήματα, με κυριότερο τον κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας του ιού έναντι των αντι-ιικών φαρμάκων. Ο κίνδυνος αυτός εξαρτάται από το γονότυπο του HCV και το θεραπευτικό σχήμα (133). Επιπλέον, ακόμη και μετά την εκκαθάριση του ιού, ο κίνδυνος ηπατοκυτταρικού καρκίνου παραμένει (134). Ένα άλλο μειονέκτημα είναι το μεγάλο κόστος των DAAs, που περιορίζει την εξάπλωση της χρήσης τους (135).

2. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β (HBV)

2.1. Γενικά στοιχεία

Ο ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV) ανήκει στο γένος *Orthohepnavirus* της οικογένειας *Hepadnaviridae* και εξαιτίας της ιατρικής του σπουδαιότητας αποτελεί το πιο βασικό και αντιπροσωπευτικό μέλος της (136). Εξελικτικά δεν έχει συγγένεια με τον HCV και τους άλλους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae*, ωστόσο ο HBV και ο HCV μολύνουν και οι δύο το ήπαρ, προκαλώντας νόσο με παρόμοια συμπτωματολογία, ενώ πολύ συχνά εμφανίζονται σε συμμόλυνση(137, 138). Ο HBV είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Υπολογίζεται πως 240 εκατομμύρια άτομα σε όλο τον κόσμο πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα Β και 500.000-600.000 θάνατοι οφείλονται ετησίως σε οξεία ηπατίτιδα, κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (137, 138).

2.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Η ανακάλυψη του HBV έγινε το 1966, όταν ο γενετιστής Baruch Blumberg ταυτοποίησε το αντιγόνο επιφανείας του ιού, HBsAg (Hepatitis B surface antigen). Κατά τη διάρκεια ενός ανοσολογικού ελέγχου, ο Blumberg κατά τύχη ανακάλυψε το HBsAg στο αίμα ενός Αυστραλού γηγενή και το ονόμασε «Αυστραλιανό αντιγόνο». (139). Το 1970, ο David Dane παρατήρησε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το ιικό

σωμάτιο του HBV, από δείγμα ορού ασθενών, το οποίο προς τιμήν του ονομάστηκε «σωματίδιο Dane». Στη συνέχεια, ο Blumberg ανέπτυξε τις αρχές για την δημιουργία διαγνωστικού τεστ αλλά και εμβολίου πρόληψης από τον HBV. Το 1976 τιμήθηκε με βραβείο Nobel Ιατρικής, τόσο για την περιγραφή του ιού, όσο και για την προσφορά του στην ανάπτυξη του εμβολίου (140).

2.1.2. Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης

Η μόλυνση με HBV μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική λοίμωξη, οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, αλλά και οξείας μορφής ηπατίτιδα που απαιτεί επείγουσα μεταμόσχευση ήπατος. Επιπρόσθετα, μπορεί να αναπτυχθεί χρόνια HBV λοίμωξη, που να οδηγήσει σε κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο (141).

Η οξεία ηπατίτιδα απαντάται κυρίως σε ενήλικες ασθενείς, αφού ο ιός μεταφέρεται μέσω σεξουαλικής επαφής ή μέσω μολυσμένης βελόνας για τους χρήστες τοξικών ουσιών (142). Μετά την έκθεση στον HBV, ακολουθεί μία περίοδος επώασης, χωρίς συμπτώματα και με φυσιολογικές τιμές ηπατικών ενζύμων. Στη συνέχεια, το άτομο εμφανίζει συνήθως ναυτία, τάση για εμετό, ανορεξία και κοιλιακό άλγος. Τα συμπτώματα είναι γενικά και διαρκούν για μικρό χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα η διάγνωση της ιογενούς λοίμωξης να γίνεται σπανίως (143). Μόλις το 30% των ασθενών, λόγω εμφάνισης ίκτερου, αναζητά θεραπεία. Στο 95% των περιπτώσεων, τα συμπτώματα υποχωρούν και τα παραγμένα αντισωμάτων έναντι του HBsAg, αποτρέπουν νέα μόλυνση από τον ιό (142). Σχεδόν το 1% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα, παρουσιάζει οξύ ηπατικό επεισόδιο, που περιλαμβάνει αύξηση των ηπατικών ενζύμων, εμφάνιση εγκεφαλοπάθειας και ίκτερου, αλλά και ηπατική ανεπάρκεια, που απαιτεί άμεση μεταμόσχευση ήπατος για διασφάλιση της επιβίωσης του ασθενούς (144).

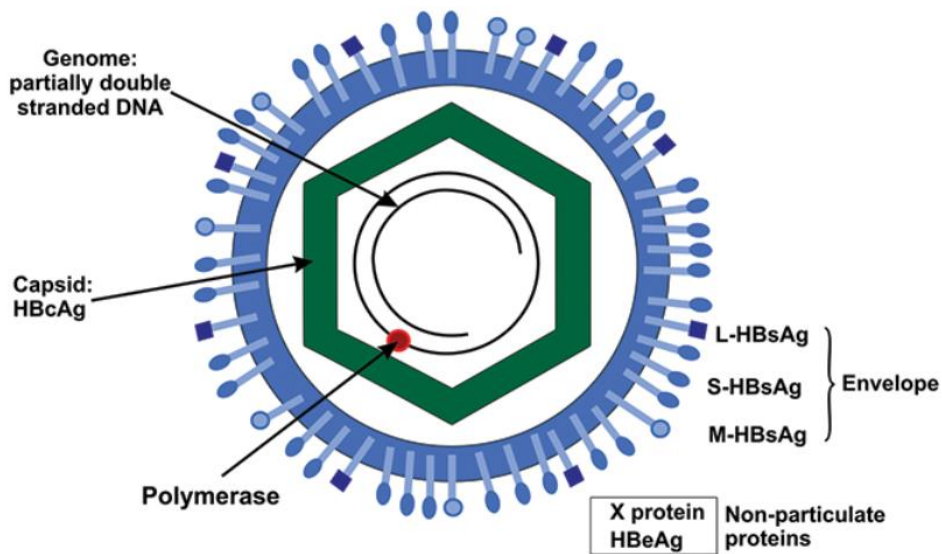
Η αδυναμία αντιμετώπισης του HBV από το ανοσοποιητικό σύστημα οδηγεί σε εγκαθίδρυση χρόνιας νόσου. Για να θεωρηθεί χρόνια η νόσος, πρέπει το HBsAg να ανιχνεύεται στο πλάσμα του μολυσμένου ατόμου για 6 μήνες το λιγότερο. Από χρόνια ηπατίτιδα συνήθως πάσχουν άτομα τα οποία μολύνθηκαν κατά την περιγεννητική περίοδο ή παιδιά ηλικίας 3-5 ετών, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα τους δεν ήταν

πλήρως ανεπτυγμένο για αντιμετώπιση της μόλυνσης (145). Διακρίνεται σε δύο μορφές: τη χρόνια εμμένουσα ηπατίτιδα και τη χρόνια ενεργό μορφή ηπατίτιδας (146).

Έχουν ταυτοποιηθεί τρία στάδια της χρόνιας ηπατίτιδας Β: στάδιο ανοσολογικής ανοχής (υψηλό ιικό φορτίο, κανονικές τιμές ηπατικών ενζύμων), στάδιο ανοσολογικής κάθαρσης (ενεργοποίηση ανοσοποιητικού), στάδιο ανενεργούς φορέας (ανάπτυξη αντι-Hbe αντισωμάτων) (147). Η διαδοχή των φάσεων διαφέρει για κάθε ασθενή, ενώ είναι πιθανό να γίνει επαναφορά της φάσης ενεργοποίησης σε ανενεργούς φορείς, επομένως απαιτείται έλεγχος των ηπατικών ενζύμων τουλάχιστον κάθε εξάμηνο (148). Η επανενεργοποίηση του ιού μπορεί να συμβεί πολλές δεκαετίες μετά τη φάση της ανενεργούς φορέας. Γι'αυτό είναι απαραίτητη η θεραπευτική παρέμβαση από τα αρχικά στάδια της λοίμωξης. **Δομή του HBV**

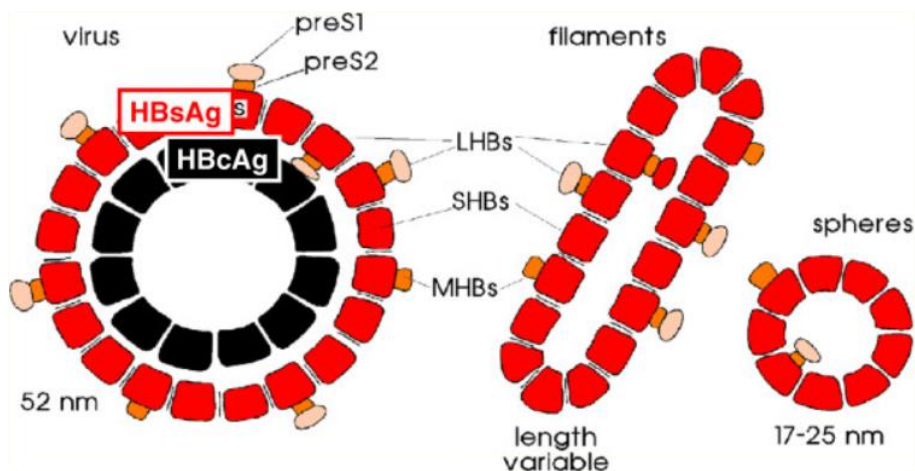
2.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου

Το ιικό σωματίδιο του ιού της ηπατίτιδας Β είναι σφαιρικό, με διάμετρο 42 nm και όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, ονομάζεται και «σωματίδιο Dane». Εξωτερικά περιβάλλεται από τον ιικό φάκελο, που έχει δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας και περιλαμβάνει το αντιγόνο επιφανείας HBsAg. Αμέσως μετά βρίσκεται το εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο, η συγκρότηση του οποίου γίνεται με σχηματισμό ομοδιμερών της δομικής πυρηνικής πρωτεΐνης HBcAg. Τα ομοδιμερή συγκρατούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης (149). Στο νουκλεοκαψίδιο εσωκλείονται το μερικώς δίκλωνο DNA και η DNA πολυμεράση του ιού, με ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, ενώ περιλαμβάνει επίσης μία εκκρινόμενη διαλυτή πρωτεΐνη, τη HBeAg.



Εικόνα 4: Η δομή του ιικού σωματιδίου του HBV (150).

Κατά την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν βρεθεί δύο ακόμη μορφές του HBV, μικρά σωματίδια σφαιρικού σχήματος 25 nm και σωματίδια νηματοειδούς μορφής 22 nm με διάφορα μήκη. Οι δομές αυτές δεν περιέχουν ιϊκό DNA και άρα δεν είναι μολυσματικές (151). Δημιουργούνται από το αντιγόνο επιφανείας του ιού και κάποια λιπίδια του ξενιστή. Κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού, τα υποϊικά αυτά σωματίδια παράγονται σε περίσσεια σε σχέση με τα μολυσματικά, γι' αυτό ο εντοπισμός τους στο πλάσμα των ασθενών τα συνιστά διαγνωστικό δείκτη μεγάλης ευαισθησίας, ακόμα και όταν τα επίπεδα του DNA του HBV στο πλάσμα είναι χαμηλά. Δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος τους, όμως πιθανολογείται ότι λειτουργούν σαν αντιπερισπασμός για το ανοσοποιητικό του ξενιστή, βοηθώντας στην εγκαθίδρυση χρόνιας λοίμωξης (152).

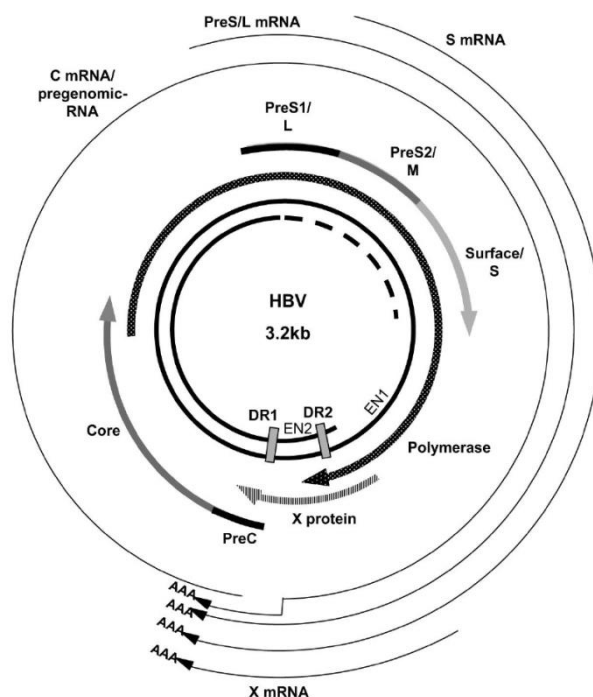


Εικόνα 5: Το βίριο του HBV και τα υποικά σωματίδια (153).

2.2.2. Γονιδίωμα

Ο HBV είναι DNA ιός και το γονιδιώμά του εντοπίζεται στο εσωτερικό του νουκλεοκαψιδίου. Έχει μορφή κυκλικού, μερικώς δίκλωνου DNA (relaxed-circular DNA, rcDNA) με μέγεθος περίπου 3.200 ζεύγη βάσεων. Στο 5' άκρο της μιας αλυσίδας είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η ιική πολυμεράση (154). Η μία αλυσίδα είναι ολόκληρη με μήκος 3020-3320 νουκλεοτίδια, ενώ η δεύτερη ελλιπής με μήκος 1700-2800 νουκλεοτίδια, δημιουργώντας ένα κενό σημείο, το οποίο συμπληρώνεται *in vivo*, μετά την είσοδο του ιού στο ηπατοκύτταρο (155). Είναι DNA ιός που πολλαπλασιάζεται μέσω ενδιάμεσου RNA με αντίστροφη μεταγραφή, γι' αυτό χαρακτηρίζεται και ως παραρετροϊός.

Το γονιδίωμα του HBV διαθέτει τέσσερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames - ORFs) που αλληλεπικαλύπτονται και εκφράζουν τις πρωτεΐνες του ιού (156). Περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη δομική πυρηνική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου HBcAg και τη μη δομική, εκκρινόμενη προπυρηνική πρωτεΐνη HBeAg. Επίσης, το γονίδιο P, το οποίο εκφράζει την ιική DNA πολυμεράση, τα PreS1/L, PreS2/M και S-γονίδια, που κωδικοποιούν τις τρεις λιποπρωτεΐνες του φακέλου και τέλος το γονίδιο X, υπεύθυνο για την έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης X. Λόγω του μικρού του μεγέθους, το ιικό γονιδίωμα εκφράζει περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, η καθεμία με σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα και την αναπαραγωγή.



Εικόνα 6: Το γονιδίωμα του HBV (157).

2.2.3. Ιικές πρωτεΐνες

HBsAg (Hepatitis B surface antigen): Το αντιγόνο επιφάνειας του ιού, γνωστό και ως Αυστραλιανό αντιγόνο. Περιλαμβάνει τρεις γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθος και το στάδιο γλυκοζυλίωσης τους σε μικρή (SHBs-small), μεσαία (MHBs-large middle), και μεγάλη (LHBs-large) (158). Το καρβοξυτελικό τμήμα που περιέχει την SHBs υφίσταται σε όλες τις επιφανειακές πρωτεΐνες, η preS1 αμινοτελική επέκταση περιέχει μόνο την LHBs ενώ η preS2 τις LHBs και MHBs (159). Η σύνθεση τους λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μπορεί να παράγονται ποσότητες πέραν του αναγκαίου για την ιική συναρμολόγηση. Αυτές πολυμερίζονται και δημιουργούν σφαιρικά ή νηματοειδή υποϊικά σωματίδια (subviral particles-SVP) που όμως δεν είναι λοιμογόνα, εμφανίζονται όμως σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τα μολυσματικά σωματίδια και πιθανόν προάγουν την ανοσολογική αντοχή (160, 161).

HBcAg (Hepatitis B core antigen): Είναι μικρή πρωτεΐνη 21 kDa που συγκροτεί το ιικό καψίδιο του HBV, μέσα στο οποίο εγκλείεται το γονιδίωμα του ιού. Συνεπώς, ο ρόλος της είναι κυρίως δομικός, έχει όμως και πολλές άλλες σημαντικές λειτουργίες. Είναι σημαντική πρωτεΐνη σχεδόν για κάθε στάδιο του κύκλου ζωής του ιού όπως για

υποκυτταρικές μεταφορές, απελευθέρωση του HBV γονιδιώματος, μεταβολισμό του RNA, συγκρότηση και μεταφορά του καψιδίου και αντίστροφη μεταγραφή (162). Οι HBcAg και HBeAg κωδικοποιούνται από το ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ωστόσο η HBcAg δεν εκκρίνεται και δεν συναντάται ελεύθερη στην κυκλοφορία του αίματος, παρά σε ηπατικές βιοψίες.

HBeAg (Hepatitis B envelope antigen): Είναι πρωτεΐνη που βρίσκεται μεταξύ του εικοσαεδρικού νουκλεοκαψιδίου και του φακέλου του ιού. Παρότι ανήκει στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την HBcAg, η HBeAg παράγεται όταν μεταφράζονται στη σειρά τα γονίδια ORF Core και Pre C. Θεωρείται εκκρινόμενη πρωτεΐνη και συγκεντρώνεται στον ορό σαν χαρακτηριστικό ανοσολογικό αντιγόνο. Ο ρόλος της προπυρηνικής πρωτεΐνης HbeAg είναι ασαφής, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στην διαφυγή του ιοσωματίου από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανίχνευσή της σε ασθενή σημαίνει ότι υπάρχει ενεργός ιική αντιγραφή και το άτομο είναι μολυσματικό (163).

HBx (Hepatitis B X antigen): Το μικρότερο από τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 154 αμινοξέων, την HBx. Παράγεται σε μικρές ποσότητες τόσο στην οξεία, όσο κι στη χρόνια λοίμωξη με HBV και εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα (164). Η πρωτεΐνη X έχει διάφορες λειτουργίες, με πιο βασικές τη μεταγωγή σήματος μέσω σύνδεσης της σε ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες και τις επιδιορθώσεις σφαλμάτων του DNA. Επίσης, συμμετέχει σε ακετυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις και δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, ωστόσο η βιολογική σημασία των μετατροπών αυτών παραμένει άγνωστη (165). Τέλος, έχει συσχετιστεί με την ογκογενή ιδιότητα του HBV, αφού αποσιωπεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (166).

DNA polymerase: Το μεγαλύτερο πλαίσιο ανάγνωσης του ιικού γονιδιώματος κωδικοποιεί τη DNA πολυμεράση του HBV, η οποία εμπλέκεται σε πολλούς λειτουργικούς τομείς. Αρχικά, εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του DNA και δρα σαν αντίστροφη μεταγραφάση, υπεύθυνη για τη σύνθεση του DNA γονιδιώματος με μήτρα το προγονιδιωματικό RNA (pregenomic RNA - pgRNA). Επιπλέον, επιτελεί και ρόλο DNA-εξαρτώμενης-DNA-πολυμεράσης, αφού συνθέτει τον συμπληρωματικό κλώνο του DNA για να παραχθεί τελικά το rcDNA. Λειτουργεί επίσης σαν RNAάση,

που αποσυνθέτει το pgRNA για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της διπλής έλικας του DNA, γι' αυτό εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Τέλος, στο αμινοτελικό άκρο, δρα σαν τερματική πρωτεΐνη με ρόλο την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής και την εγκαθίδρυση του γονιδιώματος (167).

2.2.4. Γονότυποι

Το γονιδίωμα του HBV παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και έτσι διακρίνεται σε οκτώ γονότυπους, τους A-H. (168) Κάθε γονότυπος διαφέρει τουλάχιστον κατά 8% στην αλληλουχία του γονιδιώματός του και εμφανίζει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή (169). Στοιχεία όσον αφορά τον επιπολασμό κάθε γονότυπου είναι σημαντικά, διότι οι διαφοροποιήσεις αυτές στο γονιδίωμα, έχουν άμεση σχέση με την εξέλιξη της νόσου, την κλινική έκβαση και την απόκριση στη θεραπεία (170). Οι γονότυποι μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος του γονιδιώματος, λόγω προσθήκης ή διαγραφής γενετικών τόπων, έτσι οι γονότυποι B, C, F και H έχουν μήκος 3215 νουκλεοτίδια, ο G 3248 και ο D 3182. Εκτός από τους E και G, όλοι οι γονότυποι του HBV διαχωρίζονται σε υπότυπους (171).

2.3. Κύκλος ζωής

Στο ήπαρ, το ιικό σωματίδιο του HBV προσκολλάται αρχικά σε ηπατικές θεϊκές πρωτεογλυκάνες (Heparan Sulfate Proteoglycans-HSPG) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση είναι αναστρέψιμη και μη ειδική, παρ' όλα αυτά είναι αναγκαία καθώς συγκεντρώνει στην κυτταρική επιφάνεια ιοσωμάτια φέρνοντάς τα τελικά κοντά στον ειδικό υποδοχέα του HBV, τον συµμεταφορέα ταυροχολικού νατρίου (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide - NTCP) (163, 166). Ο υποδοχέας NTCP είναι μια διαµεµβρανική γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την νατριο-εξαρτώµενη επαναπρόσληψη των χολικών οξέων από το αίµα και η έκφρασή του ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες του ήπατος, ορμόνες και κυτοκίνες. Η αυξηµένη έκφραση του NTCP στο ήπαρ εξηγεί την ειδικότητα του ιού για τον συγκεκριµένο ιστό (172). Ο HBV συνδέεται στον υποδοχέα µέσω της pre-S1 περιοχής της LBH πρωτεΐνης του φακέλου. Ο ακριβής µηχανισµός εισόδου του ιού στο κύτταρο-ξενιστή παραµένει ασαφής, ωστόσο πιθανότατα ακολουθεί ενδοκύττωση και το

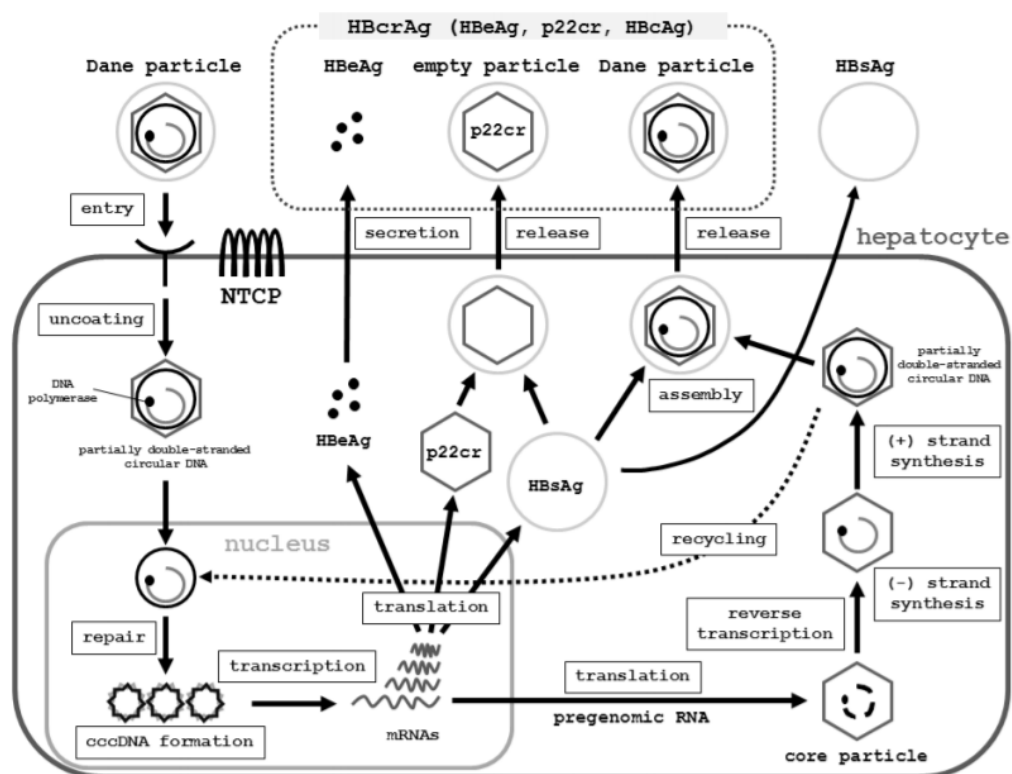
νουκλεοκαψίδιο μέσω κυστιδίων μεταφέρεται στον πυρήνα μέσω κυστιδίων και του δικτύου των μικροσωληνίσκων (173).

Ακολουθεί η είσοδος του rcDNA, μέσω του πυρηνικού πόρου, στο πυρηνόπλασμα, όπου πραγματοποιείται η επιδιόρθωση του γονιδιώματος, τόσο από ιικά, όσο και από κυτταρικά ένζυμα. Αρχικά, η ημιτελής θετική έλικα του rcDNA συμπληρώνεται από την ιϊκή πολυμεράση κι ακολουθεί απομάκρυνση της πολυμεράση και των RNA-εκκινητών από ένζυμα του κυττάρου. Τελικά, έπειτα από ομοιοπολική σύνδεση των δύο άκρων, δημιουργείται το ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (covalently closed circular DNA-cccDNA) το οποίο οργανώνεται σε δομή χρωματίνης με ιστόνες και σχηματίζει ένα μικροχρωμόσωμα (174, 175).

Η δημιουργία του cccDNA, το οποίο συγκεντρώνεται στον πυρήνα, ολοκληρώνει την έναρξη της λοίμωξης, αφού λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τη μεταγραφή όλων των ιικών RNA, με χρήση του μηχανισμού μεταγραφής των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η κυτταρική RNA-πολυμεράση II δημιουργεί από το cccDNA το pgRNA και αρκετά υπογονιδιωμιακά μετάγραφα, τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση (176). Το pgRNA χρησιμοποιείται σαν μήτρα για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος με αντίστροφη μεταγραφή αλλά και σαν mRNA για σύνθεση της Core, της Precore και της πολυμεράσης του HBV. Από τα υπογενωμικά RNA κωδικοποιούνται η ρυθμιστική πρωτεΐνη HBx και οι τρεις πρωτεΐνες του φακέλου (177).

Με το τέλος της μετάφρασης, το αμινοτελικό άκρο της ιϊκής πολυμεράσης προσδένεται σε μία δομή στο 5'-άκρο του pgRNA, που ονομάζεται δομή έπιλον (ε), προκαλώντας την αυτόματη συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου. Επιπλέον, η περιοχή ε περιέχει τον εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή. Με την προσθήκη του πρώτου ολιγονουκλεοτιδίου, (GAA), η DNA πολυμεράση και οι νέες βάσεις μετακινούνται στο 3'-άκρο του pgRNA. Εκεί η αντίστροφη μεταγραφή συνεχίζει, με σκοπό το σχηματισμό κλώνου DNA θετικής πολικότητας. Παράλληλα, ενεργοποιείται η RNAσση Η, που ρόλος της είναι η αποσύνθεση του pgRNA, αφήνοντας μόνο 18 νουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται σαν RNA-εκκινητής για σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Στην πλειονότητα των νουκλεοκαψιδίων, ο εκκινητής

μεταφέρεται σε διαφορετική θέση του νεοσχηματισμένου DNA, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό μερικώς δίκλωνου κυκλικού DNA. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία ωρίμανσης του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα ολοκληρώνεται.



Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής του HBV (178).

Σε ένα μικρό αριθμό νουκλεοκαψιδίων το DNA που παράγεται είναι δίκλωνο, γραμμικό μόριο DNA (double stranded linear DNA, dsIDNA), το οποίο σχηματίζεται έπειτα από αποτυχημένη μετατόπιση του RNA-εκκινητή, μετά την αντίστροφη μεταγραφή, που οδηγεί σε αδυναμία σχηματισμού κυκλικού γονιδιώματος (179). Ωστόσο, το dsIDNA είναι λειτουργικό για τον ιό και μπορεί είτε να σχηματίσει cccDNA, μετά από μεταφορά του στον πυρήνα, ή να απελευθερωθεί μετά από την προσάρτηση νουκλεοκαψιδίου που το φέρει, και του φακέλου. Επίσης, πιθανολογείται πως το γραμμικό δίκλωνο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή, κάτι που συνδέεται άμεσα με την ηπατική καρκινογένεση του ιού (180).

2.4. Συστήματα μελέτης του HBV

Η μελέτη του HBV *in vitro* εμφανίζει πολλές δυσκολίες, εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων αντιγραφής και της αδυναμίας, μέχρι προσφάτως, για αναπαραγωγή ολόκληρου του ιικού κύκλου ζωής στην κυτταροκαλλιέργεια (181). Τα συνήθη συστήματα μελέτης βασίζονται στις ηπατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2 και Huh7, που δεν μολύνονται από τον HBV, ωστόσο υποστηρίζουν τη ιική αντιγραφή αφού το γονιδίωμα του ιού εισαχθεί σε αυτά με επιμόλυνση (transfection) (182, 183). Η κυτταροσειρά HepaRG αποτελείται από πρόγονα ηπατοκύτταρα ικανά να μολυνθούν με τον HBV, μετά από διαφοροποίησή τους με DMSO (183). Παρ' όλα αυτά, απαιτούν πολύπλοκες συνθήκες διαφοροποίησης και τα επίπεδα μόλυνσης είναι χαμηλά (184). Τα HepAD38, που βασίζονται στην κυτταρική σειρά HepG2, φέρουν σταθερά το ιικό γονιδίωμα, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από την τετρακυκλίνη (185). Τελικά, η ολοκληρωμένη μελέτη των σταδίων του κύκλου ζωής του HBV επιτεύχθηκε με την υπερέκφραση του NTCP υποδοχέα στην κυτταροσειρά HepG2 και τη χρήση ιικών σωματιδίων παραγμένων από την κυτταρική σειρά HepAD38 (186).

Μία πρόκληση για τη μελέτη του HBV είναι ο περιορισμένος αριθμός ειδών ζώων που μολύνονται από τον ιό. Το ζωικό μοντέλο που προσομοιάζει περισσότερο για την HBV μόλυνση στον άνθρωπο, είναι ο χιμπατζής (187). Σε αυτό το μοντέλο μελετήθηκε η ανοσολογική απόκριση στην ιική μόλυνση και έχει συμβάλει κατά πολύ στην κατανόηση της παθογένειας του ιού. Ωστόσο, το υψηλό κόστος και οι περιορισμοί της χρήσης πρωτεύοντων σαν μοντέλα περιόρισαν τη χρήση τους (188).

Τα ποντίκια αποτελούν το καλύτερο *in vivo* σύστημα μελέτης του HBV, όμως τα ηπατικά τους κύτταρα δεν είναι δεκτικά στην είσοδο του ιού και δεν υποστηρίζουν την ιική αντιγραφή και τον σχηματισμό cccDNA (189). Έτσι, έχουν καθιερωθεί μοντέλα ποντικών, μεταξύ των οποίων διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν αντιγόνα του HBV (core, envelope, surface), ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στα οποία επιτρέπεται η ανάπτυξη χρόνιας ηπατικής νόσου που προσομοιάζει με αυτή του ανθρώπου, καθώς και χμιαρικά ποντίκια με ανθρωποποιημένο ήπαρ, που επιτρέπει την εμμένουσα μόλυνση με HBV (190, 191).

2.5. Πρόληψη-θεραπείες για τον HBV

2.5.1. Εμβολιασμός

Παρότι οι βάσεις τέθηκαν τη δεκαετία του '60, το πρώτο εμβόλιο κατά του HBV εγκρίθηκε το 1981 και το 1991 εντάχθηκε σε όλα τα εθνικά προγράμματα ανοσοποίησης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (192). Το εμβόλιο πλέον παρασκευάζεται με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, που εκφράζει μόνο το αντιγόνο επιφανείας HBsAg από τη ζύμη *S.cerevisiae*. Τα προγράμματα ανοσοποίησης έχουν ελαττώσει κατά πολύ τον επιπολασμό της μόλυνσης με HBV σε έμβρυα, παιδιά και εφήβους σε πολλές χώρες. Η χρησιμοποίηση του εμβολίου μπορεί να έχει μετριάσει την εμφάνιση νέων λοιμώξεων, ωστόσο δεν είναι δυνατή η εξάλειψη της νόσου σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη (193). Εξού και τα επίπεδα χρόνιας ηπατίτιδας B σε χρήστες τοξικών ουσιών, άτομα αυξημένου κινδύνου λόγω σεξουαλικών δραστηριοτήτων και σε μετανάστες από χώρες με υψηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου, παραμένουν υψηλά στις αναπτυγμένες χώρες (194).

2.5.2. Εγκεκριμένες αντι-HBV θεραπείες

Όπως αναφέρθηκε, το ανοσοποιητικό σύστημα συνήθως αντιμετωπίζει την οξεία λοίμωξη από τον HBV και άρα δεν χρειάζεται θεραπεία. Συνεπώς, η χρόνια μορφή της νόσου είναι εκείνη που απαιτεί θεραπεία με φάρμακα για την αντιμετώπισή της. Οι κύριοι στόχοι της θεραπείας έναντι του ιού είναι τόσο η μείωση του ιικού φορτίου όσο και η βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, με την επιδίωξη της παρεμπόδισης ή επιβράδυνσης της εξέλιξης της νόσου σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (195). Οι εγκεκριμένοι αντιϊκοί παράγοντες επηρεάζουν είτε την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, ή τον πολλαπλασιασμό του HBV (196). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, με βάση τη δομή και το μηχανισμό δράσης τους, στις ιντερφερόνες και στους νουκλεοτιδικούς αναστολείς της DNA πολυμεράσης.

Οι ιντερφερόνες κατά του HBV περιλαμβάνουν την ιντερφερόνη α (IFN- α) και την πεγκυλιωμένη της μορφή (peg-IFN α). Η IFN- α είναι πλειοτροπική κυτοκίνη με αντιϊκή, αντιπολλαπλασιαστική και ανοσορρυθμιστική δράση. Προκαλεί την αναστολή της μεταγραφής του γονιδιώματος του HBV, της συγκρότησης του νουκλεοκαψιδίου αλλά και της εξόδου των ιικών mRNA από τον πυρήνα. Επιπλέον,

προάγει την απόκριση των NK κυττάρων και των CD8+ T-λεμφοκυττάρων (197). Η IFN- α εγκρίθηκε ως θεραπεία στις αρχές της δεκαετίας του '90, με πλεονεκτήματα τη μικρή διάρκεια θεραπείας (6-12 μήνες) και την απουσία ανθεκτικών στελεχών και μειονεκτήματα τη συχνή παρεντερική χορήγηση (3 φορές εβδομαδιαίως) και ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ημικρανία και μυαλγία, γαστρεντερικές διαταραχές και κατάθλιψη (198). Η peg-IFN α διαθέτει αναβαθμισμένες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, αφού η πεγκυλίωση αυξάνει το χρόνο ημιζωής του φαρμάκου στο πλάσμα των ασθενών και δίνει τη δυνατότητα πιο αραιού δοσολογικού σχήματος (μία φορά την εβδομάδα υποδορίως) (199).

Οι νουκλεοτιδικοί αναστολείς του HBV είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Μέχρι τώρα έχουν εγκριθεί πέντε τέτοιες ενώσεις: το lamivudine, το adefovirdipivoxil, το entecavir, το telbivudine, και το tenofoviridisoproxilfumarate. Μοιάζουν με τα φυσικά νουκλεοτίδια και άρα μπορούν να ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA προκαλώντας τερματισμό της επιμήκυνσης και συνεπώς καταστολή του πολλαπλασιασμού του ιού (200). Έτσι, δρουν σαν συναγωνιστικοί αναστολείς της DNA πολυμεράσης, είτε στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, ή μετέπειτα στην DNA εξαρτώμενη σύνθεση DNA. Το κυριότερο τους μειονέκτημα είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στελεχών, κάτι που περιορίζει την κλινική τους χρησιμότητα. Διάφορες μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν ανάπτυξη αντοχής, συνήθως αλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί την περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης της DNA πολυμεράσης, προκαλώντας αλλαγές στην πρωτεΐνη και οδηγώντας σε αδυναμία δράσης των φαρμάκων (201).

2.5.3. Αναπτυσσόμενες θεραπείες έναντι του HBV

Ενώ οι θεραπείες που έχουμε στη διάθεσή μας έναντι της χρόνιας ηπατίτιδας B δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού και στη βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων, η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, ελαττώνει κατά πολύ τη δυνατότητα μακροχρόνιας χορήγησής τους. Επιπρόσθετα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δεν επηρεάζουν το σχηματισμό του cccDNA και άρα δεν βοηθούν την πλήρη απαλοιφή του ιού από το κύτταρο (202). Έτσι, οι μελέτες επικεντρώνονται σε ανάπτυξη νέων μοριακών στόχων.

Έτσι, μελετήθηκαν ακυλιωμένα πεπτίδια που προέρχονται από την pre-S1 περιοχή της μεγάλης πρωτεΐνης του φακέλου κι εμποδίζουν την αλληλεπίδραση του ιού με τον υποδοχέα του, όπως το Mygcludex-B (202), προκαλώντας αναστολή στην είσοδο του ιού. Τα silencingRNAs (siRNAs) αποτελούν μια άλλη εναλλακτική. Ο HBV, που αναπαράγεται μέσω RNA είναι ευαίσθητος στα siRNAs, τα οποία ενσωματώνονται στο γονιδίωμα προκαλώντας τερματισμό της μεταγραφικής διαδικασίας και άρα του πολλαπλασιασμού του ιού (203). Τέλος, η συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου και του ιικού φακέλου αποτελεί βασικό στάδιο του κύκλου του ιού, γι' αυτό μικρά μόρια που τα στοχεύουν έχουν αναπτυχθεί ήδη, όπως οι αρυλοδιϋδροπυριμιδίνες (204), τα φαινυλοπροπαναμίδια και οι αναστολείς γλυκοσιδάσης (205).

3. TO ENZYMO DDC (L-Dopa Decarboxylase)

3.1. Γενικά Στοιχεία

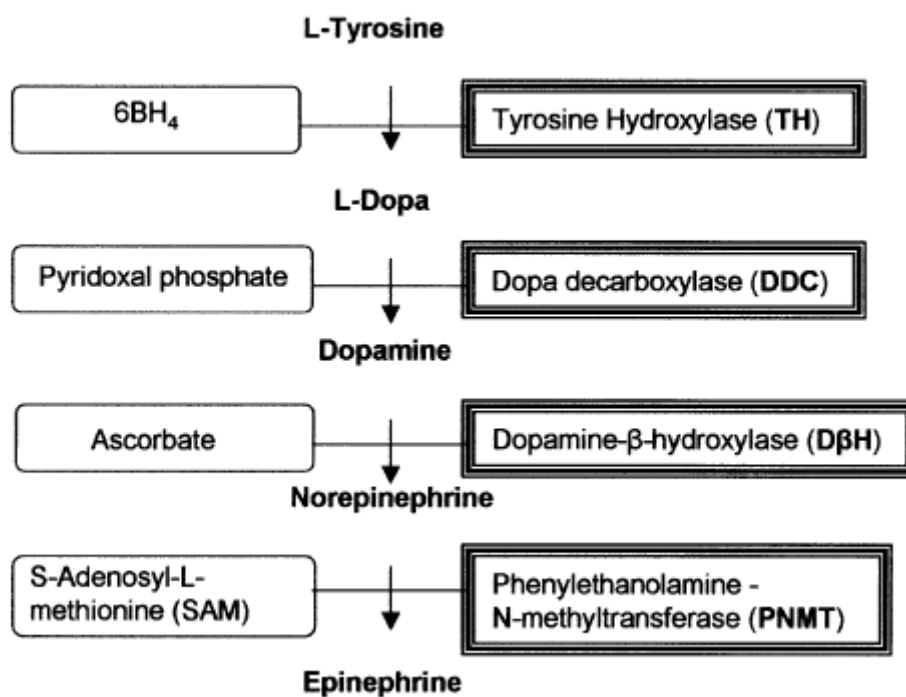
Το ένζυμο L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη αποκαρβοξυλάση (L-Dopa αποκαρβοξυλάση, L-Dopa decarboxylase ή DDC) απομονώθηκε για πρώτη φορά από νεφρό θηλαστικού (χοίρου) και ήταν το πρώτο ένζυμο που μελετήθηκε στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών τα θηλαστικά (206).

Το βιοχημικό μονοπάτι περιλαμβάνει: α) την υδροξυλίωση της τυροσίνης, από το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase ή TH), που αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο στο μεταβολικό μονοπάτι σχηματισμού της ντοπαμίνης, σε L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη (L-Dopa) β) την αποκαρβοξυλίωση της L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνης, από την αποκαρβοξυλάση της L-Dopa (L-Dopa decarboxylase ή DDC), σε ντοπαμίνη, γ) την υδροξυλίωση της ντοπαμίνης, από την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (dopamine β-hydroxylase ή DBH), σε νορεπινεφρίνη (ή νοραδρεναλίνη) και τέλος δ) την τροποποίηση της νορεπινεφρίνης, από το ένζυμο φαινυλαιθανολαμιν-N-μέθυλο-τρανφεράση (phenylethanolamine N-methyltransferase ή PNMT), σε επινεφρίνη (ή αδρεναλίνη). Η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η επινεφρίνη υπάγονται στις κατεχολαμίνες.

Έχει αναφερθεί ότι η DDC συμμετέχει και στη βιοσύνθεση της 5-υδροξυτρυπταμίνης (ή σεροτονίνης, serotonin ή 5-HT) (207, 208). Το μονοπάτι αυτό

περιλαμβάνει: α) την υδροξυλίωση της τρυπτοφάνης, από το ένζυμο υδροξυλάση της τρυπτοφάνης (Tryptophan Hydroxylase), σε 5-υδροξυ-τρυπτοφάνη και β) την αποκαρβοξυλίωση της 5-υδροξυ-τρυπτοφάνης, από το ένζυμο L-Dopa αποκαρβοξυλάση, σε 5-υδροξυ-τρυπταμίνη.

Στα θηλαστικά, το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa θεωρείται ότι είναι το μοναδικό που εμπλέκεται στην σύνθεση αμινών, με αποκαρβοξυλίωση των αρωματικών L-αμινοξέων L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη και L-τρυπτοφάνη. Οι αμίνες που παράγονται («αμίνες ίχνη», trace amines) αποτελούν ενδογενείς παράγοντες για τη ρύθμιση της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (209-211).



Εικόνα 8: Ο καταρράκτης βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Η υδροξυλάση τυροσίνης (TH) απαιτεί 6BH₄ (6R-L-ερυθρο-5,6,7,8 τετραϋδοπτερίνη) ως απαραίτητο συμπράγοντα για τη βιοσύνθεση της L-Dopa, η οποία στη παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης, μετατρέπεται από την L-Dopa decarboxylase (DDC) σε ντοπαμίνη. Αυτός ο μεταβολίτης χρησιμοποιείται από τη β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (DβH) στη παρουσία ασκορβικού για να σχηματιστεί νορεπινεφρίνη. Η μεθυλτρανσφεράση N φαινυλαιθανολαμίνης (Phenylethanolamine N- methyltransferase- PNMT) καταλύει ειδικά την αντίδραση προς επινεφρίνη στη παρουσία της S-αδενοσυλL-μεθειονίνης (SAM) (212).

3.2. Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά

Στα θηλαστικά, ο εντοπισμός του ενζύμου DDC αφορά τόσο ιστούς νευρικής προέλευσης, όπου εμπλέκεται στη βιολογική σύνθεση των μονοαμινονευροδιαβιβαστών, ντοπαμίνη και σεροτονίνη (213), όσο και ιστούς μη νευρικής προέλευσης, όπου δείχνει ενεργότητα μη ειδικής αποκαρβοξυλάσης και μέχρι στιγμής ο βιολογικός της ρόλος παραμένει άγνωστος (214).

3.2.1. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ

Οι μελέτες για την ανίχνευση της DDC στο κεντρικό νευρικό σύστημα, επικεντρώνονται κυρίως σε εγκέφαλο ανθρώπου και αρουραίου. Η ύπαρξη του ενζύμου σε ντοπαμινεργικούς και σεροτονινεργικούς νευρώνες επιβεβαιώθηκε με ποικίλες πειραματικές μεθόδους, όπως μέτρηση ενεργότητας (215), ανοσοϊστοχημεία (216) και *in situ* υβριδοποίηση (217). Στα θηλαστικά, η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη παίρνουν μέρος σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Η δράση της σεροτονίνης συνδέεται με τον ύπνο, τον πόνο, τη διάθεση, τη μάθηση και τη μνήμη, ενώ η ντοπαμίνη σχετίζεται με μηχανισμούς παθογένεσης ψυχιατρικών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η σχιζοφρένεια (218), η νόσος του Parkinson (219) αλλά και οι εθιστικές τάσεις για ναρκωτικές ουσίες, όπως η κοκαΐνη (220).

Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση εμφανίζει υψηλή ενεργότητα στο ΚΝΣ, συγκεκριμένα στον υποθάλαμο, στην επίφυση, στο ραβδωτό σώμα, όπου περικλείεται στις νευρικές απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων, στον υπομέλανα τόπο, στον οσφρητικό βολβό και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα (221). Η παρουσία και δράση της DDC δείχνει να παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση των αντίστοιχων φυσιολογικών διαδικασιών στα συστήματα αυτά, ενώ είναι απαραίτητη στους νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού, για τον σχηματισμό της ντοπαμίνης, αφού μόνο η L-Dopa είναι ικανή να περάσει από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε αντίθεση με τη ντοπαμίνη. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις για την εντοπισμό του ενζύμου σε νευρικά κύτταρα (D cells) που δεν διαθέτουν τα ένζυμα υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) (222) και πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa σε ασθενείς με τη νόσο του Parkinson (223). Τέλος, η DDC έχει βρεθεί σε πληθώρα νευρώνων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, όπου δεν παρατηρείται

σύνθεση ή αποθήκευση σεροτονίνης και ντοπαμίνης ή των παραγώγων της ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη (222). Στους νευρώνες αυτούς, το ένζυμο ενδεχομένως χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την τυροσίνη μετασχηματίζοντάς τη σε τυραμίνη, που πιθανόν δρα σαν νευροδιαβιβαστής (224).

3.2.2. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης σε περιφερικούς ιστούς

Υψηλή ενεργότητα του ενζύμου DDC εντοπίστηκε και στους περιφερικούς ιστούς. Συγκεκριμένα σε ήπαρ, πάγκρεας, σπλήνα, νεφρό, στομάχι, πνεύμονες, σιελογόνους αδένες, αλλά και σε ενδοθηλιακά κύτταρα που επικαλύπτουν αιμοφόρα αγγεία, όπου φαίνεται να χρησιμοποιεί σαν υποστρώματα την L-Dopa και την 5-HTP (225-227). Συνεπώς, το ένζυμο εντοπίζεται σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα (228). Πολλά από τα κύτταρα της περιφέρειας που φέρουν τη DDC είναι μέρος του συστήματος Πρόσληψης και Αποκαρβοξυλίωσης Πρόδρομων Αμινών (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation system, APUD) (229). Τέτοια κύτταρα εντοπίζονται στο έντερο και σε άλλα όργανα και παράγουν πεπτιδικές ορμονες και αμίνες. Έπειτα από πρόσληψη πρόδρομων μορίων βιογενών αμινών, όπως η L-Dopa και η 5HTP, τις αποκαρβοξυλιώνουν και οδηγούν τα προϊόντα προς αποθήκευση σε εκκριτικά κυστίδια. Η παρουσία της DDC και ενός μεταφορέα μονοαμινών, που είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά της ντοπαμίνης και τη σεροτονίνης σε εκκριτικά κυστίδια, παίζουν βασικό ρόλο στη δράση τους (230). Η υψηλότερη ενεργότητα και παρουσία του της DDC, σχετικά με τους υπόλοιπους περιφερικούς ιστούς, εντοπίζεται στο ήπαρ και στον νεφρό, όπου δεν βιοσυντίθενται μονοαμίνες. Παρότι ο λόγος ανίχνευσης του ενζύμου εκεί δεν είναι γνωστός, ενδεχομένως να συμμετέχει στο μεταβολισμό άλλων αρωματικών αμινοξέων (227).

3.3. Χαρακτηριστικά του ενζύμου

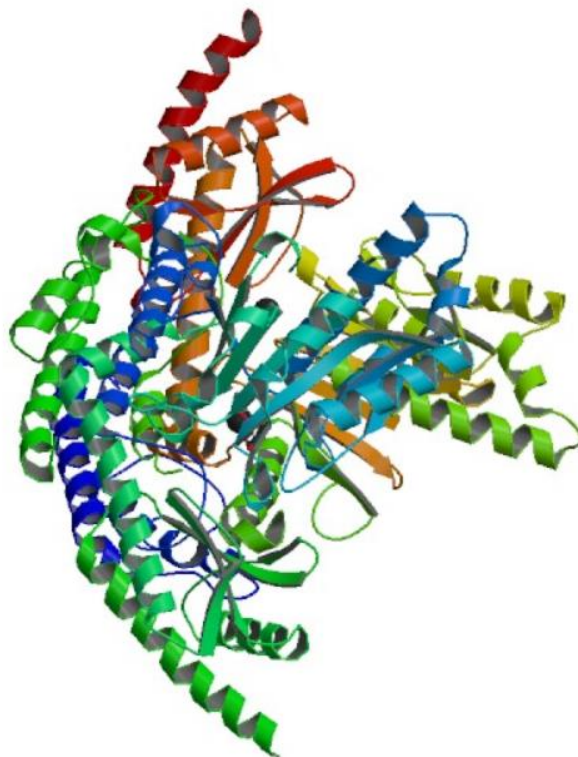
3.3.1. Προσδιορισμός της μοριακής μάζας του ενζύμου

Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας της DDC αποτέλεσε περίπλοκο ζήτημα και έδωσε μια σειρά από αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αρχικά, η ομάδα που απομόνωσε το ένζυμο από νεφρό χοίρου θεώρησε πως περιλαμβάνει τρεις υπομονάδες με μοριακές μάζες 57.000, 40.000 και 21.000 Da (208), δεδομένα που βρήκαν σύμφωνους κι άλλους ερευνητές (231). Ωστόσο, δύο ξεχωριστές ομάδες (207, 232), από τη μέλετη

τους για το ένζυμο επίσης από νεφρό χοίρου, πρότειναν ότι συγκροτείται από δύο διακριτές υπομονάδες με μοριακή μάζα 50.000 και 40.000 Da. Μετέπειτα εργασίες θεώρησαν ότι το μόριο είναι ομοδιμερές, αφού το ένζυμο που απομονώθηκε από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα (233, 234) και νεφρό (235) εμφάνισε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μια πρωτεϊνική ζώνη μοριακής μάζας περίπου 50.000 Da. Με την ίδια μέθοδο η μοριακή μάζα της υπομονάδας προσδιορίστηκε στα 50.000 Da για ένζυμο που απομονώθηκε από ήπαρ και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου (236). Η απομόνωση της DDC από εγκέφαλο βοός με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος, ομοίως, παρουσίασε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μία πρωτεϊνική ζώνη μοριακής μάζας 50.000 Da (237). Ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας για την υπομονάδα του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό αρουραίου έδειξε 48.000 Da (238), ενώ για την υπομονάδα του ενζύμου που απομονώθηκε από ιστούς βοός 56.000 Da (239) και στα 50.000 Da (240).

Άλλοι ερευνητές (241, 242), κάνοντας ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό χοίρου, υπολόγισαν τη μοριακή μάζα της υπομονάδας στα 53.858 Da και 54.000 Da, αντίστοιχα, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με τη μοριακή μάζα της αμινοξικής αλληλουχίας που αντιστοιχούν στα cDNA που απομονώθηκαν προηγουμένως από διάφορους ιστούς.

Σήμερα το ένζυμο DDC θεωρείται ομοδιμερές μόριο με μοριακή μάζα υπομονάδας 50.000 – 55.000 Da (μοριακή μάζα ολοενζύμου 100.000 – 110.00 Da). Τα προηγούμενα αντιφατικά αποτελέσματα αποδόθηκαν σε ελλιπή καθαρισμό ή/και παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης του ενζύμου. Η συγκρότηση του ενζύμου σε ομοδιμερές επιβεβαιώθηκε και με μελέτες κρυσταλλογραφίας σε ανασυνδυασμένη ενζυμική πρωτεΐνη και διευκόλυναν την περαιτέρω έρευνα πάνω στα δομικά του χαρακτηριστικά (243). Συμπερασματικά, η DDC είναι δομικά και λειτουργικά διμερές, ενώ το μονομερές της αποτελεί την ανενεργή μορφή του ενζύμου (244).



Εικόνα 9: Κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης L-Dopa decarboxylase ή DDC στην μορφή αποενζύμου/αποπρωτεΐνης (245).

3.3.2. Υποστρωματική εξειδίκευση του ενζύμου

Μια βασική απορία που υπάρχει για το ένζυμο, αφορά την υποστρωματική του εξειδίκευση. Τα δεδομένα πολλών ερευνητικών ομάδων κατέληξαν σε συμφωνία για την ικανότητα του ενζύμου που απομονώνεται από ιστούς θηλαστικών, να αποκαρβοξυλιώνει τόσο την L-Dopa, όσο και την 5-υδροξυ-τροπτοφάνη, παράγοντας αντίστοιχα ντοπαμίνη και σεροτονίνη (207, 246).

Ακόμα και σήμερα, υπάρχουν διαφωνίες στην επιστημονική κοινότητα, όσον αφορά τη μοναδικότητα του ενζύμου που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa και της 5-HTP. Πολλές ερευνητικές ομάδες υποστηρίζουν ότι τα ένζυμα που ευθύνονται για την αποκαρβοξυλίωση των δύο υποστρωμάτων είναι διαφορετικά. Σε πειράματα διαπίδυσης ομογενοποιημάτος εγκεφάλου που έγιναν παρουσία και απουσία πυριδοξίνης, παρόλο που η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της 5-HTP χάνεται σχεδόν ολοκληρωτικά, η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa μένει σταθερή, κάτι που δείχνει διαφορετική ευαισθησία στην παρουσία πυριδοξίνης (247).

Από την άλλη, η ενεργότητα της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης ήταν πιο ευαίσθητη στην έλλειψη 5-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) σε σχέση με την ενεργότητα της 5-HTP αποκαρβοξυλάσης στους ίδιους ιστούς, όπως παρατήρησε μια άλλη ερευνητική ομάδα (248). Αν η υπόθεση της ύπαρξης ενός και μόνο ενζύμου ισχύει, τότε η αναλογία των ενζυμικών ενεργοτήτων ως προς την L-Dopa και την 5-HTP θα έπρεπε να είναι παρόμοια σε όλους τους ιστούς. Παρόλα αυτά, η αναλογία της αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP στους ιστούς είναι μεταβαλλόμενη (227, 247). Επιπλέον, στον εγκέφαλο, η ενεργότητα του ενζύμου ως προς την αποκαρβοξυλίωση της 5-HTP είναι ισομερώς κατανομημένη μεταξύ διαλυτού και σωματιδιακού (particulate) κλάσματος, αντίθετα με την αποκαρβοξυλίωση ως προς την L-Dopa, που είναι κατά κύριο λόγο διαλυτή (249). Αυτή η ανισότιμη υποκυτταρική κατανομή της ενεργότητας αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και 5-HTP έρχεται να επιβεβαιώσει την ύπαρξη ισοενζύμων της DDC στον εγκέφαλο (250, 251).

Αντίθετα με τα παραπάνω, είχε προταθεί παλιότερα η ύπαρξη ενός μοναδικού ενζύμου με μόνο ένα καταλυτικό κέντρο, όμως με ξεχωριστές θέσεις δέσμησης για τα δύο υποστρώματα (252). Επιπλέον, τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς, όπως νεφρό χοίρου (253), νεφρό ινδικού χοιριδίου (254), νεφρό αρουραίου (255), ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα (256) και εγκέφαλο βοός (257) μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν και τα δύο αυτά υποστρώματα. Η υπόθεση του «μοναδικού ενζύμου» ενισχύθηκε με έμμεσες ενδείξεις από *in vivo* μελέτες δύο ερευνητικών ομάδων (258, 259). Οι Dairman et al. (1975) έδειξαν ότι στον εγκέφαλο γάτας, αγωγή με 6-υδροξυνοτοπαμίνη, φαρμακευτική ένωση που καταστρέφει επιλεκτικά κατεχολαμινεργικούς νευρώνες, προκαλεί ανάλογη μείωση στις ενεργότητες αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP. Παρόμοια απώλεια των ενζυμικών ενεργοτήτων παρατηρήθηκε και στο νωτιαίο μυελό αρουραίων, έπειτα από λήψη ενδοεγκεφαλικής αγωγής με την σεροτονική νευροτοξίνη 5,7-διυδροξυ-τροπταμίνη (259).

Περισσότερες ενδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μοναδικού ενζύμου, προέκυψαν από μελέτες που χρησιμοποίησαν τεχνικές μοριακής βιολογίας. Με πειράματα υβριδοποίησης και τη χρήση cDNA ιχνηθέτη συμπληρωματικού ως προς το mRNA της DDC του επινεφριδίου βοός, αποδείχτηκε η ύπαρξη ενός μοναδικού mRNA

σε ήπαρ, νεφρό και επινεφρίδιο βοός, σε ήπαρ, εγκέφαλο και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου, αλλά και σε ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα (260). Η ανασυνδυνασμένη ανθρώπινη DDC αποκαρβοξυλιώνει τόσο την 5-HTP σε σεροτονίνη όσο και την L-Dopa σε ντοπαμίνη, κάτι που αποτελεί ένδειξη ότι ένα μοναδικό ένζυμο μπορεί να αποκαρβοξυλιώνει και τα δύο υποστρώματα (261). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και για το ανασυνδυνασμένο ένζυμο από αρουραίο (262). Η ανάλυση με ιχνηθέτες που αντιστοιχούν στην πλήρη κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA της DDC από φαιοχρωμοκύτωμα (S1 mapping analysis), έδειξε πως η πρωτοταγής αλληλουχία της DDC σε νευρικούς και μη-νευρικούς ιστούς είναι πανομοιότυπη (263). Το πλήρους μήκους ανθρώπινο cDNA που κωδικοποιεί τη DDC, απομονώθηκε από ανθρώπινο πλακούντα και κλωνοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυνασμένου ανθρώπινου ενζύμου (264). Η ενεργότητα της ανασυνδυνασμένης ανθρώπινης DDC ως προς την L-Dopa αναστέλλεται από την 5-HTP, κάτι που υποδεικνύει ότι η ανασυνδυνασμένη DDC την χρησιμοποιεί ως εναλλακτικό υπόστρωμα. Συνεπώς, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι η αποκαρβοξυλίωση και για τα δύο υποστρώματα πραγματοποιείται ενζυμικά από μία πρωτεΐνη που εκφράζεται από ένα γονίδιο και ένα μήνυμα.

3.3.3. Χημικές ουσίες που επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου

Υπάρχουν ουσίες που αναστέλλουν την ενεργότητα της DDC, όπως η καρβιντόπα (carbidopa), μια ένωση που χορηγείται παράλληλα με την L-Dopa στο θεραπευτικό σχήμα για την ασθένεια του Parkinson, το L-3-(3,4 διυδροξυφαινυλ)-2-υδραζινμεθυλπροπιονικό οξύ (α -MDH), που αποτελεί συναγωνιστικό αναστολέα του ενζύμου (265), η 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη (NSD-1015) (266), η α -μονοφλουορο-μέθυλ-Dopa (MFMD) (267), η ουσία βενσεραζίδη (benzerazide), η οποία έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να ελαττώνει την ενεργότητα του ενζύμου DDC στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου του αρουραίου (268) και η α -μεθυλ-Dopa (AMD) (269). Επιπλέον, φαίνεται ότι οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού αναστέλλουν την DDC με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο επώασης και τη συγκέντρωσή τους (270).

3.4. Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης

Ο προδιορισμός ολόκληρης της αλληλουχίας του γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης του ανθρώπου έχει πραγματοποιηθεί από νευρικού τύπου ιστό, συγκεκριμένα φαιοχρωμοκύτωμα (271), αλλά και από μη-νευρικού τύπου ιστό, από ανθρώπινο ήπαρ (233). Το ανθρώπινο γονίδιο της DDC διαθέτει 15 εξώνια και έχει μέγεθος 85 kb (271). Σύμφωνα με τους Bruneau et al., (1990), ένα αντίγραφο εντοπίζεται στο απλοειδές γονιδίωμα και ειδικότερα στο χρωμόσωμα 7 στη χρωμοσωμική ζώνη 7p12.1 – p12.3, κοντά στον γενετικό τόπο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης επβεβαίωσαν τη θέση αυτή (272), ενώ μία άλλη ερευνητική ομάδα με ανάλογα πειράματα, εντόπισε το γονίδιο στο χρωμόσωμα 7, στη θέση p11 (273). Το μέγεθος των εξωνίων κυμαίνεται από 20 bp έως 400 bp, ενώ το μέγεθος των εσωνίων από 1 kb έως 17,7 kb.

3.4.1. Δομή του γονιδίου – μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την L-Dopa αποκαρβοξυλάση στον άνθρωπο έχει απομονωθεί, κλωνοποιηθεί και η αλληλουχία του έχει προσδιοριστεί πλήρως (274). Περιέχει 15 εξώνια, με το σημείο έναρξης της μετάφρασης να βρίσκεται στο δεύτερο εξώνιο και το σημείο λήξης στο δέκατο τέταρτο εξώνιο. Στο συγκεκριμένο γονίδιο ανιχνεύτηκαν κάποιες διαφορές στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (233), που φαίνεται να δημιουργούνται από εναλλακτική συρραφή στο σημείο. Η επίδραση διαφορετικών υποκινητών επάγει την εναλλακτική συρραφή και οδηγεί στην σύνθεση δύο ξεχωριστών τύπων mRNA. Ανάλογα με τον ιστό, το πρώτο εξώνιο διαφέρει και καθορίζει τον τύπο του μεταγράφου του γονιδίου, σε νευρικό και μη-νευρικό (233). Ειδικότερα, το μετάγραφο νευρικού τύπου φέρει σαν πρώτο εξώνιο το N1, με απόσταση 17,7 kb από το δεύτερο εξώνιο και μήκος 83 bp, ενώ το μετάγραφο μη-νευρικού τύπου φέρει σαν πρώτο εξώνιο το L1, με απόσταση 22 kb από το δεύτερο εξώνιο και μήκος 200 bp. Πειράματα *in situ* υβριδοποίησης έδειξαν ότι ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για την έκφραση του γονιδίου, με ιστοειδικό τρόπο (275).

Όπως αναφέρθηκε, η κατανομή των δύο τύπων mRNA ακολουθεί ένα πρότυπο ιστοειδικότητας. Για παράδειγμα, το ήπαρ φέρει μόνο μη-νευρικού τύπου μετάγραφο,

ενώ ο εγκέφαλος, τα επινεφρίδια και νεοπλασίες που σχετίζονται με υπερπαραγωγή κατεχολαμινών παράγουν το νευρικού τύπου mRNA. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο πως στο νεφρό και στον πλακούντα τα δύο είδη mRNA συνυπάρχουν, χωρίς να είναι γνωστή η αιτιολογία (233, 276), ενώ πρόσφατα δεδομένα έδειξαν πως περιφερικά ανθρώπινα λευκοκύτταρα, που δεν έχουν νευρική προέλευση, εκφράζουν τα νευρικά και μη νευρικά μετάγραφα της DDC (277). Συνεπώς, άγνωστη παραμένει η λειτουργική σημασία της ταυτόχρονης έκφρασης των δύο τύπων μεταγράφων, ενώ η πεποίθηση πως κάθε είδος ιστού εκφράζει αποκλειστικά μόνο έναν τύπο mRNA της DDC απορρίφθηκε (276, 277).

Πολλοί παράγοντες φαίνεται να εμπλέκονται στην έκφραση του mRNA της DDC, χωρίς να είναι γνωστό ακόμα, αν πρόκειται για ιστοειδική ιδιότητα. Η ρύθμιση της έκφρασης για το γονίδιο της DDC πραγματοποιείται μέσω των ειδικών αναστολέων MAO (Monoamine oxidase inhibitors) (278). Μη αντιστρεπτοί αναστολείς MAO τύπου B, όπως είναι το (-)-διπρενύλιο, η παργουλίνη και ο MDL 72,974 A (278, 279), η διξαμεθασόνη (280), η διζοκιλίνη (281), η ρεσερπίνη (282), η ιντερλευκίνη-1β και η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) (283), ο NSD-1015 (284), ανταγωνιστές των ντοπαμινεργικών υποδοχέων (285) και η αντι-ικκή ουσία αμανταδίνη (286) φαίνεται πως αυξάνουν τα επίπεδα mRNA της DDC. Απεναντίας, οι αμφεταμίνες και η βιγκαμπατρίνη (287), καθώς επίσης και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) (288) φαίνεται να αναστέλλουν την έκφραση του mRNA του ενζύμου.

Εκτενής έρευνα πάνω στο ανθρώπινο γονίδιο της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης υπέδειξε πως εναλλακτικό μάτισμα γίνεται και μέσα στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου (289). Έτσι παράγονται δύο ισομορφές του ενζύμου, μία που προέρχεται από το πλήρες μετάγραφο, δρα ενζυμικά σαν αποκαρβοξυλάση της L-Dopa και της 5-HTP και συμβολίζεται ως DDC480 και μία που προέρχεται από το μετάγραφο με έλλειψη του εξωνίου 3, που δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα και συμβολίζεται ως DDC442, με 480 και 442 να υποδηλώνουν αντίστοιχα τον αριθμό αμινοξέων των δύο ισομορφών του ενζύμου (289). Άλλες μελέτες, επίσης αναφέρουν την ανίχνευση δύο διαφορετικών τύπων mRNA του ενζύμου σε νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς. Το πρώτο μετάγραφο εκφράζει το πλήρους μήκους ένζυμο, ενώ το δεύτερο μετάγραφο, από το οποίο απουσιάζει το εξώνιο 3, κωδικοποιεί μία ανενεργή ισομορφή, εξαιτίας

διαφορετικής υποστρωματικής εξειδίκευσης ή συγγένειας για συμπαράγοντα (290). Παρ'όλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα δεν φαίνεται να επιβεβαιώνουν την πρόταση αυτή, αφού παρατηρήθηκε έκφραση του νευρικού τύπου μεταγράφου του ενζύμου στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 (human histiocyte lymphoma), από την οποία έλλειπε το εξόνιο 3, ωστόσο κωδικοποιούσε την ενεργή πρωτεϊνική ισομορφή. Η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε στα 4,2 mUnits/mg (291). Το νευρικού τύπου μετάγραφο, που δεν φέρει το εξόνιο 3, έχει βρεθεί και σε ανθρώπινα T λεμφοκύτταρα και πιστεύεται ότι παίρνει μέρος στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης (277). Προϊόντα εναλλακτικής συρραφής έχουν ανιχνευθεί και στο πάγκρεας και συσχετίστηκαν με το Αυτοάνοσο Πολυενδοκρινικό Σύνδρομο τύπου I (APS I) (292).

Δεδομένα που δημοσιεύθηκαν πρόσφατα υποδεικνύουν την παρουσία ενός ακόμα μικρότερου μεταγράφου της DDC στον ανθρώπινο πλακούντα, με μήκος 1,8 kb. Έπειτα από κλωνοποίηση αυτού του εναλλακτικού μεταγράφου, φάνηκε πως δεν φέρει τα εξόνια 10 έως 15, ενώ περιέχει ένα εναλλακτικό εξόνιο 10 που εντοπίζεται εντός του εσωνίου 9. Το μετάγραφο αυτό φέρει το νευρικού τύπου εξόνιο 1 και εκφράζει ένα μικρότερο πολυπεπτίδιο 338 αμινοξέων, απ'τα οποία τα πρώτα 315 είναι όμοια με αυτά της DDC. Η ισομορφή ονομάστηκε Alt-DDC και βρέθηκε σε ανθρώπινο νεφρό, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα ενεργότητας (293).

Ο κύριος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της αποκαρβοξυλάσης της L-Dopa θεωρείται η φωσφορυλίωση. Η πρόταση αυτή στηρίχθηκε σε μια σειρά παρατηρήσεων, όπως τον εντοπισμό μιας σειράς μοτίβων φωσφορυλίωσης από cAMP-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (PKA), από πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), από ασβέστιοκαλμοντουλίνη εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες II (Ca-CM PK II) και από κατευθυνόμενες από προλίνη πρωτεϊνικές κινάσες (proline-directed protein kinases) στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης (294, 295). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της φωσφορυλίωσης του ενζύμου οδηγεί σε ενίσχυση της ενζυμικής του ενεργότητας, ενώ υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η PKA φωσφορυλιώνει περισσότερες από μία θέσεις της DDC (296). Χορήγηση φορσκολίνης, που προκαλεί ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και αύξηση των επιπέδων του κυκλικού AMP (cAMP), αλλά και χορήγηση 8-Bromo-cAMP, ενός ενεργοποιητή της PKA, ενισχύουν την ενεργότητα

του ενζύμου στον εγκέφαλο ποντικού (296). Επίσης, χορήγηση φορβολικών εστέρων, που ενεργοποιούν την PKC, αυξάνουν παροδικά τη δραστηριότητα του ενζύμου (297).

Η φωσφορυλίωση της PKA, που οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου, ρυθμίζεται από τους D2 προσυναπτικούς υποδοχείς της ντοπαμίνης. Όταν ανταγωνιστές δεσμευτούν στους D2 υποδοχείς, γίνεται ανάκληση της καταστολής της αδενυλικής κυκλάσης και προκαλεί αύξηση των επιπέδων cAMP. Το cAMP οδηγεί σε φωσφορυλίωση της PKA που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την DDC, αυξάνοντας τελικά την ενεργότητά της (298).

3.5. Συσχέτιση της μεταβολικής και σηματοδοτικής οδού της Ντοπαμίνης με τον ιό HCV.

Η ντοπαμίνη που εκφράζεται σε περιφερικούς ιστούς έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την εξέλιξη ορισμένων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) (299-302). Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι και η ισταμίνη εμπλέκεται στην είσοδο του HCV (303) και ο υποδοχέας της σεροτονίνης 2A έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας εισόδου HCV (304). Η αποτελεσματικότητα της ουσίας βασίζεται στην αναστολή της εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκύττωσης του ιού (305). Η προχλωροπρομαζίνη (PCZ), που είναι ανταγωνιστής για τον υποδοχέα 2 της ντοπαμίνης (D2R) και εγκεκριμένο φάρμακο κατά της ναυτίας, της έμεσης και του πονοκέφαλου, συμπτώματα συχνά σε άτομα μολυσμένα με ιούς της οικογένειας Flaviviridae, έχει παρατηρηθεί ότι έχει αντική δράση. Η PCZ ανήκει στις φαινοθειαζίνες των αντιψυχωτικών παραγόντων (306) φαίνεται να έχει δράση έναντι του HCV στοχεύοντας την ιική είσοδο στο κύτταρο (307). Μια ουσία με δομή που ομοιάζει με την PCZ, η χλωροπρομαζίνη, έχει αναφερθεί πως εμποδίζει την μέσω κλαθρίνης ενδοκύττωση του ιού HCV (308), στάδιο σημαντικό για την είσοδο των ιών που ανήκουν στην οικογένεια Flaviviridae (98, 308).

Μια επιπλέον συσχέτιση του HCV και της μεταβολικής οδού της ντοπαμίνης παρουσιάζεται μέσω των micro-RNAs και ειδικότερα μέσω του miRNA491, που έχει φανεί απ'τη μία πως προάγει την αντιγραφή του HCV και απ'την άλλη πως μετριάξει την έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) (309, 310). Έχει δειχθεί πως το

miRNA491 καταστέλλει το μονοπάτι PI3K-AKT με παράλληλη ενίσχυση της αντιγραφής του HCV, συμμετέχοντας έτσι στη ρύθμιση της αντιγραφής του (309). Νέα δεδομένα δείχνουν ότι το miR-491 μειώνει σημαντικά την έκφραση του DAT, ο οποίος παίρνει μέρος στη ρύθμιση των εξωκυττάρων επιπέδων της ντοπαμίνης (310), ενεργώντας στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και επιδρώντας στη νευρωνική μεταβίβαση της ντοπαμίνης. Σε βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε τα τελικά αποτελέσματά έδειξαν πως το miR-491 μείωσε τη νευρωνική επαναπρόσληψη ντοπαμίνης κατά 53% (311). Συνεπώς, το miRNA 491 βρέθηκε πως ρυθμίζει τον μεταφορέα ντοπαμίνης, ενώ τα δεδομένα της μελέτης υπέδειξαν πως τα miRNAs παίζουν καίριο ρόλο στην έκφραση και τη λειτουργία του DAT, ενός μορίου-κλειδιού στη σηματοδότηση της ντοπαμίνης (311). Ωστόσο, ο ρόλος της DDC στις ιογενείς λοιμώξεις δεν έχει ακόμη περιγραφεί πλήρως.

3.6. Συσχέτιση της DDC με παράγοντες της υποξίας

Φαίνεται πως υπάρχει σύνδεση ανάμεσα στη DDC και σε παράγοντες υποξίας. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητο ένα βασικό επίπεδο λειτουργίας του HIF-2α για τη φυσιολογική έκφραση της DDC και της DbH σε προγονικά κύτταρα των συμπαθομιμητικών και πως απώλεια αυτής της λειτουργίας προκαλεί προβλήματα στη βιοσύνθεση κατεχολαμινών (312). Έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, μια ερευνητική ομάδα διαπίστωσε την πρόσδεση του HIF στον υποκινητή του γονιδίου της DDC, ο οποίος περιλαμβάνει δύο σχετικά με την υποξία στοιχεία (HRE-elements) (313). Δημιουργώντας συνθήκες υποξίας, οι ερευνητές παρατήρησαν σε κύτταρα χρωματοφίνης (chromaffin cells: MAH κύτταρα) ότι η χρόνια υποξία (2% O₂) επάγει τον HIF-2α, ωστόσο η έκφραση του περιοριστικού ενζύμου υδροξυλάση τυροσίνης καθώς και τα επίπεδα των κατεχολαμινών μένουν σταθερά (312). Επιπλέον, παρατήρησαν πως σε κύτταρα με έλλειψη στον HIF-2α μειώθηκαν δραματικά (5-12 φορές) τα επίπεδα της ντοπαμίνης και της νοραδρεναλίνης συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου, ακόμα και στη νορμοξία (21%), κάτι που συνδέθηκε με ελάττωση της έκφραση του ενζύμου DDC και της υδροξυλάσης β της ντοπαμίνης (DbH), όχι όμως της υδροξυλάσης τυροσίνης(312). Συμπερασματικά, φαίνεται πως ο HIF-2α είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του κατεχολαμινεργικού φαινοτύπου στα συμπαθοαδρενεργικά κύτταρα (312).

3.7. Το μονοπάτι PI3K-AKT και η εμπλοκή του στη μόλυνση με ιούς

Ένας τρόπος ελέγχου της ιικής αντιγραφής και παθογένειας είναι η εξάρτηση των ιών από τα κύτταρα που μολύνουν. Αντίθετα από άλλα παθογόνα, όπως τα βακτήρια και οι μύκητες που μπορούν να αναπτύσσονται αυτόνομα, οι ιοί εξαρτώνται πλήρως από τις κυτταρικές διεργασίες για τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά χρησιμοποιούν και την ενδοκυττάρια επικοινωνία (314, 315). Συγκεκριμένα, οι ιοί ελέγχουν τους καταρράκτες φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών προς όφελός τους. Παρ'όλα αυτά, απλά και μόνο η αύξηση της φωσφορυλίωσης για όλες τις κυτταρικές πρωτεΐνες, δεν είναι πλεονεκτική για τους ιούς, καθώς η δράση κάποιων κινασών του ξενιστή (και τα επακόλουθα γεγονότα φωσφορυλίωσης) γνωρίζουμε ότι ανταγωνίζονται την ιική αντιγραφή. Οι ιοί χρειάζονται ειδικότητα για την ενεργοποίηση κινασών και φωσφατασών του ξενιστή, καθώς μη ειδική προώθηση της φωσφορυλίωσης θα προκαλούσε αντιϊκή απόκριση

Άρα, καταλήγουμε στην ανάγκη των ιών να ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την αντιγραφή τους (316, 317) αλλά και στην ικανότητα να εμποδίζουν ή να αποφεύγουν αντικά σηματοδοτικά μονοπάτια (318). Έλεγχος στη δράση των κινασών μπορεί να πυροδοτήσει τη μετάφραση πρωτεϊνών (319), να ενισχύσει τη μεταβολική δραστηριότητα, να προκαλέσει κυτταρική διαίρεση και να μπλοκάρει την κυτταρική απόπτωση. Επίσης, πολλοί ιοί παράγουν ικές πρωτεΐνες που απαιτούν άμεση φωσφορυλίωση για να λειτουργήσουν σωστά, όμως δεν εκφράζουν κινάση που να την πραγματοποιεί και την στρατολογούν από τον ξενιστή τους (318). Το μονοπάτι PI3K-AKT έχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των κυτταρικών λειτουργιών, άρα είναι αναμενόμενο ο έλεγχος ενός τέτοιου σηματοδοτικού κόμβου να είναι ιδιαίτερα ωφέλιμος για έναν εισβολέα, εξαρτώμενο από κυτταρικές λειτουργίες, όπως οι ιοί.

4. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ PI3K-AKT

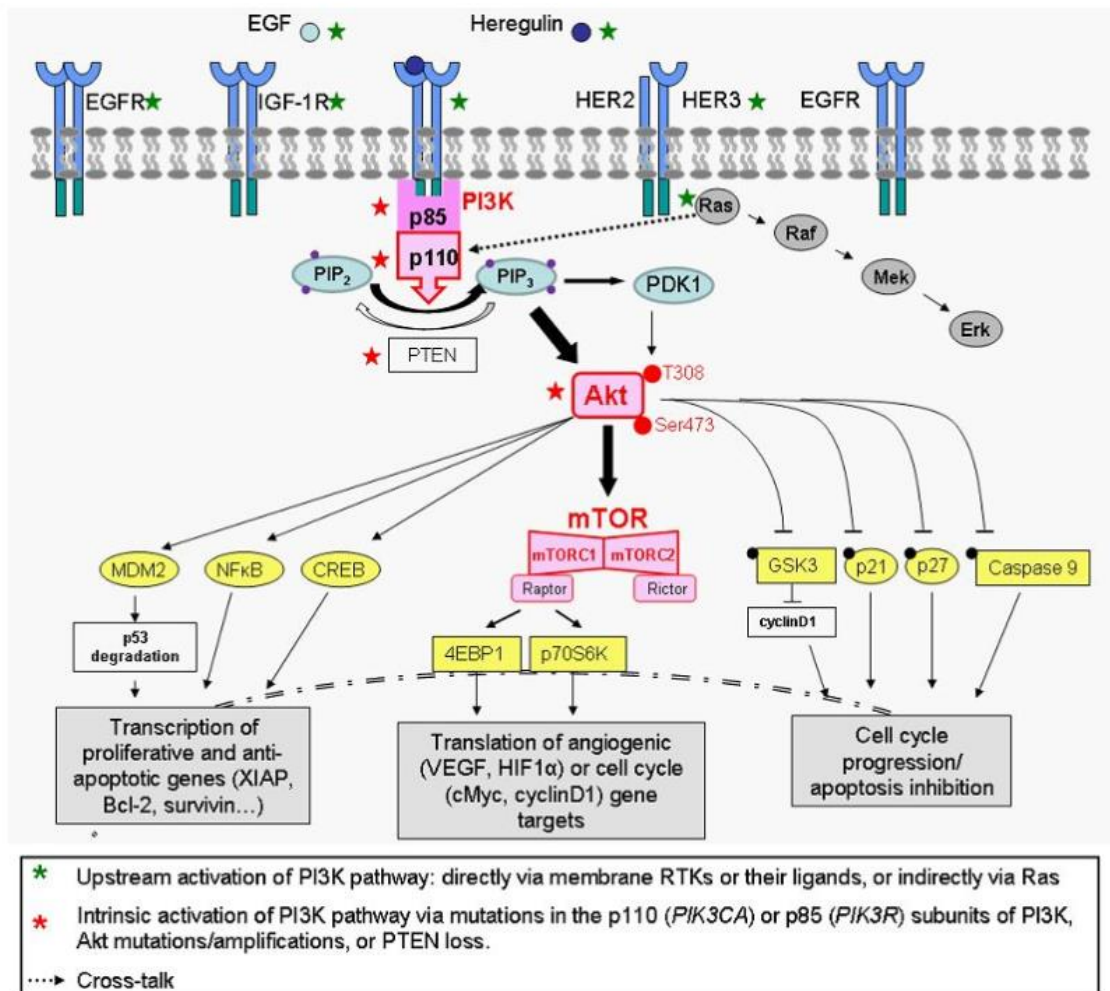
4.1. Γενικά στοιχεία

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K-AKT αποτελεί έναν κλασσικό καταρράκτη φωσφορυλίωσης, ο οποίος μέσω φωσφορυλίωσης τυροσίνης, λιπιδίων και σερίνης-θρεονίνης, μετατρέπει εξωτερικά μηνύματα σε ενδοκυτταρικά σήματα (Εικόνα 10).

Φυσιολογικά, η αρχή της σηματοδότησης μέσω της οδού γίνεται στην επιφάνεια του κυττάρου, με την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK) από έναν αυξητικό παράγοντα ή μια κυτοκίνη. Η διέγερση του RTK στρατολογεί και ενεργοποιεί την PI3K (phosphoinositide-3 kinase).

Η PI3K αποτελεί ένα ετεροδιμερές που διαθέτει μία καταλυτική p110 και μία ρυθμιστική p85 υπομονάδα. Η PI3K αναλαμβάνει τη μετατροπή της 5-διφωσφορικής 4-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP2) σε 4,5-τριφωσφορική 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP3) (320). Περιοχές της μεμβράνης πλούσιες σε PIP3 αποτελούν θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών που φέρουν περιοχή ομολογίας πλεκστρίνης (Pleckstrin Homology domain - PH domain), όπως η κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT, γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B - PKB). Η στρατολόγηση του ανενεργού AKT σε μικροεπικράτειες πλούσιες σε PIP3, προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία εκθέτει το βρόγχο ενεργοποίησης του AKT (321). Επιπλέον, σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης με περίσσεια PIP3 στρατολογείται και η εξαρτώμενη σε φωσφοϊνοσιτίδη πρωτεϊνική κινάση 1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1 - PDK1), που είναι η κινάση ενεργοποίησης του AKT (322). Η PDK1 φωσφορυλιώνει τη θρεονίνη 308 (Thr308) του εκτιθέμενου βρόγχου ενεργοποίησης του AKT, ενεργοποιώντας τον και προκαλώντας δεύτερη διαδοχική φωσφορυλίωση του AKT στη σερίνη 473 (Ser73) από μία κινάση που πιστεύεται πως είναι η mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), η οποία επίσης ενισχύει τη δραστηριότητα κινάσης (321, 323).

Η ενεργοποιημένη AKT πρωτεΐνη συμμετέχει στον έλεγχο σηματοδότησης ποικίλων μονοπατιών-κλειδιών που υποστηρίζουν πολλές και διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Ο σηματοδοτικός καταρράκτης PI3K/AKT ενισχύει την ανάπτυξη του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης αναστολέων κινασών του κυτταρικού κύκλου, όπως το p21, και μέσω της απενεργοποίησης παραγόντων μεταγραφής μπορούν να αναστείλουν την πορεία του κυτταρικού κύκλου και να ενισχύσουν την απόπτωση, όπως η Forkhead box protein O1 (FOXO1) (324). Επίσης, ο AKT δύναται να εμποδίσει τη δράση κατασταλτικών μεταβολικά κινασών, όπως η AMPK1, κι έτσι να οδηγήσει σε θετική ρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου (325).



Εικόνα 10: Το PI3K/AKT μονοπάτι. Η PI3K αποτελείται από τις p85 και p110 υπομονάδες που είναι προσδεμένες σε ένα ενεργό υποδοχέα κίνησης τυροσίνης (RTK - κλασικό παράδειγμα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR). Η p110 υπομονάδα φωσφορυλιώνει το PIP₂, με σκοπό τη δημιουργία PIP₃ που στρατολογεί το AKT στην μεμβράνη και προκαλεί δομικές αλλαγές στην κινάση PDK1 του AKT και στην AKT πρωτεΐνη. Η πρόσδεση του PIP₃ εξυπηρετεί την ελευθέρωση της επικράτειας ενεργοποίησης του AKT. Το ενεργό AKT θα φωσφορυλιώσει διάφορες πρωτεΐνες-στόχους, οι οποίες ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και αντιαποπτωτικούς παράγοντες (p27, p21, GSK3 και Caspase 9), τη μετάφραση (mTOR και οι ακόλουθοι τελεστές p70S6K και 4E-BP1) και αναστολή της απόπτωσης (ρύθμιση p53, NFκB και CREB) (326).

Η πρωτεΐνη AKT προωθεί και την κυτταρική μετάφραση, έπειτα από φωσφορυλίωση της GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) και ενεργοποίηση του mTORC1, ενός συμπλόκου κινάσης που οδηγεί σε ενεργοποίηση της ριβοσωμικής S6 κινάσης (ribosomal s6 kinase ή p70S6K) και αναστολή του μεταφραστικού καταστολέα eIF4E-BP1 (327). Ο AKT ενεργοποιείται από το mTORC1 με έμμεσο τρόπο, ενώ προκαλεί φωσφορυλίωση και καταστολή του συμπλόκου χαμαρτίνης

(Tuberous sclerosis 1 - TSC1) και τουμπερίνης (Tuberous sclerosis 2 - TSC2) (328). (329). Η καταστολή του TSC1/TSC2 επιτρέπει την Rheb-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση του συμπλόκου mTORC1.

Η δράση του AKT ανταγωνίζεται την αποπτωτική σηματοδότηση μέσω άμεσων δράσεων, όπως η καταστολή προαποπτωτικών παραγόντων (φωσφορλίωση και αναστολή του BAD (330), μέλους της οικογένειας BCL-2) αλλά και μέσα από πιο άμεσες δράσεις, όπως την ενεργοποίηση του μεταγραφικού πυρηνικού παράγοντα κάπα Β (NF-κΒ) (331) και τέλος, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, την απενεργοποίηση του FOXO1. Με ποικίλες δράσεις, που συμμετέχουν σε πολλά μονοπάτια φωσφοπρωτεϊνών και που σχετίζονται με διαφορετικές πλευρές της βασικής κυτταρικής λειτουργίας, ο σηματοδοτικός καταρράκτης PI3K/AKT είναι σημαντικός υποψήφιος για μια κινάση, η ενεργοποίηση της οποίας οδηγεί σε μία σειρά διαφορετικών αποτελεσμάτων, με τελικό στόχο την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης και την ενίσχυση του μεταβολισμού του κυττάρου.

4.2. Το PI3K/AKT στην αντιϊκή απόκριση

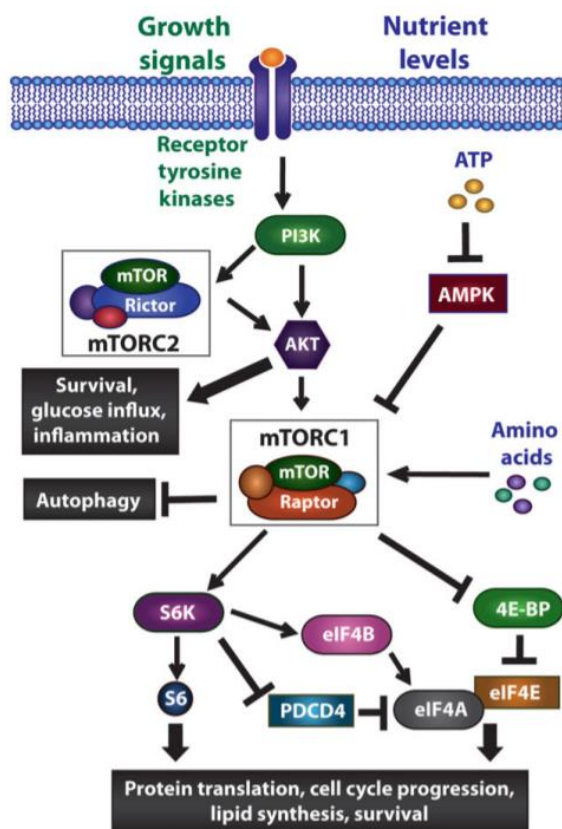
Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K είναι ένα βασικό μονοπάτι που ενεργοποιείται κατά την κυτταρική άμυνα έναντια σε παθογόνους εισβολείς. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, τα σήματα φωσφορλίωσης είναι ο άξονας της αντιϊκής απόκρισης. Τα μηνύματα σηματοδότησης μέσω του AKT φαίνεται ολοένα και περισσότερο να συμμετέχουν σε αυτή την απόκριση (332). Αυτό είναι ιδιαίτερα πρόσφορο για την απάντηση του ξενιστή στην ιντερφερόνη, όπου η PI3K/AKT σηματοδότηση προωθούν τη μετάφραση γονιδίων που διεγείρουν την ιντερφερόνη, μέσω δράσεων των mTOR και p70S6K, οι οποίοι πυροδοτούν τη μετάφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε ιντερφερόνη (333). Επίσης, ο AKT μέσω της συμμετοχής στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, παίζει ρόλο και στην προώθηση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών (334).

4.3. Το μονοπάτι PI3K/AKT και ο ιός HCV

Εκτενείς μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με θέμα τη συσχέτιση του HCV και του μονοπατιού PI3K/AKT. Ο HCV φαίνεται να ενισχύει τη κυτταρική επιβίωση μέσω ενεργοποίησης της mTOR κινάσης (335). Η ενεργοποίηση της πραγματοποιείται από

την ιική μη δομική πρωτεΐνη NS5A, που μπορεί να προσδένεται άμεσα με τον FKBP38, έναν αναστολέα του mTOR (336). Η σύνδεση του FKBP38 με τον mTORC1 παρεμποδίζεται από την πρόσδεση της NS5A, ενεργοποιώντας έτσι την δράση του mTORC1, οδηγώντας σε προώθηση της μετάφρασης και περιορισμού της απόπτωσης (337-339). Επίσης έχει δειχθεί ότι μετά τη μόλυνση με HCV, η μη δομική ιική πρωτεΐνη NS5A αλληλοεπιδρά άμεσα με την υπομονάδα p85 της PI3K, η οποία πυροδοτεί την δραστηριοποίησή της και την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT (340, 341). Επιπρόσθετα, η core πρωτεΐνη του HCV είναι ικανή να φωσφορυλιώνει τη σερίνη 473 του AKT, χωρίς σαφή επίδραση στη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 308, και άρα να εξασθενεί το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (342, 343).

Παρόλα αυτά, ήταν σχετικά άγνωστο πως η σχέση του HCV με το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT θα μπορούσε να επιδρά στην ιική αντιγραφή. Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν πως ο HCV ενεργοποιεί τον AKT γρήγορα και παροδικά κατά τα πρώτα στάδια της μόλυνσης με σκοπό να υποβοηθήσει την είσοδό του στα κύτταρα. (344). Σε άλλη μελέτη, το μονοπάτι PI3K/AKT, έχοντας σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση (345, 346), φαίνεται ότι είναι καθοριστικό για ένα βασικό χαρακτηριστικό της χρόνιας μόλυνσης με ηπατίτιδα C, που είναι η σταθερή και χαμηλών επιπέδων ιική αντιγραφή (347). Πιο συγκεκριμένα, οι ενεργότητες του PI3K και του AKT, καθώς και η δραστηριότητα του mTOR, παρατηρούνται αυξημένες σε κύτταρα που εκφράζουν το ρεπλικόνιο του HCV συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα ελέγχου και πως η αποσιώπηση του μονοπατιού PI3K/AKT οδηγεί σε αύξηση της αντιγραφής του HCV (347). Όμοια επίδραση διακρίνεται και σε αποσιώπηση του mTOR (347). Επιπλέον, έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR προωθεί τη φωσφορυλίωση της NS5A, προκαλώντας μειωμένη αντιγραφή του ιού HCV (347).



Εικόνα 11: Το PI3K/AKT/mTOR μονοπάτι. Το mTOR υπάρχει σε δύο σύμπλοκα: mTORC1 και mTORC2, που ρυθμίζονται ξεχωριστά κι έχουν διαφορετικά υποστρώματα. Ενώ το mTORC2 ρυθμίζεται από το PI3K, το mTORC1 ρυθμίζεται από σήματα αυξητικών παραγόντων, διαθεσιμότητα θρεπτικών (αμινοξέα) και επίπεδα κυτταρικής ενέργειας (ATP). Το αποτέλεσμα της θετικής ρύθμιση του μονοπατιού είναι η κυτταρική ανάπτυξη που περιλαμβάνει επιβίωση, αναστολή της αυτοφαγίας, πρωτεϊνική μετάφραση και προώθηση του κυτταρικού κύκλου (348).

Συνεχώς αυξάνονται τα δεδομένα που αποδεικνύουν μη φυσιολογική ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) καρκίνο. Όπως είναι γνωστό, η μόλυνση με ηπατίτιδα C είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία HCC και αφορά περίπου το 20% όλων των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικών καρκίνων (349). Νεότερες μελέτες προτείνουν πως η ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών πιθανόν να συμβάλλει στη χημειοαντίσταση στον HCC. Πρόσφατα, εις βάθος γονιδιακές αναλύσεις καρκίνου αποκάλυψαν ότι στοιχεία που ανήκουν στο μονοπάτι PI3K/AKT συχνά μεταλλάσσονται σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες, όπως σε HCC. Οι Sahin et al. έδειξαν ότι στο 45% των περιπτώσεων HCC, η φωσφορυλίωση του mTOR αλλά και η έκφραση του στόχου του p70S6k, είναι αυξημένες (350). Μια νεότερη μελέτη έδειξε πως το PI3K/mTOR/AKT μονοπάτι είναι

σημαντικά πιο ενεργοποιημένο σε μεγάλου βαθμού όγκους και συνδέεται με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με HCC. Επίσης οι Zhou et al. παρατήρησαν πως η φωσφορυλίωση των AKT και S6 συσχετίζεται ισχυρά με κακή πρόγνωση και χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης (351). Κάποιοι τρόποι απορρύθμισης του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR στον HCC περιλαμβάνουν μεταλλαγές βελτίωσης της ενεργότητας της PIK3CA ή της PIK3CB, της p110α ή p110β καταλυτικής υπομονάδας (352, 353), ή των 3 ισομορφών του AKT (κυρίως AKT1 και AKT2, ενώ οι AKT3 μεταλλαγές είναι πολύ σπάνιες) (354, 355).

Επιπλέον, διερευνήθηκε και ο ρόλος που παίζουν τα miRNAs στην αντιγραφή του HCV σε κύτταρα ηπατώματος. Με miRNA array ανάλυση μελετήθηκαν τα miRNAs, που η έκφρασή τους μεταβάλλεται κατά τη μόλυνση με HCV, και βρέθηκε το miR491 απ'τη μία να ρυθμίζεται αρνητικά, απ'την άλλη να ενισχύει την αντιγραφή του HCV τόσο σε κύτταρα με ρεπλικόνιο του ιού όσο και σε κύτταρα που μολύνθηκαν με τον ιό (309). Στη μελέτη αυτή, παρατήρησαν πως, με την επαγόμενη έκφραση του miRNA-491, δεν αυξάνεται ούτε η HCV IRES ενεργότητα, αλλά ούτε η κυτταρική αναπαραγωγή, που αποτελούν πιθανούς μηχανισμούς αύξησης του ιού (356). Περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι το miRNA-491 κατέστειλε το PI3K/AKT μονοπάτι, υποδεικνύοντας πως θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για την προώθηση της αντιγραφής του HCV από το miRNA 491.

Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα διαμολυσμένα (transfection) με miRNA-491, η φωσφορυλίωση του AKT βρέθηκε μειωμένη και με παραπάνω διερεύνηση δείχθηκε πως το miR-491 κατέστειλε συγκεκριμένα το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT. Με αναστολή της PI3K από τον ειδικό αναστολέα της LY294002, τα επίπεδα του RNA του ιού διπλασιάστηκαν σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, αλλά ήπια αύξηση του ιού παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το miRNA-491. Όταν κύτταρα που έφεραν το miR491 καλλιεργήθηκαν με τον αναστολέα LY294002, τα επίπεδα της αντιγραφής του HCV αυξήθηκαν σε βαθμό παρόμοιο με τα κύτταρα ελέγχου που καλλιεργήθηκαν επίσης με τον αναστολέα. Αφού δεν έχει παρατηρηθεί κάποια άλλη δράση του miRNA-491 μετά την καταστολή του μονοπατιού PI3K/AKT, υποστηρίζεται πως η αναστολή του μονοπατιού ευθύνεται για την ενίσχυση του RNA του HCV που παρατηρείται, από το miRNA-491 (309).

5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΝΟΡΜΟΞΙΑΣ

5.1. Γενικά στοιχεία

Η τάση του οξυγόνου μπορεί να επιδρά σημαντικά στην ική μετάδοση *in vitro* και πιθανόν *in vivo* (357). Γενικότερα, η υποξία μετριάζει τον πολλαπλασιασμό ιών που στοχεύουν φυσιολογικά ιστούς που εκτίθενται στο οξυγόνο του περιβάλλοντος και προάγει την αντιγραφή ιών που φυσιολογικά μολύνουν ιστούς που είναι εκτεθειμένοι σε χαμηλή τάση οξυγόνου (357). Κάποιοι ιοί, για να υποστηρίξουν τον πολλαπλασιασμό τους, μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τη μεταβολική λειτουργία των κυττάρων που προσβάλλουν, ελαττώνοντας τους ρυθμούς της κυτταρικής αναπνοής και άρα της κατανάλωσης οξυγόνου (357).

Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα μέχρι σήμερα, υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν την αμφίδρομη σχέση ανάμεσα στους ιούς και τα επίπεδα οξυγόνου των ιστών. Κατά τη μόλυνση ιστοκαλλιέργειας, όταν η τάση οξυγόνου είναι αντίστοιχη με την τάση σε φυσιολογικό επίπεδο *in vivo*, πολλοί ιοί δείχνουν διαφορετικά επίπεδα αντιγραφής σε σχέση με την συμβατική καλλιέργεια υπό ατμοσφαιρικό οξυγόνο (20% v/v O₂), που αποτελεί τεχνητή συνθήκη (358). Επίσης, ορισμένοι ιοί προκαλούν υποξική απόκριση με σκοπό την αναπαραγωγή τους, επαναπρογραμματίζοντας το βιοενεργητικό μεταβολισμό στα κύτταρα του ξενιστή τους, προς ένα κατώτερο μιτοχονδριακό αναπνευστικό ρυθμό (οξειδωτική φωσφορυλίωση). Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερη κατανάλωση οξυγόνου και προκαλεί μία γρήγορη μετατόπιση τύπου Warburg, προς την αναερόβια γλυκόλυση (παραγωγή γαλακτικού οξέος) (357). Είναι ενδιαφέρον ότι σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται αλληλεπίδραση ανάδρασης ανάμεσα στους υποδοχείς οξυγόνου και τον ικό πολλαπλασιασμό (357).

Η ταχεία κυκλοφορία του αίματος *in vivo* προμηθεύει τα όργανα και τους ιστούς με επαρκές οξυγόνο για τις μεταβολικές τους ανάγκες. Συνεπώς, υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα όργανα και οι ιστοί χαρακτηρίζονται από μία δική τους μοναδική κατάσταση νορμοξίας, με ενδιάμεσες τιμές από 3% έως 10% O₂, σαν αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ παροχής οξυγόνου και κατανάλωσης. Στο ήπαρ, η νορμοξία ποικίλλει από 12% O₂ στην περιοχή γύρω από την πυλαία φλέβα έως 1% O₂ κοντά στη κεντρική φλέβα (359) με μέσο όρο 3% O₂ (360). Η δημιουργούμενη τάση οξυγόνου

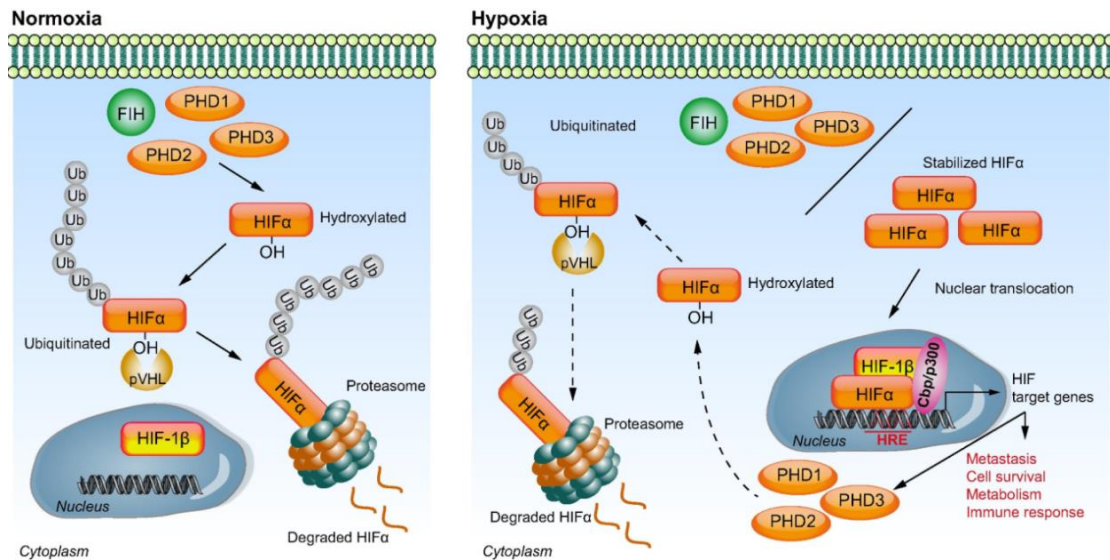
είναι σημαντική για τον σχηματισμό μεταβολικών ζωνών, που υποστηρίζονται από μη συμμετρική κατανομή ενζύμων-κλειδιών, κάτι που σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς (361, 362) είναι πιο χαρακτηριστικό στο ήπαρ (363).

5.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιϊκό πολλαπλασιασμό και την υποξία

Οι παράγοντες που επάγονται στην υποξία (Hypoxia Induced Factors-HIFs) αποτελούν σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες της μεταβολικής δραστηριότητας του κυττάρου σε χαμηλή τάση οξυγόνου (364), αλλά και μεσάζοντες στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ιικής αντιγραφής και της κυτταρικής απόκρισης, υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου. Η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση τους γίνεται σε <5% O₂ (365). Πρόκειται για ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που σχηματίζονται από μία διαρκώς εκφραζόμενη HIF-1β υπομονάδα και μία οξυγονορυθμιζόμενη HIF-α υπομονάδα, που υφίσταται σε τρεις ισομορφές. Οι αλληλεπιδράσεις των δύο υπομονάδων σχηματίζουν σύμπλοκο με υποκινητές γονιδίων που περιλαμβάνουν το αποκρινόμενο στην υποξία στοιχείο (Hypoxia Response Element-HRE): 5'-RCGTG-3' (R: πουρίνη). Στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Εικόνα 12) ο HIF-α παρουσιάζει αστάθεια, σαν αποτέλεσμα της υδροξυλίωσης στην προλίνη 402 ή/και 564, από πρωτεΐνες με επικράτεια προπυλ υδροξυλάσης (PHD) εξαρτώμενης από Fe(ii)/2-οξογλουταρικό, κυρίως τη PHD2. Η προπυλ-υδροξυλίωση είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel Lindau (VHL), η οποία με αυτό τον τρόπο επιστρατεύει ένα σύμπλοκο λιγάσης-σμπικουιτίνης. Η σμπικουιτίνωση στοχεύει την HIF-α για πρωτεασωματική αποικοδόμηση. Επίσης, ο FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1-FIH-1) ανασταλτικός παράγοντας του HIF, προσδένεται στον HIF-1α και οδηγεί σε αναστολή της υδροξυλίωσης του κατάλοιπου ασπαραγίνης 803, το οποίο εμποδίζει την διάδραση της επικράτειας ενεργοποίησης της HIF1-α με τον συνενεργοποιητή p300 ή CPB. Σε συνθήκες υποξίας (Εικόνα 12), η αντίδραση υδροξυλίωσης αναστέλλεται σαν αποτέλεσμα της έλλειψης υποστρώματος (O₂) ή/και της υψηλής παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) από τα μιτοχόνδρια, ενισχύοντας τη σταθερότητα του HIF-α, την πυρηνική μετατόπιση και την προώθηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του HIF. Επιπλέον, ο HIF-1 μπορεί να ενεργοποιηθεί σε ατμοσφαιρικές συνθήκες έπειτα από μόλυνση με ανθρώπινα παθογόνα,

συμπεριλαμβανομένων και των ιών (366). Οι παράγοντες HIF-1 και HIF-2 προάγουν την μεταγραφική απάντηση στην υποξία, ρυθμίζουν την αναερόβια γλυκόλυση (κυρίως ο HIF1), την αγγειογένεση και την ερυθροποίηση (HIF2), ενώ ο HIF-3, ο λιγότερο μελετημένος, δρα σαν βασικός αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1 μπλοκάροντας τη πρόσδεση του στο DNA (357).

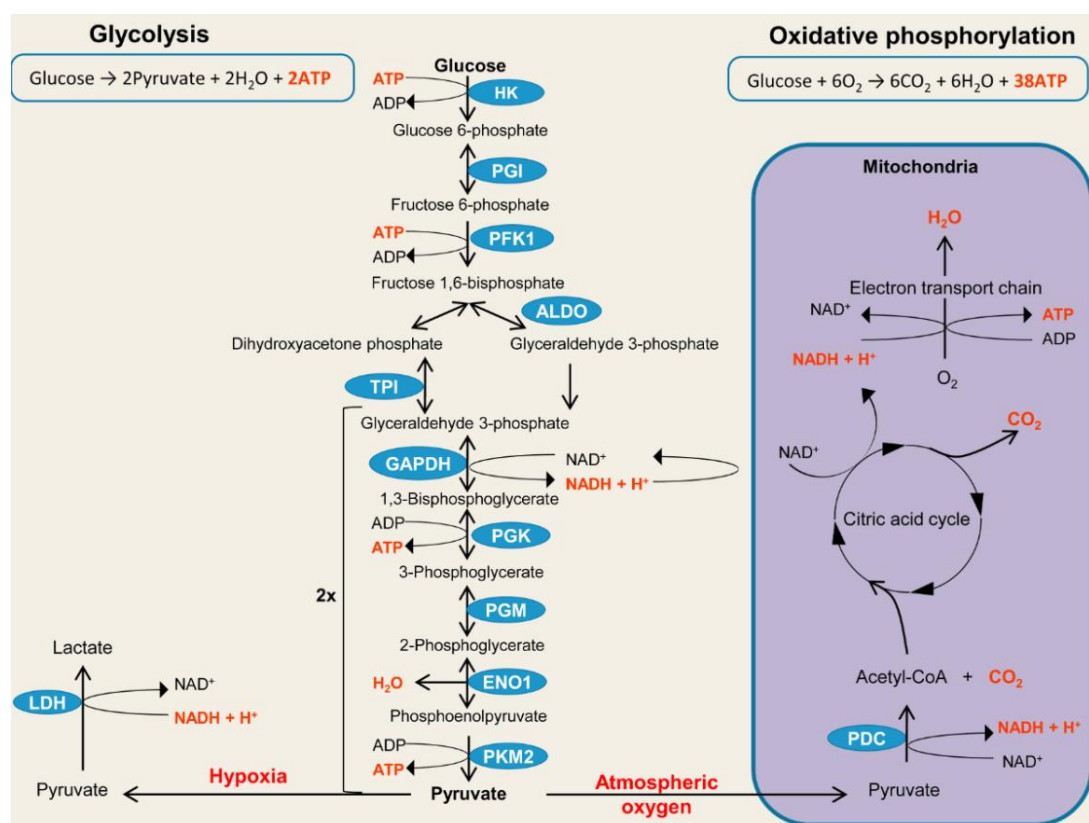
Επιπλέον, ο μηχανισμός σταθεροποίησης του HIF1-α που εξαρτάται από την υποξία, περιλαμβάνει διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως τα PI3K/AKT/mTOR, p42/44(ERKs) και τα p38 (MAP κινάση), p53-Mdm2 (mouse double minute 2 homolog) και HSP90 μονοπάτια που επηρεάζουν τον σχηματισμό, τη σταθερότητα και τη δράση του HIF (366). Η ενεργοποίηση του μονοπαριού PI3K/AKT/mTOR ενισχύει τη μετάφραση του HIF-1α. Η mTOR κινάση φωσφορυλιώνει τον 4E (eIF-4E) παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών, την προσδεμένη πρωτεΐνη (4EBP1) και την P70 ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάση (S6K), με σκοπό την έναρξη της πρωτεϊνικής μετάφρασης. Η ERK ελέγχει την ενεργοποίηση του HIF-1α με φωσφορυλίωση των 4E-BP1, SK6, και της κινάσης αλληλεπίδρασης με τη MAP κινάση (MNK) κι επιπλέον, τη μεταγραφική του ενεργοποίηση με φωσφορυλίωση του συνενεργοποιητή CBP/p300, αυξάνοντας έτσι τη σύνθεση του συμπλόκου HIF-1α/p300. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του ERK σε συνθήκες υποξίας φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον HIF-1α και να αυξάνει τη μεταγραφική του δραστηριότητα, χωρίς να επιφέρει μεταβολές σε επίπεδο πρωτεΐνης (367). Μια άλλη ανάλυση έδειξε πως η δράση του ERK απαιτείται για την ενεργοποίηση του HIF-1α στην υποξία, χωρίς να επηρεάζει τη σταθεροποίηση ή την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (357). Φωσφορυλίωση του HIF-1α προκαλείται και από το ενεργοποιημένο p38 MAPK στην ισχαιμία (χαμηλή γλυκόζη και υποξία), συμμετέχοντας στην αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ του HIF-1α και του VHL (368). Η σύνδεση της HSP90 στον HIF-1α αυξάνει τη δράση του, εμποδίζοντας την VHL-ανεξάρτητη πρωτεασωμική αποδόμηση και δρώντας στη δημιουργία των ετεροδιμερών HIF-1α, για να επιτραπεί η αλληλεπίδραση του με την p300. Η πρόσδεση του HIF-1α στην P53, προκαλεί Mdm2 μεσολαβούμενη συμπικουϊνίωση και πρωτεασωμική αποδόμηση του HIF-1α. (357)



Εικόνα 12: Οξυγονοεξαρτώμενη HIF σηματοδότηση. Σε συνθήκες ατμοσφαιρικού οξυγόνου, ο HIF-1α ουβικουτινιλώνεται και αποικοδομείται μέσω της δράσης του πρωτεασώματος. Αντίθετα, στην υποξία αναστέλλονται οι αντιδράσεις υδροξυλίωσης της HIF-1α που οδηγούν σε αναστολή της λειτουργίας του HIF και αυξάνεται η σταθερότητα της HIF-1α, η πυρηνική της μετατόπιση, ο σχηματισμός συμπλόκου με την υπομονάδα HIF-1β και τον συνενεργοποιητή του HIF (CPB/p300) και η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του HIF. Στην ιική μόλυνση ενεργοποιούνται μονοπάτια που εμποδίζουν την αποδόμηση της HIF1α ή/και οδηγούν στην σταθεροποίηση της ακόμα και στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο (369).

Η υποξία συνδέεται με έναν προσαρμοστικό μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του κυττάρου ξενιστή, που περιλαμβάνει μια αλλαγή από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, την αναερόβια γλυκόλυση και την παραγωγή γαλακτικού οξέος (365, 366, 368, 370) (Εικόνα 13), και που ευνοεί την αντιγραφή συγκεκριμένων ιών. Για κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με υψηλούς ρυθμούς, το προνόμιο μιας τέτοιας μεταβολικής μετατροπής, είναι ο συνδυασμός ενέργειας (ATP) από αυξημένη γλυκόλυση με την παραγωγή θρεπτικών ουσιών/μεσολαβητών για κυτταρική αύξηση και διαίρεση (371). Επιπλέον στον HIF, ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι γνωστό ότι προωθούν τον επαναπρογραμματισμό της μεταβολικής οδού προς την αναερόβια γλυκόλυση σε χαμηλή τάση οξυγόνου (372). Η διαμεσολαβούμενη από την υποξία ρύθμιση προς τα πάνω των πρωτεϊνών AKT1, FOS, MYC, SRC, H-RAS, BCR/ABL και p53, έχει βρεθεί πως αυξάνει τη πρόσληψη γλυκόζης και την γλυκόλυση έπειτα από άμεση ενεργοποίηση των σχετικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κωδικοποιούν τον μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1) και το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση 2 (HK2), ενολάση 1 (ENO1) και δεϋδρογονάση του γαλακτικού (LDH-A).

Επιπλέον στη γλυκόλυση, ένα άλλο βασικό μεταβολικό μονοπάτι που θα μπορούσε σε υποξία και ανεξάρτητα από τον HIF να ενισχύσει το ATP και την ιϊκή αντιγραφή (373) είναι αυτό της αντιστρεπτής αντίδρασης της φωσφοκρεατίνης (PCr) και ADP σε κρεατίνη και ATP, που καταλύεται από την κρεατινική κινάση (CK) (374). Άλλες οδοί, ευαίσθητες στο οξυγόνο που σχετίζονται με την προσαρμογή στην υποξία, είναι μέσω του mTOR και της απόκρισης της μη διπλωμένης πρωτεΐνης, καθώς επίσης και μέσω του STAT5 μονοπατιού (357).



Εικόνα 13: Το μονοπάτι της γλυκολυτικής οδού. Στο αρχικό στάδιο της πλήρους αποικοδόμησης της γλυκόζης (γλυκόλυση) παράγονται 2 μόρια πυροσταφιλικού, που απουσία οξυγόνου μετατρέπονται σε 2 μόρια γαλακτικού οξέος με ενεργειακό όφελος 2 μόρια ATP. Σε ατμοσφαιρικό οξυγόνο το πυροσταφιλικό μετατρέπεται σε ακέτυλο-CoA και μπαίνει στο κύκλο του κιτρικού οξέος για να οξειδωθεί σε CO₂ οπότε παράγονται ATP και τα ανηγμένα συνένζυμα NADH και FADH₂. Στο τελικό στάδιο της οξειδωτικής αποδόμησης της γλυκόζης, τα ανηγμένα συνένζυμα επανοξειδώνονται στα μιτοχόνδρια και μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας παράγεται επιπλέον ATP. Το καθαρό ενεργειακό όφελος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι 38 μόρια ATP. [415]

5.3. Η επίδραση της υποξίας στον ιϊκό κυτταρικό κύκλο

Η χαμηλή τάση οξυγόνου επιδρά σημαντικά στην αντιγραφή πολλών DNA και RNA ιών, τόσο σε καλλιεργούμενα κύτταρα, όσο και *in vivo* (357).

5.3.1. Θετική ρύθμιση των ιών σε μηχανισμό ανεξάρτητο του HIF

Στο μονοπάτι HIF-1α/VHL/PHD, και σε άλλα μονοπάτια που διεγείρονται σε απάντηση στην χαμηλή τάση οξυγόνου, έχει φανεί πως αυξάνουν την ιϊκή αντιγραφή. Η ενίσχυση της αντιγραφής του RNA του HCV μέσω υποξίας, σε ηπατικά κύτταρα που καλλιεργούνται σε συνθήκες οξυγόνου που προσομοιάζουν την ηπατική νορμοξία (3% O₂), φάνηκε πως δεν εξαρτάται από την έκφραση των HIF-1 και HIF-2. Αντιθέτως, συνδέθηκε άμεσα με μία αύξηση στην αναερόβια γλυκόλυση (θετική ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν στη μεταφορά γλυκόζης πχ GLUT-1) και στο μεταβολισμό (πχ HK2, ENO1, LDHA, προτίμηση σε γλυκολυτικό υπόστρωμα), καθώς και με την CKB ενεργότητα, οδηγώντας σε αύξηση ATP.

Ορισμένα ογκογονίδια που γνωρίζουμε να σχετίζονται με τη γλυκόλυση και περιέχουν τη πρωτεΐνη ενεργοποιητή-1 (Activator Protein-1 - AP1), αλλά και η φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση του AKT, έχουν αναδειχθεί καθοριστικοί παράγοντες της καθοδηγούμενης από το χαμηλό οξυγόνο, κυτταρικής βιοενεργητικής μεταβολής. Αυξάνουν την γλυκόλυση και την παραγωγή του ATP και στη συνέχεια την αντιγραφή του HCV, με τρόπο ανεξάρτητο του HIF (373). Επίσης, σε βιοψίες ήπατος από ασθενείς μολυσμένους με HCV, βρέθηκε ότι τα επίπεδα των δεικτών της υποξίας και του αναερόβιου μεταβολισμού σχετίζονται με τα επίπεδα του RNA του HCV. Η υποξία ενισχύει την δράση του ογκολυτικού ιού της ασθένειας του Newcastle (Newcastle disease virus – NDV) σε ανθρώπινα, νεφρικά κύτταρα της καρκινικής σειράς 786-O, ανεξάρτητα από τον HIF-2α, ο οποίος είναι διαρκώς ενεργός σε αυτή την κυτταροσειρά (375). Επιπρόσθετα, ο παρβοϊός B19 (B19V) φαίνεται να έχει αυξημένη γονιδιακή αντιγραφή και ιϊκό πολλαπλασιασμό έπειτα από μόλυνση των ερυθρών προγονικών κυττάρων (EPCs) που καλλιεργούνται σε συνθήκες οξυγόνου που προσομοιάζουν τη φυσική μόλυνση (1% v/v O₂) (376). Τα EPCS είναι μοναδικός κυτταρικός στόχος του B19V και συναντάται στο χαμηλότερο σημείο της βαθμίδας οξυγόνου στον μυελό των

οστών, που είναι υποξικός ιστός (0-4% v/v O₂) (377, 378). Η επαγόμενη από υποξία ενίσχυση του B19V δεν εξαρτάται από το κανονικό HIF-1α/VHL/PHD μονοπάτι, ωστόσο σχετίζεται με τα STAT5 και MEK/ERK μονοπάτια (376).

5.3.2. Επαγόμενη από τον ιό κυτταρική υποξική απόκριση και επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού

Οι ιοί γνωρίζουμε ότι επαναπρογραμματίζουν με διάφορους τρόπους τον κυτταρικό μεταβολισμό και τις ενεργειακές συνθήκες με στόχο την διευκόλυνση της αντιγραφής τους. Ορισμένοι ιοί είναι γνωστό πως προκαλούν μία τύπου Warburg ταχεία μετατόπιση σε γλυκόλυση και ελάττωση της κυτταρικής αναπνοής, συνήθως μέσω ελέγχου του HIF-1 μονοπατιού. Το φαινόμενο Warburg περιγράφει την υπεροχή της αερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα, ακόμα και στην περίπτωση που το οξυγόνο είναι επαρκές για μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση. Παρότι παράγονται μόνο 2 μόρια ATP σαν αποτέλεσμα της γλυκόλυσης (συγκριτικά με τα 36-38 μόρια ATP που συντίθενται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση), ο ρυθμός της αντίδρασης εμφανίζεται σχετικά υψηλός σε σχέση με τη παραγωγή του ATP στα μιτοχόνδρια, ικανοποιώντας με αυτό τον τρόπο την ανάγκη για ενέργεια κατά την αντιγραφή. Η γλυκόλυση επίσης προσφέρει ενδιάμεσα προϊόντα, που χρησιμεύουν για την παραγωγή νουκλεοτιδίων, αμινοξέων και λιπιδίων για κυτταρική αύξηση και διαίρεση, σε κύτταρα με μεγάλο ρυθμό πολλαπλασιασμού (379). Τη μεταβολική αυτή τροπή εκμεταλλεύονται οι ιοί, με σκοπό να διατηρήσουν την ενέργεια και τα μακρομόρια, που είναι αναγκαία για επιτυχή ιϊκή αντιγραφή. Οι εμπλεκόμενες στην αποικοδόμηση του HIF-1α πρωτεΐνες του ξενιστή, συχνά αποτελούν άμεσο στόχο των ιών, έτσι ώστε να μεταβάλλουν τον μεταβολισμό των κυττάρων του ξενιστή (357). Ο ιός της ηπατίτιδας C φαίνεται πως ενισχύει τα επίπεδα του HIF-1α στα τελευταία στάδια του ιικού πολλαπλασιασμού (373).

Η έκφραση γονιδίων του ιού προξενεί οξειδωτικό στρες, με τα επίπεδα των ROS να αυξάνουν, το οποίο προκαλεί ενεργοποίηση των κυτταρικών κινασών, όπως η MEK και η PI3K, πρωτεΐνες απαραίτητες για την σταθεροποίηση του HIF-1α (380). Σε άλλη ερευνητική μελέτη, οι πρωτεΐνες του HCV έχει δείχθει να αναστέλλουν την πρόσληψη οξυγόνου, όπως φάνηκε από αναπνευστικές αναλύσεις, να επάγουν τη σταθεροποίηση

του HIF-1α ανεξαρτήτως της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου, να ρυθμίζουν θετικά τα ελεγχόμενα από τον HIF γονίδια, όπως είναι τα γλυκολυτικά ένζυμα LDH-A και HK1, και τέλος να ενισχύουν την παραγωγή του ATP (381). Επιπλέον, οι γλυκοπρωτεΐνες του HCV απορρυθμίζουν την έκφραση των στενών και προσκολλημένων πρωτεϊνών σύνδεσης, προωθούν την μετανάστευση των ηπατικών κυττάρων και επάγουν την έκφραση από επιθηλιακούς σε μεσεγχυματικούς δείκτες μετάβασης Snail και Twist μέσω της σταθεροποίησης του HIF-1α (382). Η σταθεροποίηση του HIF οδηγεί σε ενεργοποίηση του VEGF και έκφραση του TGFβ, παράγοντες που εμπλέκονται στην διατάραξη της πολικότητας του ηπατώματος και στην επαγωγή της μετανάστευσης των μολυσμένων κυττάρων κατά την ανάπτυξη του HCC.

Η ενίσχυση του HCV μέσω υποξίας έχει άμεσα συσχετιστεί με αύξηση στους δείκτες της αναερόβιας γλυκόλυσης (HK2, ENO1, LDH-A), καθώς και με ογκογονίδια που σχετίζονται με τη γλυκόλυση (383), ενώ αντίθετα ο ιός έχει αναφερθεί πως επηρεάζει άμεσα στην ενεργότητα των γλυκολυτικών ενζύμων (384).

II. ΣΤΟΧΟΙ

Παρόλο που η μελέτη για νέες θεραπείες κατά του HCV οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη αποτελεσματικών αναστολέων (385, 386), αρκετά προβλήματα, όπως το υψηλό κόστος θεραπείας (387), η ανάπτυξη ανθεκτικών ικών στελεχών (388) και ο κίνδυνος εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου (134) παραμένουν. Επιπλέον, στις περιοχές με τη μεγαλύτερη εξάπλωση του HCV (Αφρική και Ασία) παρατηρείται συχνά το φαινόμενο των συμμολύνσεων με άλλους σημαντικούς ιούς για την ανθρώπινη υγεία, όπως ο HBV (389).

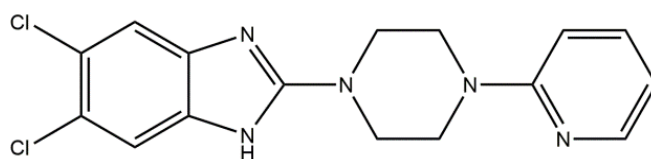
Η εκτεταμένη μελέτη των παραγόντων που ρυθμίζουν την ιική αντιγραφή, αλλά και αντίστροφα, του τρόπου με τον οποίο ο ιός επηρεάζει την κυτταρική ισορροπία, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ικών λοιμώξεων, ακόμα και για τον εκτενώς μελετημένο HCV, για τον οποίον υπάρχουν θεραπείες (390, 391). Έτσι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σημασία κυτταρικών παραγόντων στην ιική αντιγραφή και παθογένεια για την ανάδειξη νέων βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C, εστιάζοντας στα σηματοδοτικά μονοπάτια της υποξίας, της PI3K/AKT καθώς και σε έναν ενζυμικό παράγοντα που εντοπίσαμε να προσδένεται στην PI3K, την DDC. Έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ πως η μέση τάση οξυγόνου στο ήπαρ (3% v/v O₂), ευνοεί την αντιγραφή του HCV με τρόπο εξαρτώμενο από την AKT και την αναερόβια γλυκόλυση (373), δίνοντας μας το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της υποξίας. Τέλος, δεδομένου του ρόλου της PI3K στον ικό πολλαπλασιασμό (347, 392), μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της ικής μόλυνσης με την DDC, μια πρωτεΐνη που αλληλοεπιδρά άμεσα με την PI3K, αφού προϊόντα της (ισταμίνη), ή υποδοχείς τους (υποδοχέας σεροτονίνης 2A, υποδοχείς ντοπαμίνης D2 και D4) παίζουν ρολο στην είσοδο του HCV (303, 393, 394) στο κύτταρο. Παρ'όλα αυτά, ο ρόλος της DDC στην ική μόλυνση δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως.

Αρχικός στόχος μας είναι εξακριβώσουμε πώς επηρεάζει η HCV μόλυνση, την αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των μορφών της DDC, καθώς και με ποιο τρόπο επηρεάζονται τα επίπεδα του mRNA του ενζύμου από το ιικό φορτίο στα μετέπειτα στάδια της μόλυνσης. Ακολούθως, θα διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο

ο HCV επηρεάζει τα επίπεδα της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης, και συγκεκριμένα αν η δράση του μεσολαβείται μέσω του PI3K-AKT μονοπατιού κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Τέλος, θα εξακριβώσουμε το πώς επηρεάζεται η ρύθμιση της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης από τον HCV ανάλογα με τις συνθήκες οξυγόνου (20% O₂ - 1% O₂) καθώς και τον τύπο, νευρικό ή μη του ενζύμου που εμπλέκεται στη μόλυνση και την τοπολογία της DDC στο κύτταρο, κατά τη μόλυνση.

Στο δεύτερο τμήμα της εργασίας μελετήθηκε ο ιός HBV. Ενδεικτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν για διερεύνηση της σχέσης του ιού με τη DDC, ωστόσο η μελέτη επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση αντικών ουσιών έναντι του HBV, διερευνώντας τη δράση τους στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του DNA ιού. Τα μειονεκτήματα των διαθέσιμων φαρμάκων, καθώς και η ταυτοποίηση νέων μοριακών στόχων εντείνουν το ερευνητικό ενδιαφέρον για ανάπτυξη νέων αντικών παραγόντων ενάντια στον HBV, με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Στα πλαίσια των ερευνητικών προσπαθειών, αναπτύχθηκαν κάποια μη νουκλεοζιτικά βενζιμιδαζολικά ανάλογα. Το βενζιμιδαζόλιο αποτελεί ενδιαφέρουσα δομή φαρμακοφόρου ουσίας, με αντική, αντικαρκινική, αντιμυκητησιακή και αντισταμινική δράση, εξαιτίας της ισοστερείας του με τον δακτύλιο των πουρινών και του ινοδολίου, δομές που εντοπίζονται σε ποικίλα βασικά κυτταρικά στοιχεία και βιοδραστικά μόρια (395, 396). Σε συνδυασμό με την εμφάνιση χαμηλών επιπέδων κυτταροτοξικότητας σε πολλά παράγωγα του, η ανάπτυξη βενζιμιδαζολικών παραγώγων με πιθανή αντι-HBV δράση ήταν αναμενόμενη.

Προ δεκαετίας, όταν ένα βενζιμιδαζολικό εμφάνισε μέτρια αναστολή του ιϊκού αναδιπλασιασμού και χαμηλή κυτταροτοξικότητα, δόθηκε το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής-δράσης για τέτοια μόρια. Έπειτα από μια σειρά τροποποιήσεων με σκοπό την εύρεση του μορίου με την καλύτερη αντική δράση, οι ερευνητές κατέληξαν στο βενζιμιδαζολικό ανάλογο BM601 (Εικόνα 14). Το ανάλογο αυτό, βρέθηκε να αναστέλλει την αναπαραγωγή του HBV, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τη σύνθεση του ιϊκού DNA. Το BM601 εμποδίζει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών του φακέλου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), αναστέλλοντας το στάδιο έκκρισης των ιικών και των υποϊικών σωματιδίων. Έτσι, η μόλυνση νέων ηπατικών κυττάρων, αλλά και η επαγόμενη από το HbsAg ανοσοκαταστολή σταματά (397).



Εικόνα 14: Βενζιμιδαζολικός αναστολέας της έκκρισης του HBV-BM601.

Με βάση τα προηγούμενα και με στόχο την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών μορίων έναντι κατά του HBV, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο του Καθ. Μαράκου, στην Φαρμακευτική Σχολή ΕΚΠΑ ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινικά ανάλογα. Στα μόρια αυτά, έγινε υποκατάσταση της δομής του βενζιμιδαζολίου από ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη, η οποία εξαιτίας της ισοστερείας της με το δακτύλιο της πουρίνης, αυξάνει το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης με ένζυμα ή/και με κυτταρικά στοιχεία. Επίσης έγινε προσθήκη τοζυλίου και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί πλευρικοί υποκαταστάτες σε δύο θέσεις του μορίου. Τα νέα αντικαταστάσιμα μόρια αξιολογήθηκαν φαρμακολογικά με σκοπό την εκτίμηση της δράσης τους κατά του ιού της Ηπατίτιδας Β.

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. Κυτταρικές σειρές

Huh7-Lunet

Παρουσιάζουν αυξημένη αντιγραφή του γονιδιώματος του HCV. Προέρχονται από κλώνο των Huh7 στον οποίο είχε εισαχθεί ρεπλικόνιο Firefly luciferase καθώς και το τρανσποζόνιο Tn5 neo και θεωρούνται διαφοροποιημένα Huh7. Χρησιμοποιούνται για παραγωγή ιών μέσω ηλεκτροδιάτρησης με ιικό RNA.

Huh7.5

Τα Huh7.5 αποτελούν σταθερές κυτταροσειρές, η παραγωγή των οποίων έγινε με ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων για την είσοδο του RNA του ρεπλικονίου. Προέρχεται από την Huh7 και είναι δεκτική στην HCV μόλυνση. Περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I), το οποίο φυσιολογικά κωδικοποιεί έναν υποδοχέα που αναγνωρίζει το ιικό RNA και επάγει μηχανισμούς άμυνας του κυττάρου.

HepG2-NTCP

Τα HepG2-NTCP αποτελεί κυτταροσειρά που προέρχεται από αθάνατα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και απομονώθηκαν από δεκαπεντάχρονο λευκό Αμερικάνο. Η γενετική τους τροποποίηση έγινε με σκοπό να υπερεκφράζουν τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα NTCP, ο οποίος διευκολύνει τον HBV να εισέρχεται στο κύτταρο. Καλλιεργείται παρουσία 5 µg/ml πουρομυκίνης.

HepAD38

Πρόκειται επίσης για διαφοροποιημένα HepG2, με σκοπό να εκφράζουν το γονιδίωμα του HBV υπό τον έλεγχο ενός ρυθμιστή τετρακυκλίνης/ υποκινητή CMV. Αφαιρώντας την τετρακυκλίνη τα κύτταρα εξάγουν ιικό RNA και ημιτελή ιικά σωματίδια στο υπερκείμενο. Η συγκεκριμένη κυτταροσειρά χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του HBV.

1.2. Ιικές αλληλουχίες

HCV

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται οι πλήρεις ικές αλληλουχίες του HCV που χρησιμοποιήθηκαν. Ο ιός JC1 φέρει τις δομικές πρωτεΐνες p7 και τμήμα της NS2 από το στέλεχος J6 (υποτύπου 2a), ενώ τα 5' και 3' UTR προέρχονται από το JFH1 (11). Ο JcR2a, βασισμένος στον JC1, φέρει ως γονίδιο αναφοράς τη Renilla λουσιφεράση, η οποία είναι αμινοτελικά συζευγμένη με τα πρώτα 16 αμινοξέα της core και καρβοξυτελικά με το πεπτίδιο 2A του αφθώδους πυρετού (foot-and-mouth disease virus - FMDV) (10).



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλουχιών του πλήρους γονιδιώματος του HCV (373)

1.3. Εκκινητές

Στην παρούσα εργασία, η PCR (απλή και πραγματικού χρόνου) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση και ποσοτικοποίηση των ικών και κυτταρικών νουκλεϊκών οξέων. Σαν δείγμα χρησιμοποιείται είτε το προϊόν της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT) ή διάφορες μορφές HBV DNA που απομονώνονται. Τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κανονικοποιούνται ως προς τα σταθερά εκφραζόμενα γονίδια αναφοράς YWHAZ για RNA και Κυκλίνη A2 (Cyclin-A2 - CCNA2) για DNA. Ακολουθεί πίνακας με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν:

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Γονίδιο-στόχος
YWHAZ-1133-F	5'-GCTGGTGATGACAAGAAAGG-3'	YWHAZ
YWHAZ-1226-R	5'-GGATGTGTTGGTTGCATTTTCCT-3'	YWHAZ
CyclineA2-F	5'-CCTGCTCAGTTTCCTTTGGT-3'	CCNA2
CyclineA2-R	5'-AGACGCCCAGAGATGCAG-3'	CCNA2
DDC (F)	5'-GAACAGACTTAACGGGAGCCTT-3'	DDC (exon 10)
DDC (R)	5'-AATGCCGGTAGTCAGTGATAAGC-3'	DDC (exon 12)
B (F)*	5'- AACTGTCACTGTGGAGAGGA-3'	DDC (exon 1)
LS1 (F)*	5'- CTGGCACATGTGGCTGGAAATGC-3'	DDC (exon 1)
H5R (R)*	5'-GACAAACTTGTCCCTGAGGTGACA-3'	DDC (exon 14)

Πίνακας 1. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για *PCR/qPCR που προσδένονται σε κυτταρικά γονίδια. (F: Forward, R: Reverse)

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Στόχος
HBV-pgRNA-F	5'-TGTC AACACTAATATGGGCCTAA-3'	HBV pgRNA
HBV-pgRNA-R	5'-AGGGGCATTTGGTGGTCTAT-3'	HBV pgRNA
HBV-cccDNA-F	5'-GTGCACTTCGCTTCACCTCT-3'	HBV cccDNA
HBV-cccDNA-R	5'-AGCTTGGAGGCTTGAACAGT-3'	HBV cccDNA
HBV-rcDNA-F	5'-GACTCTCTCGTCCCCTTCTC-3'	HBV rcDNA
HBV-rcDNA-R	5'-ATGGTGAGGTGAACAATGCT-3'	HBV rcDNA

Πίνακας 2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για qPCR που προσδένονται σε ικές αλληλουχίες. (F: Forward, R: Reverse)

1.4. Αντισώματα

Αντίσωμα	Τύπος	Αραίωση	Εταιρεία
Anti-NS5A (HCV JFH1, 9E10)	Μονόκλωνο ποντικού	1:1000	(398)
Anti-HIF-1 α (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:500	BD Biosciences
Anti-phosphorylated AKT(Ser473)	Μονόκλωνο κουνελιού	1:1000	Cell Signaling
Anti-DDC (human, DDC C-T)	Πολύκλωνο κουνελιού	1:1000	Affina Immuntechnik GmbH (399)
Anti-PI3K (human)	Πολύκλωνο κουνελιού	1:500	Affina Immuntechnik GmbH (399)
Anti-GAPDH (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:8000	Santa Cruz
Anti-lamin A (human)	Πολύκλωνο κουνελιού	1:2000	(400)
Anti-calnexin (human)	Πολύκλωνο κουνελιού	1:2000	Sigma
Anti-actin (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:6000	Chemicon International

Πίνακας 3. Κατάλογος πρώτων αντισωμάτων.

1.5. Χημικές ουσίες

Η καρβιντόπα (α -methyL-Dopahydrazine) (Carbidopa, Sigma), ειδικός αναστολέας του ενζύμου DDC, είναι προσφορά της κ.Βασιλακοπούλου. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν ο AKT inhibitor VIII (AKTi 1/2, Cayman Chemical) ειδικός αναστολέας των AKT-1 και -2, ο PI3K inhibitor LY294002 (Cayman Chemical) ειδικός αναστολέας του PI3K και ο ειδικός αναστολέας του HIF (NSC-134754, Calbiochem). Επίσης οι αντικές ουσίες που δοκιμάστηκαν και αξιολογήθηκαν έναντι του HBV παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο του καθ. Μαράκου από την Φαρμακευτική Σχολή του ΕΚΠΑ.

1.6. Διαλύματα

Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 8,8

- 182 gr/L Tris (Merck)

Η ρύθμιση του διαλύματος σε pH 8,8 γίνεται με χρήση διαλύματος HCl 25%. Η μέτρηση του pH του διαλύματος γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (SD 300 pH, Lovibond).

Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 6,8

- 60,6 gr/L Tris (Merck)

Η ρύθμιση του του διαλύματος σε pH 6,8 γίνεται με χρήση διαλύματος HCl 25%. Η μέτρηση του pH του διαλύματος γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (SD 300 pH, Lovibond).

DMSO [Dimethyl sulfoxide (C₂H₆OS)] (Serva)

Το χημικό DMSO χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό του διαλύματος κατάψυξης κυττάρων στους -80 °C μαζί με FBS, με αναλογία FBS 95% - DMSO 5% στον συνολικό όγκο. Επιπλέον αποτέλεσε τον διαλύτη των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, ενώ χρησιμοποιήθηκε παράλληλα στο δείγμα ελέγχου (θετικό control) σε όλα τα πειράματα που αφορούσαν τον έλεγχο των αναστολέων. Τέλος, ήταν απαραίτητο συστατικό για την παραγωγή του HBV αλλά και για τη μόλυνση κυττάρων με τον ιό.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καθαρισμός DNA από περιοριστικά ένζυμα με φαινόλη – χλωροφόρμιο

Ο πλήρης καθαρισμός του κομμένου DNA από τα περιοριστικά ένζυμα, καθώς και από τα ρυθμιστικά διαλύματα της πέψης που προηγήθηκε, πραγματοποιείται με το πρωτόκολλο καθαρισμού φαινόλης-χλωροφορμίου. Τα στάδια που ακολουθούνται περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω:

- Σε συγκεκριμένο όγκο πέψης προστίθεται ddH₂O τόσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 350 μl.
- Έπειτα προστίθενται 50 μl διαλύματος CH₃COONa (3M, pH 5.2).
- Προσθήκη 400 μl φαινόλης, δηλαδή ίσου όγκου με το ακριβώς προηγούμενο μίγμα. Η φαινόλη που χρησιμοποιείται εδώ είναι ειδική για καθαρισμό DNA και η λήψη

της γίνεται από την κάτω οργανική φάση και μέσα στον απαγωγό. Στο νέο μίγμα γίνεται καλή ανακίνηση (vortex).

- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει το DNA που θέλουμε να καθαριστεί περαιτέρω, σε eppendorf του 1,5 mL.
- Προσθήκη επιπλέον 400 μl φαινόλης και καλή ανακίνηση (vortex).
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, εκεί που περιέχεται το DNA, σε eppendorf του 1,5 mL.
- Προσθήκη 400 μl χλωροφορμίου και καλή ανακίνηση (vortex).
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, εκεί που περιέχεται το DNA, σε eppendorf του 1,5 mL.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά όλης της υπάρχουσας ποσότητας εκτός των τελευταίων 20 μl περίπου σε καινούριο eppendorf του 1,5 mL, για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων χλωροφορμίου.
- Προσθήκη 2,5 όγκων 100% αιθανόλης σε σχέση με την ποσότητα που έχει τοποθετηθεί στο σωληνάκι. Έντονη ανακίνηση (vortex) μετά την προσθήκη.
- Το eppendorf αφήνεται να παγώσει στους -20 °C μέχρι την επόμενη ημέρα, έτσι ώστε να κατακρημνιστεί το DNA. Στο στάδιο αυτό το DNA δύναται να διατηρηθεί επ' αόριστον.
- Φυγοκέντρηση στα 15.000 rpm για 15 λεπτά και στη συνέχεια προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου, το οποίο απορρίπτεται. Το DNA έχει πλέον σχηματίσει πέλλετ στον πυθμένα του σωληνάκι.
- Το DNA ξεπλένεται με 500 μl αιθανόλης 70% και ακολουθεί ήπια ανάδευση (πάνω – κάτω με το χέρι), φυγοκέντρηση στα 15.000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Επανάληψη όλου του σταδίου αυτού άλλη μία φορά. Στο τέλος πρέπει να γίνει αφαίρεση των σταγόνων αιθανόλης από τα τοιχώματα με σύντομο spin του eppendorf.
- Ακολουθεί αναμονή 7 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, κατά την οποία το σωληνάκι αφήνεται με το καπάκι ανοιχτό, με σκοπό να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης. Τέλος προστίθενται 130 μl ddH₂O.

- Επώαση του σωλήνα για 15 λεπτά στους 37 °C, με ενδιάμεση ανακίνηση (vortex) και στιγμιαία φυγοκέντρωση (spin) ανά 5 λεπτά. Το καθαρισμένο πλέον DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C μέχρι τη χρήση του. Ωστόσο, πριν χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει πρώτα να επαναδιαλυτοποιηθεί με τη χρήση πιπέτας και στη συνέχεια να μετρηθεί η συγκέντρωσή του στο Nanodrop (ως τυφλό χρησιμοποιείται το δις απεσταγμένο νερό).

2.2. Μεταγραφή *in vitro*

Με τη μέθοδο αυτή παράγεται RNA από DNA, που προηγουμένως έχει υποστεί πέψη με ένζυμα περιορισμού έτσι ώστε να γίνει γραμμικό και έχει καθαριστεί με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου. Τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 200 μl. Σε eppendorf του 1,5 mL τοποθετούνται τα εξής αντιδραστήρια:

1. 20 μg DNA σε 130 μl ddH₂O
2. 40 μl ρυθμιστικού διαλύματος RRL 5x
3. 25 μl μίγματος ριβονουκλεοτιδίων (rNTPs solution) 25 mM (Invitrogen)
4. 5 μl RRI (Recombinant RNase Inhibitor) 40 U/μl (Takara)
5. Στο μίγμα προστίθενται τελικά 4 μl T7 RNA πολυμεράσης 40U/μl (Takara) και γίνεται καλή ανακίνηση (vortex). Ακολουθούν τα εξής βήματα:

- Επώαση του μίγματος στους 37 °C για 2 ώρες
- Προσθήκη 2 μl T7 RNA πολυμεράσης 20U/μl (Promega)
- Επώαση του μίγματος στους 37 °C για 2 ώρες επιπλέον
- Προσθήκη 12 μl δεοξυριβονουκλεάσης (RQ1 DNase free RNase) (Promega)
- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα επιπλέον, για αποδιάταξη του DNA

Μετά την παραπάνω διαδικασία, το RNA που έχει παραχθεί μπορεί πλέον να φυλαχθεί στους -80 °C. Πριν από τη χρησιμοποίησή του βέβαια είναι απαραίτητο να γίνει καθαρισμός από τα ένζυμα της μεταγραφής μέσω ειδικής πειραματικής διαδικασίας καθαρισμού.

- **RRL 5x**
 - 400 mM Hepes pH 7.5
 - 60 mM MgCl₂
 - 10 mM spermidin
 - 200 mM DTT
- **rNTPs solution (1:1:1:1)**
 - rATP 100mM
 - rCTP 100mM
 - rGTP 100mM
 - rUTP 100mM

2.3. Καθαρισμός RNA από τα ένζυμα της *in vitro* μεταγραφής

Ο καθαρισμός του RNA είναι απαραίτητη διαδικασία, έτσι ώστε να είναι απαλλαγμένο από τα ένζυμα και τα ρυθμιστικά διαλύματα της *in vitro* μεταγραφής. Τα βήματα που ακολουθούνται έχουν ως εξής:

- Στο σωληνάκι που πραγματοποιήθηκε η μεταγραφή προστίθενται 60 μl διαλύματος CH₃COONa (2M, pH 4.5), καθώς και ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 600 μl.
- Προστίθενται 400 μl φαινόλης (pH < 5, ειδική για καθαρισμό RNA) και το μίγμα αναδεύεται έντονα με vortex. Το μίγμα επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης (περίπου 500 μl), που περιέχει το RNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, σε eppendorf του 1,5 mL
- Προσθήκη χλωροφορμίου σε όγκο ίσο με εκείνο από την μεταφερόμενη υδατική φάση και επανάληψη της έντονης ανάδευσης (vortex).
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει το RNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, σε eppendorf του 1,5 mL.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά όλης της υπάρχουσας ποσότητας εκτός των τελευταίων 20 μl περίπου σε καινούριο eppendorf του 1,5 mL, για απομάκρυνση υπολειμμάτων χλωροφορμίου.
- Προσθήκη 0,7 του όγκου 100% ισοπροπανόλη και έντονη ανάδευση (vortex).
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαίρεση του υπερκειμένου (ισοπροπανόλη), ώστε να μείνει το ίζημα (RNA). Με spin αφαιρούνται και οι τελευταίες σταγόνες ισοπροπανόλης που έχουν απομείνει στο σωληνάκι.

- Ξέπλυμα με 500 μl αιθανόλης 70%. Ήπια ανάδευση με το χέρι (πάνω-κάτω), φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή. Επανάληψη όλου του σταδίου άλλη μία φορά. Αφαίρεση των τελευταίων σταγόνων αιθανόλης από τα τοιχώματα γίνεται έπειτα από σύντομο spin του σωλήνα.
- Αναμονή 7 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Το σωληνάκι αφήνεται με το καπάκι ανοιχτό, ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
- Προσθήκη 40 μl ddH₂O (ή άλλου επιθυμητού όγκου), έτσι ώστε το RNA να επαναδιαλυθεί με ευκολία πριν χρησιμοποιηθεί, με πιπετάρισμα και vortex.
- Επώαση του σωλήνα για 15 λεπτά στους 37 °C, με ενδιάμεσο vortex και spin ανά 5 λεπτά. Το βήμα αυτό βοηθά στην επαναδιάλυση.
- Πάγωμα τουλάχιστον για 30 λεπτά στους -80 °C, με σκοπό να μαλακώσει το πέλμα του RNA, και τέλος αναδιάλυση με καλό πιπετάρισμα.

Το RNA είναι πλέον καθαρό και μπορεί να φωτομετρηθεί στο Nanodrop, στα 260 nm και έχοντας ως τυφλό ddH₂O. Όταν δεν χρησιμοποιείται, το RNA φυλάσσεται στην κατάψυξη των -80 °C.

2.4. Διαίρεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)

Όταν τα κύτταρα φτάνουν να καλύπτουν σχεδόν το 90% της πληρότητας της επιφάνειας στην οποία αναπτύσσονται (πχ φλάσκες, πιάτα καλλιέργειας κυττάρων), τότε θα πρέπει να αποκολληθούν από το υπόστρωμα, να διαχωριστούν και να γίνει καλλιέργεια εκ νέου. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που σχετίζονται με ζωντανά κύτταρα θηλαστικών πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής, με στείρα υλικά. Η διαδικασία ξεκινά με πρώτο βήμα την απομάκρυνση του υπάρχοντος θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια το μέσο καλλιέργειας ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα PBS 1x, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος του δοχείου στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα. Οι πλύσεις γίνονται για την απομάκρυνση του ορού που περιέχει το θρεπτικό, ο οποίος μπορεί να απενεργοποιήσει τη θρυψίνη, μία πεπτιδάση που χρησιμοποιείται σε επόμενο στάδιο για την αποκόλληση των κυττάρων. Έπειτα τοποθετείται ποσότητα θρυψίνης αντίστοιχη του μεγέθους του δοχείου όπου καλλιεργούνται τα κύτταρα. Η θρυψίνη ανάλογα την κυτταρική σειρά μπορεί να είναι

είναι αραιωμένη (π.χ. 1:4 σε διάλυμα PBS 1x για τα Huh7.5 και μη αραιωμένη για τα HepG2-NTCP). Τα κύτταρα τοποθετούνται στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂) σε θερμοκρασία που η θρυψίνη έχει καλύτερη δράση, περίπου για 5 λεπτά με ενδιάμεση ανακίνηση, ώστε να καλύπτεται όλη την επιφάνεια κυττάρων και η αποκόλληση να γίνει ευκολότερα. Στα ανασηκωμένα κύτταρα προστίθεται μικρή ποσότητα νέου πλήρους θρεπτικού υλικού, με σκοπό να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης και συγχρόνως να χρησιμοποιηθεί στον διαχωρισμό των κυττάρων. Ο διαχωρισμός γίνεται με συνεχές πιπετάρισμα και ακολουθεί λήψη μιας ποσότητας από τα διαχωρισμένα κύτταρα που τοποθετείται σε νέο χώρο καλλιέργειας, στον οποίο έχει ήδη προστεθεί ποσότητα πλήρους θρεπτικού ανάλογα με το μέγεθός του. Σε περιπτώσεις που τα κύτταρα που διαχωρίζονται φέρουν κάποιο φορέα έκφρασης με γονίδιο επιλογής, όπως για παράδειγμα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό, τότε το αντιβιοτικό αυτό πρέπει να προστίθεται κατά την ανακαλλιέργεια στο δοχείο καλλιέργειας, σε ποσότητα ανάλογη με αυτή του πλήρους θρεπτικού, και άρα ανάλογης του μεγέθους του χώρου καλλιέργειας.

- **PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na₂HPO₄

1,47 mM KH₂PO₄

- **Πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό DMEM για κυτταροκαλλιέργειες**

DMEM High Glucose (Dulbecco's modified minimal essential medium, Invitrogen)

2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine)

0,1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα (non-essential amino acids - NEAA)

100 U/mL Penicillin

100 µg/mL Streptomycin

10% (v/v) εμβρυικού ορού μόσχου (fetal bovine serum, FBS)

2.5. Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων για μελλοντική χρήση

Σε falcon χωρητικότητας των 15 mL τοποθετούνται 4 mL από κύτταρα με νέο πλήρες θρεπτικό υλικό, τα οποία έχουν μόλις περάσει τη διαδικασία του διαχωρισμού

(split). Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 800 rpm για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αφαιρείται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur και κενού, ώστε να μείνει μόνο το ίζημα κυττάρων. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 1,5 ml μίγματος 95% ορού (FBS) και 5% DMSO και μεταφέρεται σε κατάλληλο πλαστικό φιαλίδιο (cryovial). Το cryovial στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη στη βάση του (χρησιμοποιείται για αποφυγή της απότομης ψύξης) και μένει στους -80 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το φιαλίδιο μεταφέρεται σε υγρό άζωτο και μπορεί να φυλαχθεί εκεί επ' αόριστον αφού πάνω του φέρει τις απαραίτητες πληροφορίες (π.χ. όνομα κυτταροσειράς).

2.6. Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικά φιαλίδια (cryovials), τα οποία βρίσκονται σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Όταν χρειαστεί να αποψυχθούν, το cryovial αφαιρείται από το υγρό άζωτο, το περιεχόμενό του ξεπαγώνει γρήγορα με τριβή στα χέρια και μεταφέρεται σε 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM μέσα σε falcon των 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 800 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου (περιέχει θρεπτικό υλικό, DMSO, FBS) με πιπέτα Pasteur και κενό. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 3-4 mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM και τα κύτταρα διαχωρίζονται με συνεχές και έντονο πιπετάρισμα. Αφού διαχωριστούν εντελώς, τότε τοποθετούνται στο δοχείο όπου θα αναπτυχθούν (τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων ή φλάσκα). Στο τέλος προστίθεται και η υπόλοιπη ποσότητα θρεπτικού υλικού, που εξαρτάται κάθε φορά από τον όγκο του δοχείου καλλιέργειας. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν στον κλίβανο των κυττάρων (37 °C, 5% CO₂).

2.7. Επώαση σταθερών υπογονιδιωματικών κυτταρικών σειρών με αναστολείς σε μολυσμένα ή μη κύτταρα

HCV

Κύτταρα Huh7.5 που έχουν περάσει από τη διαδικασία του διαχωρισμού (split) επιστρώνονται σε πλάκα 96 πηγαδιών πιάτου καλλιέργειας σε πυκνότητα 30%. Μία ημέρα μετά την επίστρωση, το υλικό του κάθε πηγαδιού της πλάκας αντικαθίσταται με

νέο, το οποίο όμως τώρα περιέχει και την επιθυμητή ποσότητα αναστολέα ή τον διαλύτη του αναστολέα (θετικός μάρτυρας ή Mock κύτταρα). Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν με τον εκάστοτε αναστολέα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (18 ώρες), το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο και έπειτα λύνονται με ειδικό διάλυμα λύσης, ανάλογα με την μέτρηση που θα ακολουθήσει στα κύτταρα σε συγκεκριμένο χρόνο. Τα κύτταρα μπορεί να είναι μολυσμένα ή μη.

HBV

Κύτταρα HepG2-NTCP στρώνονται σε πλάκες πολλαπλών πηγαδιών (24 πηγάδια) με $6 \cdot 10^4$ κύτταρα ανά πηγάδι. Την επόμενη μέρα το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται ο ιός. Για έλεγχο της μόλυνσης παρουσία αναστολέων, τότε κάνουμε προεπώαση με τον αναστολέα 1-2 ώρες πριν τη μόλυνση. Μετά την προεπώαση το θρεπτικό μέσο με τους αναστολείς αφαιρείται. Έπειτα γίνεται αραίωση του ιού σε πλήρες DMEM, παρουσία DMSO 2% και PEG 4% και με τέτοια ποσότητα ιού ώστε να φτάσει το επιθυμητό MOI που για τον HBV συνήθως χρησιμοποιείται MOI = 1000 genome equivalent/κύτταρο. Το μίγμα με τον ιό προστίθεται στα πηγάδια, στον μισό τελικό όγκο καθώς ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό παρουσία του αναστολέα. Η μόλυνση μένει στον επωαστικό θάλαμο, στους 37 °C με 5% CO₂, για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα αφαιρούμε το μίγμα ιού-αναστολέα, κάνουμε δύο πλύσεις με PBS 1x, για απομάκρυνση του PEG, και ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό με τον αναστολέα παρουσία DMSO 2% και PEG 4%, το οποίο αφήνεται να επωαστεί για 6 ακόμα ημέρες. Την έβδομη μέρα μετά την μόλυνση, τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS 1x και λύνονται με το κατάλληλο διάλυμα λύσης, ενώ τα υπερκείμενα τους αποθηκεύονται σαν δείγματα εκκρινόμενου DNA (δες 2.21.6).

2.8. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Για ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης από λυμένα κύτταρα χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Protein Assay. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το όξινο διάλυμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Σαν αποτέλεσμα, προκύπτει κυανό χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm. Το χρώμα σχηματίζεται σχεδόν αμέσως, είναι

σταθερό για περίπου 1 ώρα, ενώ επηρεάζεται ελάχιστα ή καθόλου από παράγοντες που μπορεί να εμπεριέχονται στα πρωτεϊνικά διαλύματα.

Η ποσοτικοποίηση γίνεται σε πλάκα 96 πηγαδιών ειδική για τη μέθοδο και ως τυφλό για τα δείγματα χρησιμοποιείται ίση ποσότητα από το εκάστοτε διάλυμα λύσης. Ταυτόχρονα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με υδατικό διάλυμα αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin-BSA) σε συγκεντρώσεις 0 (τυφλό πρότυπης), 0,5, 5, 10, 15, 20 και 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Τα δείγματα αραιώνονται σε dH_2O με τελικό όγκο 120 μl και τέλος προστίθεται το αντιδραστήριο Protein Assay (Biorad) σε ποσότητα 30 μl ανά πηγάδι και η πλάκα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο (Microplate Reader model 680, Biorad) για μέτρηση στα 600 nm. Από τις τιμές απορροφήσεων που παίρνουμε από το μηχάνημα, αφαιρείται η τιμή του αντίστοιχου τυφλού από κάθε τιμή δείγματος, και με την χρήση πρότυπης καμπύλης γίνεται αντιστοίχιση των απορροφήσεων των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις τους, λαμβάνοντας τελικά την ποσότητα πρωτεΐνης που αντιστοιχεί ανά μl δείγματος ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

2.9. Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC)

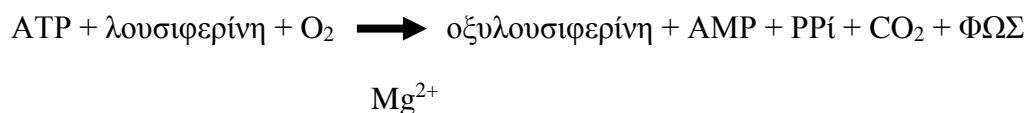
Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου της Renilla λουσιφεράσης (Renilla LUC) στηρίζεται στην αντίδραση οξειδωσης του υποστρώματος της, το οποίο είναι η κοιλεντεραζίνη, δηλαδή η λουσιφερίνη των κοιλεντερωτών. Η οξειδωση συνοδεύεται από παραγωγή φωτός. Το φως που παράγεται μετριέται σε μετρητή φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, BioRad), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη μέτρηση της Renilla λουσιφεράσης, πρέπει να προηγηθεί λύση των κυττάρων. Τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS 1x και προστίθενται σε κάθε πηγάδι 80 μl Passive Lysis Buffer 1x (Promega) ή Renilla Lysis Buffer 1x (Promega) αντίστοιχα, το οποίο έχει αραιωθεί από 5x με τη χρήση κατάλληλου όγκου ddH_2O . Μετά από 5 λεπτά συλλέγεται το κυτταρόλυμα σε eppendorfs του 1,5 mL, τα οποία φυλάσσονται στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Το διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε, λύει ήπια τα κύτταρα και δεν αποδιατάσσει πρωτεΐνες που χρειάζεται να διατηρήσουν την ενζυμική τους ενεργότητα μετά τη λύση, όπως η λουσιφεράση. Τα δείγματα αποψύχονται και πραγματοποιείται καλή ανακίνηση των δειγμάτων με vortex και φυγοκέντρησή τους στις 13.000 rpm για 3 λεπτά. Η διαδικασία αυτή ακολουθείται για να κατακρημνιστούν τα μεμβρανικά

συστατικά που περιέχονται στο δείγμα, με σκοπό να μην επηρεάσουν, όσο το δυνατόν, τις μετρήσεις. Ταυτόχρονα, σε eppendorfs του 1,5 mL αντίστοιχα σε αριθμό με αυτόν των δειγμάτων προς μέτρηση, τοποθετούνται 30 του υποστρώματος κοιλεντεραζίνης 12 μM (Promega), αραιωμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM potassium phosphate, pH 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA). Σε κάθε eppendorf με αντιδραστήριο προστίθενται 8 μl από το κάθε δείγμα και μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στα 10 δευτερόλεπτα, η οποία εκφράζεται από το λουσιφερόμετρο ως σχετικές μονάδες φωτός (Relative Light Units - RLU).

2.10. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP

Για μέτρηση των επιπέδων κυτταροτοξικότητας ενός αναστολέα, χρησιμοποιείται ένας κυτταρικός δείκτης με σχετικά μεγάλη ευαισθησία, όπως είναι το ATP. Τα προς μέτρηση κύτταρα λύνονται με το ειδικό διάλυμα λύσης για μέτρηση ATP (ViaLight plus kit, Lonza). Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση βιοφωταύγειας του ATP που είναι παρούσα σε όλα τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Η μέθοδος χρησιμοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση, η οποία καταλύει το σχηματισμό φωτός από ATP και λουσιφερίνη, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

Luciferase



Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός συνδέεται γραμμικά με την συγκέντρωση του ATP και μετριέται χρησιμοποιώντας μετρητή φωταύγειας. Το διάλυμα λύσης αραιώνεται 1:3 με θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό πριν τη χρήση του. Πριν τη λύση, τα κύτταρα ξεπλένονται με το ίδιο θρεπτικό υλικό μία φορά. Για πλάκα 96 πηγαδιών, χρησιμοποιούνται 75 μl διαλύματος λύσης σε κάθε πηγάδι. Το κυτταρόλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε σωληνάκια eppendorf στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Πριν την μέτρηση, τα δείγματα αλλά και το υπόστρωμα μέτρησης (ATP Monitoring Reagent ή AMR) αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για να ξεπαγώσουν. Τα δείγματα στη συνέχεια αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 13.000 rpm, ενώ 30 μl υποστρώματος για κάθε δείγμα μοιράζονται σε σωληνάκια eppendorf. Η μέτρηση

γίνεται στον μετρητή φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, BioRad). Ποσότητα 5-10 μl δείγματος ανακατεύονται με τα 30 μl υποστρώματος και μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στο 1 δευτερόλεπτο, η οποία εκφράζεται από το λουσιφερόμετρο ως σχετικές μονάδες φωτός (Relative Light Units - RLU).

2.11. Συλλογή και λύση κυττάρων Huh7/HepG2-NTCP με χρήση διαλύματος Trizol

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται έπειτα από απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και διπλή πλύση των πηγαδιών με διάλυμα PBS 1x. Ακολουθεί αφαίρεση του PBS από τα πηγάδια και προσθήκη 0,5 mL διαλύματος Trizol (ανάλογα με το μέγεθος του πηγαδιού). Το κυτταρόλυμα συλλέγεται σε σωληνάκια erpendorf, τα οποία αποθηκεύονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.12. Απομόνωση RNA από δείγματα που λύθηκαν με χρήση διαλύματος Trizol

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον καθαρισμό του RNA από δείγματα που λύθηκαν με το διάλυμα Trizol. Ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 100 μL χλωροφορμίου ανά δείγμα στον απαγωγό και καλή ανάδευση τους με χρήση vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά υδατικής (πάνω) φάσης σε νέα erpendorf.
- Προσθήκη 1 μl γλυκογόνου 5 mg/ml (το γλυκογόνο βοηθά στην καθίζηση του RNA και την ευκολότερη συλλογή του).
- Προσθήκη 250 μl ισοπροπανόλης σε κάθε δείγμα και καλή ανάδευση των δειγμάτων με χρήση vortex.
- Αναμονή 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4 °C και απομάκρυνση των υπερκλειμένων με προσοχή.
- Προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75% σε κάθε δείγμα (εδώ τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -20 °C).

- Απαλή ανακίνηση των σωλήνων (πάνω και κάτω με το χέρι), με σκοπό να ξεπλυθεί το δημιουργούμενο πέλλετ.
- Φυγοκέντρηση στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομάκρυνση των υπερκειμένων.
- Τα σωληνάκια αφήνονται με ανοιχτό καπάκι για 5 με 10 λεπτά, ώστε να εξατμιστούν υπολείμματα αιθανόλης.
- Επαναιώρηση των πέλλετ σε 60 μl ddH₂O. Η ποσότητα νερού εξαρτάται από το μέγεθος του πέλλετ.
- Επώαση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 37 °C για 15 λεπτά, με ενδιάμεση διακοπή ανά 5 λεπτά για ανάδευση στο vortex και spin.
- Αποθήκευση στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Πριν γίνει χρήση τους, τα RNA πρέπει να επαναδιαλυθούν με πιπέτα και ενδιάμεση ανάδευση (vortex) και spin. Στη συνέχεια μετريέται η συγκέντρωσή τους στο Nanodrop, ενώ απεσταγμένο νερό χρησιμοποιείται σαν τυφλό.

2.13. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) χρησιμοποιείται για τη σύνθεση cDNA, από αρχική μήτρα RNA, το οποίο τη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για PCR. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί σαν εκμαγείο μόρια RNA και με τη βοήθεια εκκινητών με ελεύθερο 3'-OH άκρο, δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs : dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και Mg²⁺, παράγει cDNA, δηλαδή DNA συμπληρωματικό με το αρχικό RNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση του Moloney murine leukemia virus (MMLV, Promega).

Σε μικρά φιαλίδια τύπου PCR 0,2 ml προστίθεται καθαρό RNA (π.χ. ολικό RNA το οποίο απομονώθηκε από κυτταροκαλλιέργειες με χρήση διαλύματος Trizol), σε όγκο που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του και τελική ποσότητα επιθυμητή για *in vitro* σύνθεση cDNA (0,5 μg), καθώς και 0,7 μl μίγματος 2 ανάστροφων (reverse-R) εξειδικευμένων εκκινητών ολιγονουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 100 pmol/μl σε αναλογία 1:1 (0,35 μl + 0,35 μl) που προσδένονται ειδικά στο ιικό RNA και στο

σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο (housekeeping gene) της πρωτεΐνης 14-3-3-zeta (YWHAZ). Συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι τα 6,25 μl.

Τα δείγματα τοποθετούνται στο όργανο διεξαγωγής της αντίδρασης στους 70 °C για 5 min (στάδιο αποδιάταξης) και έπειτα στον πάγο. Στη συνέχεια, σε κάθε φιαλίδιο προστίθεται 3,75 μl από μίγμα που περιέχει: 1 μl 100mM dNTPs, 0,25 μl αναστολέα RNασών RRI (Takara), 2 μl MMLV buffer 5x (Promega) και 0,5 μl ένζυμο MMLV (Promega), άρα ο τελικός όγκος της αντίδρασης γίνεται 10 μl.

Τα δείγματα τοποθετούνται πίσω στο θερμικό κυκλοποιητή και το πρόγραμμα συνεχίζει στους 42 °C, για 1 h (στάδιο υβριδοποίησης). Η αντίδραση τερματίζει με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95 °C για 3 λεπτά. Η αντίδραση αραιώνεται 1:5 με 40 μl ddH₂O και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

2.14. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μέθοδο παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων για συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και βασίζεται στην δυνατότητα αποχωρισμού των αλυσίδων DNA σε υψηλή θερμοκρασία, αντιγραφής τους παρουσία θερμοανθεκτικής πολυμεράσης (εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων, κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος κ.α.) και επανένωσης σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Όταν ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασιών πραγματοποιηθεί επανειλημμένα, τότε παράγονται εκατομμύρια αντίγραφα από το αρχικό DNA (ή από τμήμα που θέλουμε να ενισχύσουμε). Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι η πιο ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA. Η qPCR προσδιορίζει τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, στηριζόμενη στην ανίχνευση φθορίζουσων χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA.

Για την συγκεκριμένη εργασία, η qPCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ικών νουκλεϊκών οξέων και των επιπέδων έκφρασης κυτταρικών mRNA. Το δείγμα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι το προϊόν της αντίδρασης RT, ή οι διάφορες μορφές HBV DNA που απομονώνονται. Σε σωληνάκια qPCR (0,1 ml PCR-

Tubes and Caps for Corbett-System, Kisker) ή πιάτα 96 θέσεων (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL, Applied Biosystems), τοποθετούμε 1-2 μl δείγματος, αραιωμένο κατά 1:1-1:100, ανάλογα με το προϊόν που θα ποσοτικοποιηθεί και την αρχική του ποσότητα στο δείγμα. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 4,5 μl με ddH₂O. Για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται 3 αντιδράσεις. Στη συνέχεια, ανά φιαλίδιο προστίθενται 5,5 μl από μίγμα το οποίο περιέχει 5 μl αντιδραστηρίου 2x SYBR Green Master Mix (KAPA) και 0,25 μl από κάθε εξειδικευμένο ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, ανάστροφο (reverse-R) και πρόσθιο (forward-F), συγκέντρωσης 10 pmol/μl, συγκεκριμένους, είτε για το ιικό ή το κυτταρικό RNA. Τα φιαλίδια τοποθετούνται στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή Corbett Rotor-Gene 6000 System στο πρόγραμμα Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 για 40 κύκλους ή το ViiA 7 Real-Time PCR στο Standard Programme.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων RNA/DNA σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (control) χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη για κάθε ζεύγος εκκινητών, η οποία αποτελείται από 5 διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος αναφοράς (0,25, 0,5, 1, 2 ή 4 μl δείγματος). Εναλλακτικά, η συσχέτιση γίνεται με τη μέθοδο ΔΔCt, στην οποία τα επίπεδα του γονιδίου συσχετίζονται με τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς.

Τα δείγματα τοποθετούνται στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή Rotor-Gene 6000 (Corbett/Qiagen), και το πρόγραμμα ρυθμίζεται με το λογισμικό Rotor-Gene Q Series Software v2.1.0 στις εξής συνθήκες:

- Παραμονή (Hold): 95 °C, 3 min
- Κυκλοποίηση (Cycling) x40 φορές: 95 °C, 10 sec (αποδιάταξη)
60/65 °C, 20 sec (πρόσδεση, °C ανάλογα το T_m των εκκινητών)
72 °C, 15 sec (επιμήκυνση, μέτρηση στο Πράσινο κανάλι)
- Καμπύλη αποδιάταξης (Melt curve): 72-95 °C, 1°C/βήμα, μέτρηση στο Πράσινο κανάλι

Για τον HBV DNA χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής ViiA7 (Applied Biosystems) και το πρόγραμμα ρυθμίζεται με το λογισμικό QuantStudio Real-Time PCR Software v1.3 στις εξής συνθήκες:

- Παραμονή (Hold): 50 °C, 2 min
95 °C, 10 min
- Κυκλοποίηση (Cycling) x40 φορές: 95 °C, 15 sec (αποδιάταξη)
60 °C, 1min (πρόσδεση/επιμήκυνση, μέτρηση)
- Καμπύλη αποδιάταξης (Melt curve): 60-95 °C, 0,05 °C/ sec, (μέτρηση)

Με τη χρήση των αντίστοιχων λογισμικών, τα δεδομένα που προκύπτουν εξάγονται σε αρχείο excel, όπου γίνεται η ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων κανονικοποιούνται ως προς τα σταθερά εκφραζόμενα γονίδια αναφοράς YWHAZ για RNA και Κυκλίνη A2 (Cyclin-A2 - CCNA2) για DNA. Για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δεξ Υλικά.

2.15. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων. Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση 0,5x. Ανάλογα με την ποσότητα αγαρόζης που χρησιμοποιείται κατά περίπτωση, ο όγκος του διαλύματος TAE 0,5x κυμαίνεται από 100 έως 300 ml. Σε αυτό προστίθεται 0,9-2% αγαρόζη, σύμφωνα με το μέγεθος των τμημάτων DNA ή RNA που θα αναλυθούν. Μόρια νουκλεϊκών οξέων με μικρότερο μέγεθος διαχωρίζονται σε πηκτώματα με μεγαλύτερο ποσοστό αγαρόζης και αντιστρόφως.

Το μίγμα αγαρόζης-TAE θερμαίνεται έως ότου το μίγμα γίνει εντελώς διαυγές. Αφού φτάσει σε ανεκτή θερμοκρασία (40-45 °C), προστίθενται 1-3 μl 10 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) και το μίγμα αναδεύεται. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων των νουκλεϊκών οξέων και έχει την ιδιότητα να φθορίζει κατά την έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία. Αφού προστεθεί το βρωμιούχο αιθίδιο, αφήνουμε το πήκτωμα να στερεοποιηθεί σε κατάλληλο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ειδικό χτένι με σκοπό το σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης των δειγμάτων. Μετά την σταθεροποίηση του πηκτώματος το χτένι αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται στη συσκευή TAE 0,5x έως ότου καλυφθούν τα ηλεκτρόδια της συσκευής και κλείσει το κύκλωμα. Τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται έτσι ώστε τα πηγάδια του πηκτώματος να βρίσκονται προς την άνοδο,

συνεπώς το αρνητικά φορτισμένο DNA να κινηθεί προς την θετικά φορτισμένη κάθοδο.

Στα δείγματα προστίθεται 6x διάλυμα χρώσης σε τελική αραίωση 1x. Ως μάρτυρας μεγέθους χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pPB2017, το οποίο έχει υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI ή PstI, έτσι ώστε να προκύψουν οι ζώνες με μοριακά βάρη 8700 bp, 3500 bp, 2700 bp, 1700 bp, 805 bp, 540 bp.

Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα ~100 V μέχρι να διαχωριστούν επαρκώς οι ζώνες. Τα δείγματα παρατηρούνται σε θάλαμο με UV λάμπα μέσω κάμερας (Bio-Rad) και λαμβάνονται φωτογραφίες με την κατάλληλη έκθεση, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Quantity One (Bio-Rad).

- **TAE 50x:**
 - 242 gr Tris-HCl
 - 57,1 ml glacial acetic acid
 - 100 ml EDTA
 - 0,5 M pH 8.0
 - dH₂O μέχρι τελικό όγκο 1 lt
- **6x διάλυμα χρώσης**
 - 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης
 - 0.25% κυανούν της ξυλόλης
 - 30 % γλυκερόλη

2.16. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page

Τα δείγματα συλλέγονται έπειτα από λύση των κυττάρων για πρωτεΐνη. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών μεγαλώνουν σε πλάκες 12 πηγαδιών, ξεπλένονται στο πιάτο καλλιέργειας με PBS 1x δις και στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε δείγμα 80 μl από ειδικό διάλυμα λύσης (protein lysis buffer), το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση:

- P-Buffer 1x (20 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,2% TritonX-100)
- αναστολείς πρωτεασών Protease Inhibitor Coctail 1x (PIC, Roche)
- αναστολείς φωσφατασών PHOS-STOP 1x (Roche)
- 2 mM DTT

Το διάλυμα παρασκευάζεται κάθε φορά πριν από τη λύση (δεν διατηρείται σε συνθήκες ψύξης-κατάψυξης). Τα δείγματα συλλέγονται σε eppendorf 1,5 ml, ποσοτικοποιούνται με μέθοδο Bradford, κι έπειτα διαχωρίζονται σε πήκτωμα

ακρυλαμίδης. Για την κατασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 12% (separating gel) σε τελικό όγκο 15 ml, χρησιμοποιούνται τα παρακάτω υλικά:

- ddH₂O: 4,935 ml
- Buffer Tris – HCl pH 8,8 (Merck): 3,75 ml
- 30% ακρυλαμίδη/δισ-ακρυλαμίδη (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, Applichem): 6 ml. Φυλλάσσεται στους 4 °C σε ειδικό μπουκάλι διότι είναι φωτοευαίσθητο.
- 10% διάλυμα SDS (Applichem): 150 μl
- 10% διάλυμα APS (Ammonium Persulfate): 150 μl
Παρασκευάζεται με προσθήκη 1 g APS σε 10 ml απεσταγμένου νερού.
- Αντιδραστήριο Temed, (Applichem): 15 μl

Το μίγμα τοποθετείται ανάμεσα στα δύο ειδικά τζάμια Mini-PROTEAN Short Plates (Bio-Rad) και Mini-PROTEAN Spacer Plates 1.5 mm (Bio-Rad), μέχρι συγκεκριμένο σημείο (2/3 ύψους των τζαμιών). Αμέσως πάνω από το πηκτώμα αφήνεται περίπου 1 ml ισοπροπανόλης, ώστε να δημιουργηθεί το επάνω μέρος του τζελ να είναι επίπεδο χωρίς φυσαλίδες ή δυσμορφίες και τα δείγματα να τρέξουν ομοιόμορφα. Το separating gel αφήνεται να πήξει. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται το stacking gel, που συμπληρώνει τον υπόλοιπο χώρο από το separating gel μέχρι την κορυφή των τζαμιών (1/3 ύψους των τζαμιών), σε όγκο 6 ml, με σύσταση:

- ddH₂O: 3,574 ml
- Buffer Tris – HCl pH 6,8 (Merck): 1,5 ml
- 30% ακρυλαμίδη/δισ-ακρυλαμίδη (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, Applichem): 800 μl
- 10% διάλυμα SDS (Applichem): 60 μl
- 10% διάλυμα APS (Ammonium Persulfate): 60 μl
- Αντιδραστήριο Temed, (Applichem): 6 μl

Μόλις το separating gel πήξει, η ισοπροπανόλη αφαιρείται. Προστίθεται το stacking gel κι αμέσως μετά εφαρμόζεται ένα ειδικό χτένι (Mini-PROTEAN Comb, 10-well, 1.5 mm, 66 μl, Bio-Rad). Είναι αυτό που θα σχηματίσει, κατά την πήξη του τζελ, τα πηγάδια στα οποία θα τρέξουν τα δείγματα. Αναμονή μέχρι την πλήρη πήξη του stacking gel.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει φόρτωμα των πηγαδιών με διάλυμα λυμένων κυττάρων, με συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 20-30 µg. Στα 20 µl του προς φόρτωμα δείγματος, προστίθενται 4 µl μίγματος 6x laemmli buffer και 1:80 β-μερκαπταιθανόλης. Η συσκευή γεμίζει με running buffer, με σύσταση:

- **Running Buffer**

3,3 gr/L Tris base

14,41 gr/L γλυκίνη

10 gr/L SDS

- **6x laemmli buffer**

12% SDS

300 mM Tris-HCl 1M pH 6,8

0,6% μπλε της βρωμοφαινόλης

60% γλυκερόλη

- Ακολουθεί ο βρασμός στους 100 °C όλων των δειγμάτων για τρία λεπτά, με σκοπό την αποδιάταξη όλων των πρωτεϊνών. Στο πρώτο πηγάδι τοποθετείται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας (marker) Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs) με μοριακά βάρη 245, 190, 135, 100, 80, 58, 46, 32, 25, 22, 17 και 11 kDa κι έπειτα κατά σειρά τα δείγματα. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, η συσκευή συμπληρώνεται με running buffer και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V για περίπου δύο ώρες.

2.17. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μέσω της υγρής μεταφοράς (wet transfer). Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το stacking gel αποκόπτεται προσεκτικά και το τμήμα του πηκτώματος που αποτελεί το separating gel τοποθετείται μέσα σε δοχείο με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), που παρασκευάζεται ως εξής:

- **Running Buffer**

2,9 gr/L Γλυκίνη

5,8 gr/L Tris base

0,37 gr/L SDS

20% μεθανόλη

Αφού διαβραχούν, τοποθετούνται από κάτω προς πάνω ένα σφουγγάρι, 2 χαρτιά Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran 0.45 NC nitrocellulose, Amersham) κομμένη στο μέγεθος του τζελ, το πήκτωμα, 2 ακόμα χαρτιά Whatman και επιπλέον ένα σφουγγάρι σε ειδική κασέτα (Mini Gel Holder Cassette, Bio-Rad), η οποία τοποθετείται σε συσκευή μεταφοράς. Η κασέτα με την νιτροκυτταρίνη πρέπει να είναι πάντα προσανατολισμένη προς την άνοδο, αφού οι πρωτεΐνες του πηκτώματος είναι αρνητικά φορτισμένες και άρα κινούμενες προς την άνοδο θα κινηθούν και προς την νιτροκυτταρίνη. Στην συσκευή εφαρμόζεται σταθερή ένταση ρεύματος 300 mA για 2 ώρες, ενώ η συσκευή βρίσκεται στους 4 °C καθ'όλη τη διάρκεια, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση.

2.18. Ανοσοστύπωση τύπου Western

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, η μεμβράνη απομακρύνεται από την κασέτα και ξεπλένεται με PBS 1x. Έπειτα η μεμβράνη χρωματίζεται με διάλυμα Ponceau S, ώστε να εμφανιστούν οι ζώνες που σχημάτισαν οι πρωτεΐνες. Το Ponceau ξεπλένεται με PBS 1x και η μεμβράνη τοποθετείται σε χαρτί, όπου σημειώνονται οι ζώνες του marker. Η μεμβράνη επώάζεται για 1 ώρα υπό ανακίνηση σε διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων (Blocking buffer ή Διάλυμα BSA για αντισώματα που αναγνωρίζουν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες). Το διάλυμα κάλυψης αφαιρείται και προστίθεται το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε κατάλληλο διάλυμα γάλακτος ή BSA για τα αντισώματα έναντι φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Τα τρυβλία αφήνονται υπό ανακίνηση στους 4 °C όλη νύχτα καλυμμένα με το αντίσωμα.

Την επόμενη μέρα οι μεμβράνες ξεπλένονται 3 φορές με διάλυμα 1% γάλα-PBS-Tween και έπειτα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% γάλα-PBS-Tween το οποίο είναι anti-mouse ή anti-rabbit αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση HRP (horseradish peroxidase-conjugated antibodies, Cell Signalling) σε αραίωση

1:1000. Οι μεμβράνες αφήνονται υπό ανακίνηση για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος ξεπλένονται 3 φορές με 1% γάλα-PBS-Tween και μία ακόμη φορά με PBS 1x. Σε σκοτεινό θάλαμο, οι μεμβράνες επωάζονται με μίγμα εμφανιστικών διαλυμάτων (LumiSensor, Chemiluminescent H

- **Ponceau S**

0,2% Ponceau S

4% τριχλωροξικό οξύ (C₂HCl₃O₂)

- **Διάλυμα γάλακτος**

1% γάλα και

0,02% Tween20 σε PBS 1x

- **Blocking buffer:**

5% γάλα σκόνη

0,02% Tween-20 σε PBS 1x

- **Διάλυμα BSA**

1% BSA

0,02% Tween-20 σε PBS 1x

2.19. Υποκυτταρική κλασματοποίηση

Για την υποκυτταρική κλασματοποίηση των κυτταροπλασματικών, μεμβρανικών πυρηνικών και μετα-πυρηνικών κλασμάτων, χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος που βασίζεται στη χρήση λυτικών διαλυμάτων με απορρυπαντικά αυξανόμενης ισχύος. Ανασηκώνουμε τα κύτταρα που έχουμε στρώσει σε δοχείο καλλιέργειας F75 με θρυψίνη, τοποθετούμε σε falcon των 15 ml και φυγοκεντρούμε για 5 min στις 800 rpm. Κάνουμε μια πλύση με PBS 1x και φυγοκεντρούμε ξανά για 5 min στις 800 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και λύνουμε τα κύτταρα με 400 μl με Buffer Digitonin. Αφήνουμε να ανακινούνται για 10 min σε ρότορα στους 4 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στα 2.000 g στους 4 °C. Από το υπερκείμενο λαμβάνουμε το κλάσμα του κυτταροπλάσματος (cytosolic proteins).

Το ίζημα πλένεται μια φορά με 200 μl PBS 1x και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 min στα 2.000 g στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, το ίζημα λύνεται με 400 μl Buffer Nonidet P40 και αφήνεται για 30 min σε ρότορα στους 4 °C. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στα 7.000 g στους 4 °C. Από το υπερκείμενο λαμβάνουμε το μεμβρανικό κλάσμα (membrane fraction).

Το ίζημα πλένεται μια φορά με 200 μl PBS 1x και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 min στα 2.000 g στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, το ίζημα λύνεται με 400 μl Buffer RIPA στο οποίο προστίθενται 1 U/ml (10 μl) RQ1 DNase (Promega) και αναστολείς πρωτεασών Protease Inhibitor Coctail 1x (PIC, Roche). Αφήνεται για 1 h σε ρότορα στους 37 °C ή για ένα βράδυ σε ρότορα στους 4 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στα 7.000 g στους 4 °C. Από το υπερκείμενο λαμβάνουμε το πυρηνικό κλάσμα (nuclear fraction).

Το ίζημα πλένεται μια φορά με 200 μl PBS 1x και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 5 min στα 2.000 g στους 4 °C. Το υπερκείμενο αφαιρείται, το ίζημα λύνεται με 400 μl Buffer E-RIPA, στο οποίο προστίθενται αναστολείς πρωτεασών PIC 1x και ακολουθεί έντονο Vortex και βράσιμο για 10 min. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 13.000 rpm στους 4 °C. Από το υπερκείμενο λαμβάνουμε το αδιάλυτο μετά-πυρηνικό κλάσμα 1 (post-nuclear fraction 1) και από τη λύση του ιζήματος με ~25 μl Laemmli Buffer το αδιάλυτο μετά-πυρηνικό κλάσμα 2 (post-nuclear fraction 2).

Όλα τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C και πριν χρησιμοποιηθούν ανακινούνται έντονα.

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Buffer Digitonin
150 mM NaCl
50 mM HEPES pH 7,5
320 μM Digitonin | <ul style="list-style-type: none">• Buffer Nonidet P40
150 mM NaCl
50 mM HEPES pH 7,5
1% NP40 |
| <ul style="list-style-type: none">• Buffer RIPA
150 mM NaCl
50 mM HEPES pH 7,5
0,5% Sodium deoxycholate
0,1% SDS
1 U/ ml DNase (προστίθεται λίγο πριν τη χρήση)
Protease Inhibitor Coctail 1x (PIC, Roche) | <ul style="list-style-type: none">• Buffer E-RIPA
150 mM NaCl
50 mM HEPES pH 7,5
0,5% Sodium deoxycholate
0,1% SDS
100 mM DTT |
| <ul style="list-style-type: none">• Laemmli Buffer (6x loading buffer) δεξ 2.16 | |

2.20. Εισαγωγή νουκλεϊκού οξέος σε κύτταρα θηλαστικών με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Με τη μέθοδο αυτή, εισάγεται υικό γενετικό υλικό σε κύτταρα. Τα κύτταρα εκτίθενται σε παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου, όμως μικρής διάρκειας, γίνεται αποσταθεροποίηση της μεμβράνης και δημιουργούνται στιγμιαία μεμβρανικοί πόροι, οι οποίοι επιτρέπουν στο εκάστοτε νουκλεϊκό οξύ να εισέλθει στο κύτταρο. Ωστόσο, η εφαρμογή των παλμών πρέπει να είναι τέτοιας έντασης ώστε να μην προκληθεί στα κύτταρα μόνιμη βλάβη.

Για κάθε δείγμα, $4 \cdot 10^6$ κύτταρα από ανακαλλιέργεια μεταφέρονται σε falcon των 15 ml. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 800 rpm για 5 λεπτά και το ίζημα των κυττάρων ξεπλένεται με 3-4 ml PBS 1x. Γίνεται επαναδιάλυση τους με τη βοήθεια του διαλύματος κι ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 800 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου με αντλία κενού.

Μετά και την δεύτερη φυγοκέντρηση, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε διάλυμα Cytomix, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί 2 mM ATP και 5 mM γλουταθειόνη. Για κάθε δείγμα RNA(HCV) απαιτούνται 400 μ L Cytomix με 1:50 ATP και 1:50 γλουταθειόνη. Στο μεταξύ, για κάθε δείγμα για το οποίο θα γίνει ηλεκτροδιάτρηση, 12 mL 10% πλήρους θρεπτικού τοποθετούνται σε falcon των 50 mL. Σε erpendorf του 1,5 mL τοποθετούνται 10 μ g από το RNA που θέλουμε να εισάγουμε στα κύτταρα. Έπειτα, προσθέτουμε στο σωληνάκι 400 μ l από το μίγμα κυττάρων, Cytomix, γλουταθειόνης και ATP. Γίνεται καλή ανάμειξη και το το μίγμα μεταφέρεται σε στείρα κυβέττα ηλεκτροδιάτρησης (0,4 cm gap/ Biorad). Η κυβέττα τοποθετείται στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης GenePulser XCell (Biorad), που είναι ρυθμισμένο σε συνθήκες 975 μ F και 270 V.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, το μίγμα μεταφέρεται στο falcon των 50 mL με το θρεπτικό υλικό και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur γίνεται διαχωρισμός των κυττάρων τα οποία έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα, μετά την άσκηση υψηλού ηλεκτρικού πεδίου.

- **Cytomix pH 7,6**

120 mM KCl
0,15 mM CaCl₂
10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6
25 mM HEPES
5 mM MgCl₂
2 mM EGTA

Το Cytomix φιλτράρεται με σύριγγα σε φίλτρα 0.2 μm και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται σε στείρες συνθήκες κυττάρων (θάλαμος νηματικής ροής).

2.21. Παραγωγή ιού από το stock, τιτλοποίηση και μόλυνση

2.21.1. Παραγωγή του ιού HCV

Για την παραγωγή ικού στοκ του HCV (JC1, JcR2A), το RNA που παράχθηκε με μεταγραφή *in vitro*, εισάγεται σε κύτταρα Huh7-Lunet με ηλεκτροδιάτρηση. Τα κύτταρα στρώνονται σε πιάτο 100 mm και το υπερκείμενο της καλλιέργειας συλλέγεται στις 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης. Το υπερκείμενο της καλλιέργειας που φέρει τον ιό, συλλέχθηκε και φιλτραρίστηκε με φίλτρα 0,45 μM για διαχωρισμό των νεκρών κυττάρων. Ακολούθησε συμπύκνωση με υπερφυγοκέντρηση σε κλίση πυκνότητας iodixanol (Optiprep, Axis-Shield). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 3 ml 28% Optiprep αραιωμένο σε DMEM (σκέτο, χωρίς αντιβιοτικά ή ορό) και 4 ml 10% Optiprep αραιωμένο σε PBS 1x τα οποία τοποθετήθηκαν με τη σειρά χωρίς να διαταραχθούν οι δύο φάσεις σε σωλήνες Thinwall Ultraclear (38,5 ml, Beckman Coulter) κατάλληλα για τη φυγόκεντρο. Τέλος προστέθηκαν 30 ml από το φιλτραρισμένο υπερκείμενο ικής καλλιέργειας και ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση σε κεφαλή SW28 στις 25.000 rpm (~80.000 g) για 4 ώρες στους 4 °C. Ο ιός βρίσκεται στη διαχωριστική επιφάνεια (τα ενδιάμεσα 4 ml) και την κάτω φάση (αρχικά 3 ml). Συλλέγουμε προσεκτικά το υπερκείμενο (30 ml), το διάμεσο υγρό (interface-4 ml) και τέλος το υγρό προστασίας (cushion-3 ml) σε ξεχωριστά σωληνάκια. Το διάμεσο υγρό και η κάτω φάση με τον ιό φυγοκεντρούνται περαιτέρω με φίλτρα Amicon Ultra 15 (Merck-Millipore) στις 4.000 rpm τόση ώρα όσο χρειάζεται για να πέσει ο όγκος του από 15 ml σε 500 μl-1 ml. Το συμπυκνωμένο ικού στοκ μοιράζεται σε aliquots των 100 μl και φυλάσσεται στους -80 °C.

2.21.2. Τιτλοποίηση HCV JC1

Χρήση νέου και παλιού ιού HCV γνωστού τίτλου μολυσματικότητας για μόλυνση κυττάρων, λύση τους για πρωτεΐνη και ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Συγκριτικά με τον παλιό τίτλο και την εικόνα που δίνει, υπολογίζουμε τον τίτλο του παραγμένου ιού.

2.21.3. Μόλυνση των κυττάρων με HCV

Κύτταρα Huh7.5 στρώνονται σε πλάκες πολλαπλών πηγαδιών σε πυκνότητα ~30% και αφήνονται να καλλιεργηθούν για 18 ώρες. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται ο ιός αραιωμένος σε πλήρες DMEM, ώστε να φτάσει το επιθυμητό MOI, το οποίο προσδιορίζει τον αριθμό των σωματιδίων που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο, τον ιικό τίτλο και τον αριθμό των κυττάρων. Ο ιός προστίθεται στα πηγάδια, σε όγκο μικρότερο από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε κατά την επίστρωση των κυττάρων, για να γίνει πιο γρήγορα και αποτελεσματικά η μόλυνση. Η μόλυνση μένει στον επωαστικό θάλαμο, στους 37 °C με 5% CO₂, για 4 ώρες. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνεται και στα κύτταρα προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα λύνονται μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετά τη μόλυνση (24, 48, 72 h.p.i- hours post infection) και με το κατάλληλο διάλυμα λύσης.

2.21.4. Παραγωγή του ιού HBV

Σε μεγάλες φλάσκες (F175) γίνεται επίστρωση 15 ml κολλαγόνου 50 mg/ml (Corning) για 1-2 ώρες. Έπειτα, το κολλαγόνο αφαιρείται και στρώνονται κύτταρα HepAD38, τα οποία έχουν την ιδιότητα έκφρασης του γονιδιώματος του HBV που ρυθμίζεται από την παρουσία ή όχι τετρακυκλίνης. Τα κύτταρα καλλιεργούνται αρχικά στο πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM/F12 κι επωάζονται στους 37 °C με 5% CO₂. Την επόμενη μέρα αντικαθιστούμε το θρεπτικό υλικό με πλήρες William's Medium E, που περιέχει DMSO. Η παρουσία 2% DMSO προκαλεί διαφοροποίηση στα κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν αναστολή της αύξησης με επαφή. Επιστρέφουμε τα κύτταρα στον θάλαμο επώασης και συλλέγουμε το υπερκείμενο κάθε 7^η μέρα για 7 συναπτές εβδομάδες, κατά τη διάρκεια των οποίων η κατάσταση των κυττάρων βρίσκεται υπό προσεκτική παρακολούθηση.

Το υπερκείμενο που κρατήθηκε κάθε βδομάδα περνά από φίλτρο 0,22 μM (Millipore) και έπειτα προστίθεται σε αυτό διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG 50% αραιωμένο σε PBS 1x), τόσο ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να φτάνει το 5% για να κατακρημνιστούν τα ιικά σωματίδια. Ακολουθεί αργή ανακίνηση με το χέρι, μέχρι να διαλυθεί καλά το διάλυμα με το μεγάλο ιξώδες, κι έπειτα επώαση του μίγματος στους 4 °C κατά τη διάρκεια της νύχτας.

Την επόμενη μέρα, το μίγμα μοιράζεται σε falcons των 50 ml, τα οποία φυγοκεντρώνονται στις 4.000 rpm, στους 4 °C για μία ώρα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προσθέτουμε 1ml πλήρες DMEM για να επαναιωρήσουμε το πέλλετ που δημιουργήθηκε και αφήνουμε στους 4 °C για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα γίνεται καλή επαναδιάλυση του πέλλετ με τη βοήθεια πιπέτας, κι αφήνεται ακόμα ένα βράδυ στους 4 °C υπό ανάδευση. Μία ημέρα μετά, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για δέκα λεπτά και κρατιέται μόνο το υπερκείμενο που θα αποτελέσει το ιικό στοκ που θα χρησιμοποιηθεί στα πειράματα (απομάκρυνση PEG πέλλετ). Τα ιικά στοκ φυλάσσονται στους -80°C.

- **Πλήρες William's Medium E**

William's Medium E (Gibco)
5% v/v Fetal Bovine Serum-FBS
2 mM L-Glutamine
100 U/ml Penicillin
100 μg/ml Streptomycin
2% DMSO
350 μg/ml Hydrocortisone (STEMCELL)
5 μg/ml Insulin (Sigma)

- **Πλήρες DMEM/F12**

DMEM/F12 (Gibco)
10% v/v Fetal Bovine Serum-FBS
2 mM L-Glutamine
0,1 mM Non-essential Amino Acids-NEAA
100 U/ml Penicillin
100 μg/ml Streptomycin

2.21.5. Τιτλοποίηση του ιού HBV

Η τιτλοποίηση του HBV γίνεται με χρήση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR) απευθείας στο ιικό στοκ. Πιο συγκεκριμένα, το ιικό rcDNA που βρίσκεται εντός των καψιδίων, απομονώνεται με το QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen), βάσει του πρωτοκόλλου της εταιρείας, όπου:

- Ανάμειξη 20 μl ικού στοκ, 180 μl PBS 1x, 20 μl πρωτεΐνάση K και 200 μl Buffer AL
- Επώαση στους 56 °C για 10 min, με σκοπό την καταστροφή των ικών σωματιδίων
- Προσθήκη 200 μl 100% αιθανόλης και μεταφορά σε στήλη
- Φυγοκέντρηση στα 6.000 g για 1 min
- Προσθήκη 500 μl buffer AW1 και φυγοκέντρηση στα 6.000 g για 1min
- Προσθήκη 500 μl buffer AW2 και φυγοκέντρηση στα 6.000 g για 3 min
- Μεταφορά στήλης σε 1,5 ml eppendorf και έκλουση του DNA με 100 μl buffer AE
- Επώαση 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στα 6.000 g για 1 min

Έπειτα, ποσοτικοποιούμε το απομονωμένο DNA με Real-Time qPCR και η συγκέντρωση υπολογίζεται σύμφωνα με διαδοχικές αραιώσεις του πλασμιδίου HBVrawy1.2, γνωστής συγκέντρωσης. Ο τίτλος του ικού στοκ υπολογίζεται σε αντίγραφα ανά ml (genome equivalent: copies/ml).

Επιπλέον κάναμε έλεγχο με έμμεσο ανοσοφθορισμό (δες 2.22) για το ικό στοκ κάθε εβδομάδας.

2.21.6. Μόλυνση των κυττάρων με HBV

Για την μόλυνση με HBV χρησιμοποιούνται τα κύτταρα HepG2-NTCP, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα NTCP του ιού και καλλιεργούνται παρουσία πουρομυκίνης. Τα κύτταρα στρώνονται σε πλάκες 24 πηγαδιών, με $6 \cdot 10^4$ κύτταρα ανά πηγάδι. Την επόμενη ημέρα, το πλήρες DMEM αφαιρείται και προστίθεται ιός αραιωμένος σε πλήρες DMEM, παρουσία 2% DMSO και 4% PEG. Για τον HBV συνήθως χρησιμοποιείται MOI = 1000 genome equivalent/κύτταρο. Τα κύτταρα επωάζονται με τον ιό για 24 ώρες και έπειτα γίνονται δύο πλύσεις με PBS 1x, για απομάκρυνση του PEG, και προστίθεται νέο πλήρες θρεπτικό DMEM παρουσία 2% DMSO. Η επώαση των κυττάρων στον κλίβανο, στους 37 °C με 5% CO₂, συνεχίζεται μέχρι τη λύση τους, 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (hours post infection - h.p.i).

Για κάθε δείγμα ενός πειράματος που μελετάται για τον HBV αντιστοιχούν δύο πηγάδια στο πιάτο καλλιέργειας. Το ένα λύνεται για RNA και το δεύτερο για DNA. Από το δείγμα του DNA γίνεται φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 4 λεπτά στους 4 °C και προκύπτει το κυτταροπλασματικό κλάσμα και το κλάσμα των πυρήνων

(πέλλετ) το οποίο πλένεται μία φορά με PBS 1x, φυγοκεντρείται ξανά και το υπερκείμενο αφαιρείται. Όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των υπερκειμένων, αποθηκεύονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

- **Διάλυμα λύσης για DNA:**

10 mM TrisHCl pH 7,5

1 mM EDTA

50 mM NaCl

8% Sucrose

0,375% NP40

2.21.7. Απομόνωση ιικού DNA από πυρηνικό και κυτταροπλασματικό κλάσμα λύσης

Στα πηγάδια με κύτταρα που λύνονται για DNA προστίθεται 1 ml διάλυμα λύσης και αφήνουμε στον επωαστικό θάλαμο στους 37 °C για 10 min. Έπειτα, φυγοκεντρούμε στις 13.000 rpm για 4 λεπτά στους 4 °C και προκύπτει το κυτταροπλασματικό κλάσμα και το κλάσμα των πυρήνων (πέλλετ). **Απομόνωση ιικού DNA από πυρηνικό κλάσμα**

Το πυρηνικό κλάσμα (πέλλετ) πλένεται μία φορά με PBS 1x, φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο αφαιρείται. Στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε δείγμα 500 μl διαλύματος λύσης πυρήνων και αφήνεται στον επωαστικό θάλαμο στους 37 °C για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 250 μl KCl 2,5 M και αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά. Συνεχίζουμε με το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA με φαινόλη/ χλωροφόρμιο/ αιθανόλη 70% (βλ. 2.1). Τέλος επαναδιαλύουμε σε 100 μl ddH₂O.

2.21.7.2. Απομόνωση ιικού DNA από κυτταροπλασματικό κλάσμα

Προσθέτουμε στο κυτταροπλασματικό κλάσμα 6 μl MgCl 1M, 10 μl DNase 1 (10 mg/ml) και 5 μl RNase (10 mg/ml) και αφήνουμε να επωαστεί στους 37 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 330 μl από το διάλυμα κατακρήμνισης των καψιδίων, αφήνουμε να επωαστεί για 30 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στους 4 °C στις 13.000 rpm για 4 λεπτά. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε

2 μl Tris pH 7,5 1M, 1,2 μl MgCl 1M, 10 μl DNase και ddH₂O τόσο ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 200 μl, ανακατεύουμε καλά και αφήνουμε στους 37 °C για 15 min. Προσθέτουμε 2,2 μl EDTA 0,5 M (σημαντικό για να εμποδίσει τη δράση της DNase να αποικοδομήσει το DNA) καθώς επίσης και 100 μl διαλύματος Proteinase K, 12,5 μl Proteinase K και ddH₂O τόσο ώστε ο

- **Διάλυμα λύσης πυρήνων**

50 mM TrisHCl pH 8
10 mM EDTA
150 mM NaCl
1% SDS

- **Διάλυμα κατακρήμνισης των καψιδίων**

1,4 M NaCl
25 mM EDTA
26% PEG 8000

- **Διάλυμα Proteinase K**

250 mM TrisHCl pH 8
50 mM EDTA
250 mM NaCl
1% SDS

επωάζουμε το μίγμα στους 37 °C για τουλάχιστο απομόνωσης DNA με φαινόλη/ χλωροφόρμιο/ γλυκογόνο (βλ. 2.1). Τέλος επαναδιαλύουμε σε 1

2.22. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Η μεθοδολογία βασίζεται στη χρήση φθοριοχρωμάτων, δηλαδή φθοριζουσών χρωστικών, που εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Τα φθοριοχρώματα αυτά είναι συνδεδεμένα με την Fc περιοχή αντισωμάτων χωρίς να επηρεάζουν την ειδικότητά τους.

Κύτταρα στρώνονται σε πιάτο καλλιέργειας των 24 πηγαδιών στον πυθμένα των οποίων έχουν τοποθετηθεί κυκλικά τζαμάκια, πάνω στα οποία θα καλλιεργηθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα, 24 ώρες μετά την επίστρωση τους στο πιάτο θα μολυνθούν με τον ιό μελέτης ή όχι (Control).

Μετά από συγκεκριμένο χρόνο (π.χ. μόλυνση με HBV-μια εβδομάδα), τα πηγάδια ξεπλένονται 2 φορές με PBS 1x και τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 4% παραφορμαλδεύδη (PFA, Sigma) διαλυμένη σε PBS 1x, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με PBS 1x.

Την επόμενη μέρα, το PBS 1x αφαιρείται και τα τζαμάκια μεταφέρονται εκτός πηγαδιού, με προσοχή, ώστε τα κύτταρα να βρίσκονται πάντα προς τα πάνω. Γίνεται επώαση των κυττάρων με 0,5% Triton X-100 (Fluka) αραιωμένο σε PBS 1x για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε η μεμβράνη των κυττάρων να γίνει διαπερατή. Ύστερα πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με PBS 1x των 10 λεπτών η κάθε μία. Αφού τα τζαμάκια έχουν ξεπλυθεί καλά, τοποθετούνται σε αυτά το anti-HBs 1:1000 διελυμένο σε 5% ορό κασίικας που αραιώνεται σε PBS 1x για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS 1x των 10 λεπτών και τοποθέτηση του δεύτερου αντισώματος συζευγμένου με Alexa-Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific), αραιωμένου 1:1000 σε PBS 1x με 5% ορό κασίικας και αφήνεται για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αυστηρά σε σκοτεινό θάλαμο. Στη συνέχεια γίνεται μια πλύση με PBS 1x και μετά εφαρμόζεται στα τζαμάκια μίγμα από Propidium Iodide 50 µg/ml (Invitrogen) και 1:100 RNase A 100 µg/ml (Invitrogen) για 5 λεπτά σε σκοτεινό θάλαμο. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με PBS 1x και μία τελευταία πλύση με ddH₂O. Εφαρμόζουμε μία σταγόνα Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich), που βρίσκεται σε χαμηλή θερμοκρασία, πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και τοποθετούμε το τζαμάκι με τα κύτταρα προς τα κάτω, ώστε να παγιδευτούν μεταξύ καλυπτρίδας και τζαμιού.

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που φέρουν τα επεξεργασμένα κύτταρα φυλάσσονται στους 4 °C σε σκοτάδι και είναι έτοιμες για παρατήρηση και λήψη εικόνων με μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS SP ορθό συνεστιακό Μικροσκόπιο. Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού και η ανάλυση του συνεντοπισμού πραγματοποιείται με τη χρήση του λογισμικού Icy. Οι συντελεστές συνεντοπισμού Pearson's (Pearson's correlation coefficient) και Manders' (Manders' colocalization coefficients) υπολογίζονται με το Colocalization Studio plugin του λογισμικού Icy.

- **Διάλυμα Mowiol**

2,4 g αντιδραστηρίου Mowiol

6 g γλυκερόλης

6 ml dH₂O, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου

10 ml διάλυμα Tris-HCl 0,2 M pH 8,5

Αανάδευση στους 50 °C για 10 min

2.23. Στατιστική ανάλυση

Σε όλα τα διαγράμματα, οι ράβδοι αναπαριστούν μέσες τιμές από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. Ως στατιστικά σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα για τα οποία η στατιστική ανάλυση με χρήση του Student's t-test ήταν $p \leq 0.05$. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Excel Microsoft Office® ή του Prism (GraphPad).

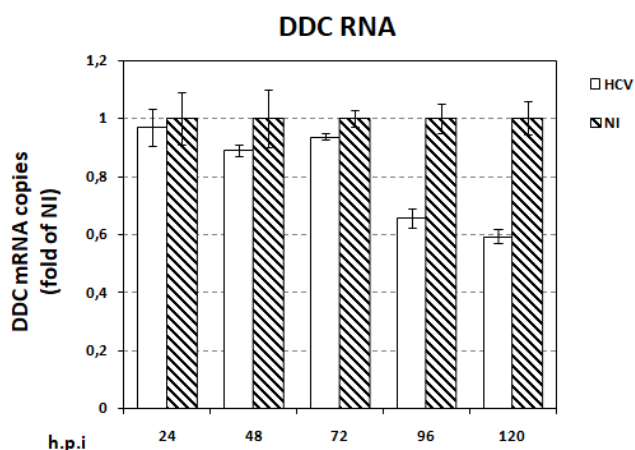
IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV.

Η DDC είναι ένα κυτταρικό ένζυμο που δρα στη βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών, κι εντοπίζεται σε μια σειρά περιφερειακών οργάνων, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, στο οποίο η βιολογική της λειτουργία δεν είναι ακόμα γνωστή. Αν και τα ενζυμικά παράγωγα της DDC ή οι υποδοχείς τους έχουν αναφερθεί πως επηρεάζουν την είσοδο του HCV στο κύτταρο (303, 393) η συμμετοχή της DDC στην ιική αντιγραφή και παθογένεση δεν έχει διερευνηθεί. Σε αυτή τη μελέτη, στόχος είναι να χαρακτηρίσουμε τη σχέση της DDC με τον HCV, χρησιμοποιώντας κύτταρα Huh7.5 έπειτα από επώαση σε κλασικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂) αλλά και σε συνθήκες υποξίας (3% O₂), φυσιολογικές για το ήπαρ.

1.1. Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα mRNA της DDC

Κύτταρα Huh7,5 στρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και επώαστηκαν στο 20% O₂. Έπειτα από 18 ώρες τα μισά πηγάδια σε κάθε πιάτο πολλαπλών πηγαδιών, μολύνθηκαν με τον με HCV JC1, έτσι ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Οι πλάκες με τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες με τον ιό. Έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού με νέο και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω. Λύθηκαν στις 24, 48, 72, 96 και 120 h.p.i με Trizol και αφού απομονώθηκε το ολικό κυτταρικό RNA από κάθε δείγμα, ακολουθήσαμε τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) για την σύνθεση cDNA, από το ολικό κυτταρικό RNA που απομονώθηκε. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για το γονίδιο της DDC και για το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ. Χρησιμοποιήθηκαν τρία τεχνικά αντίγραφα ως ξεχωριστά πειραματικά δείγματα για κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι ο HCV προκαλεί αρνητική ρύθμιση στο mRNA της DDC που ανιχνεύεται μόνο στα τελευταία στάδια της μόλυνσης σε ατμοσφαιρική τάση O₂.

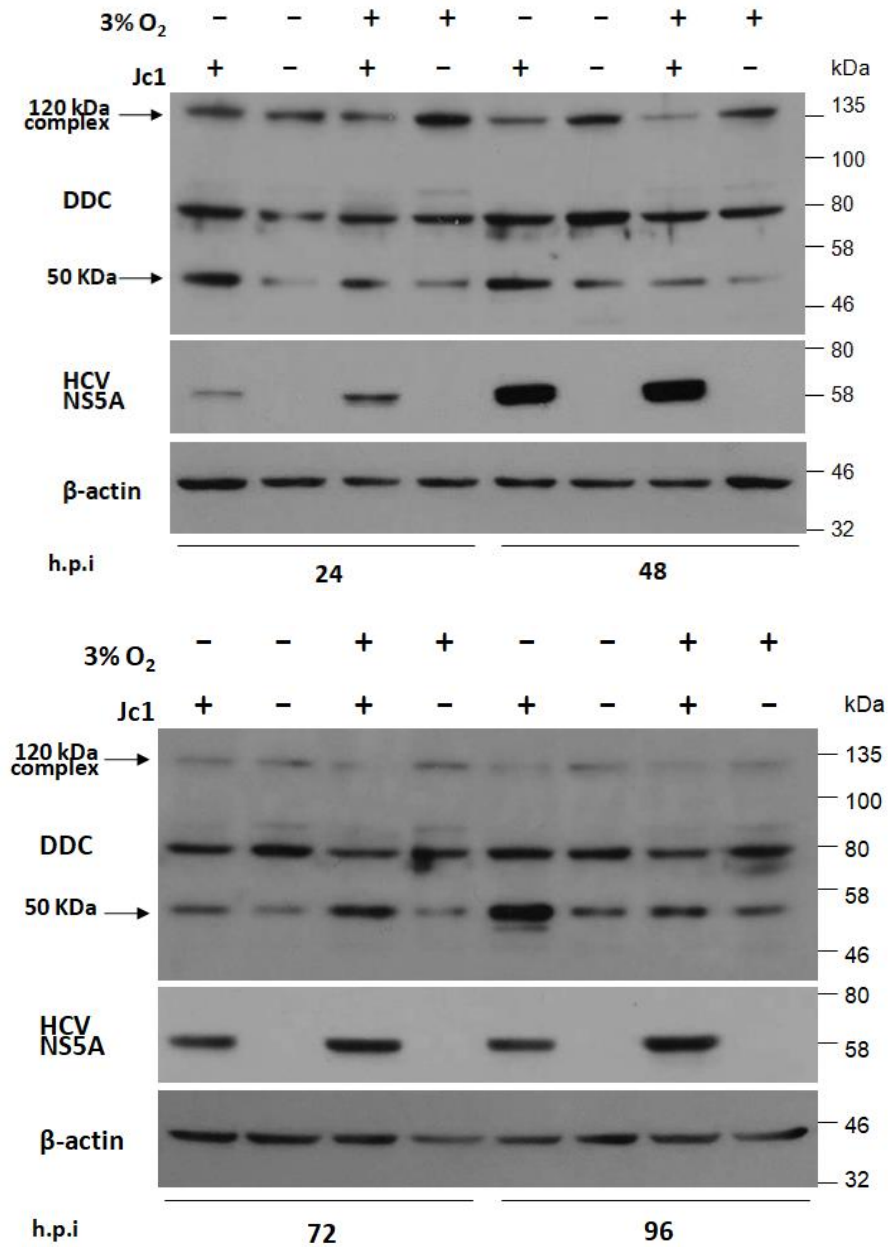


Εικόνα 16: Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα mRNA της DDC στο 20% v/v O₂. Κύτταρα Huh7.5 μολύνθηκαν με HCV (JC1, MOI=1) για 4h, επωάστηκαν περαιτέρω στο 20% O₂ και λύθηκαν για RNA σε συγκεκριμένο χρόνο μετά τη μόλυνση. Ανάλυση RT-qPCR για το ενδοκυττάριο mRNA της DDC από κύτταρα Huh7.5, μολυσμένα με HCV. Τα επίπεδα mRNA του YWHAZ γονιδίου χρησιμοποιήθηκαν για κανονικοποίηση.

1.2. Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα πρωτεΐνης της DDC

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και έπειτα από 18 ώρες τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν με HCV JC1, έτσι ώστε να έχουμε σε παράλληλα μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα για κάθε συνθήκη. Στις 4 h.p.i ο ιός αφαιρέθηκε, σε όλα τα πηγάδια το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με νέο και τα κύτταρα επωάστηκαν για συγκεκριμένο χρόνο. Λύθηκαν στις 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά τη μόλυνση. Τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford κι έπειτα πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC και NS5A, ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene). Το anti-DDC C-T αντίσωμα αναγνώρισε το ~50kDa DDC μονομερές και κάποιες ανθεκτικές στο SDS μορφές της DDC, μια από τις οποίες υποθέτουμε ότι αντιστοιχεί στο ενζυμικά ενεργό διμερές της DDC με μοριακό βάρος 120 kDa. Ο HCV έχει αρνητική επίδραση στο σύμπλοκο των 120 kDa της DDC, ενώ παρατηρείται παράλληλη συσσώρευση του μονομερούς των 50 kDa, με παρόμοια κινητική για τις δύο συνθήκες οξυγόνου. Η επίδραση του ιού είναι ανιχνεύσιμη ήδη από τις 24 ώρες μετά τη μόλυνση στο 20% O₂. Επιπλέον, η ιική

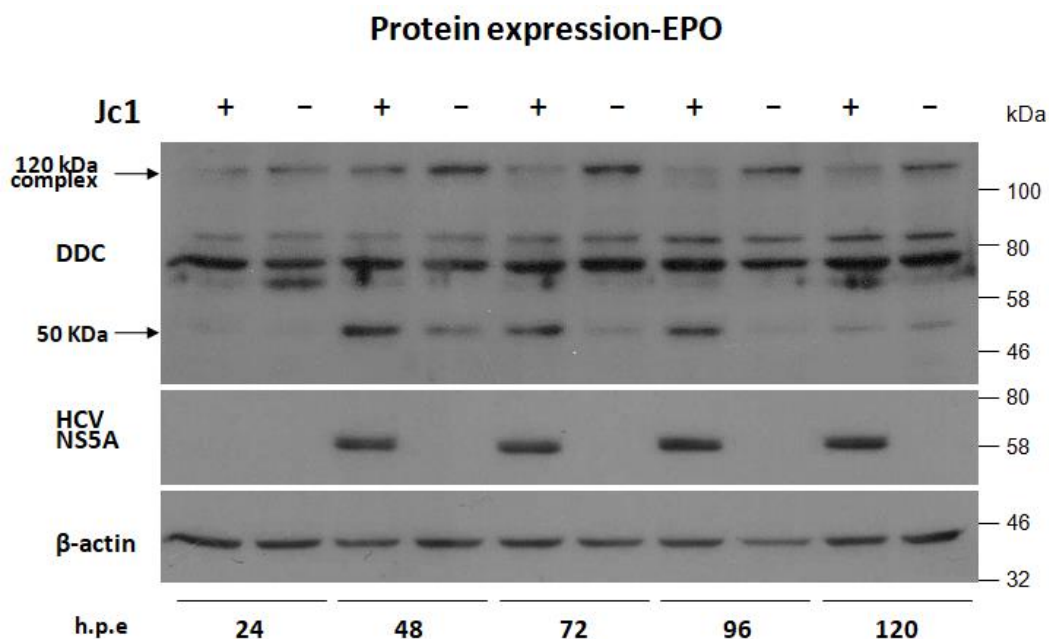
μόλυνση δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα άλλων SDS-ανθεκτικών ανοσοδραστικών τύπων της DDC, με μοριακά βάρη μεταξύ 60 και 80 kDa.



Εικόνα 17: Ο ρόλος του HCV στα ενδοκυττάρια επίπεδα πρωτεΐνης της DDC. Κύτταρα Huh7.5 μολύνθηκαν με HCV (Jc1, MOI=1) για 4h, επώαστηκαν περαιτέρω στο 20% O₂ και λύθηκαν για RNA σε συγκεκριμένο χρόνο μετά τη μόλυνση (24, 48, 72, 96 h) . Παρουσιάζονται τα Western blot με anti-DDC-CT, anti-HCV NS5A ή anti-β-actin αντισώματα. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

1.3. Διερεύνηση του σταδίου του κύκλου ζωής του HCV που ενισχύει την θετική ρύθμιση της DDC

Για να εξετάσουμε αν η ρύθμιση της DDC από τον HCV εξαρτάται από το στάδιο της αντιγραφής του RNA του ιού και όχι από το στάδιο εισόδου, πραγματοποιήσαμε ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα Huh7-Lunet για εισαγωγή του HCV JC1 κι επώαση από 24 έως 120 h.p.i. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν στα μισά πηγάδια πλάκας 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% -στα υπόλοιπα μισά στρώθηκαν μη μολυσμένα κύτταρα- και ακολούθησε λύση τους για πρωτεΐνη στις 24, 48, 72, 96 και 120 h.p.i. Τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Ανιχνεύθηκαν η πρωτεΐνη DDC, η ιϊκή πρωτεΐνη NS5A, ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene). Στην Εικόνα 18 παρατηρούμε συσσώρευση του μονομερούς των 50 kDa της DDC και αρνητική ρύθμιση στο SDS-ανθεκτικό σύμπλοκο των 120 kDa, παρουσία του ιού, όμοια με τα αποτελέσματα της μόλυνσης.



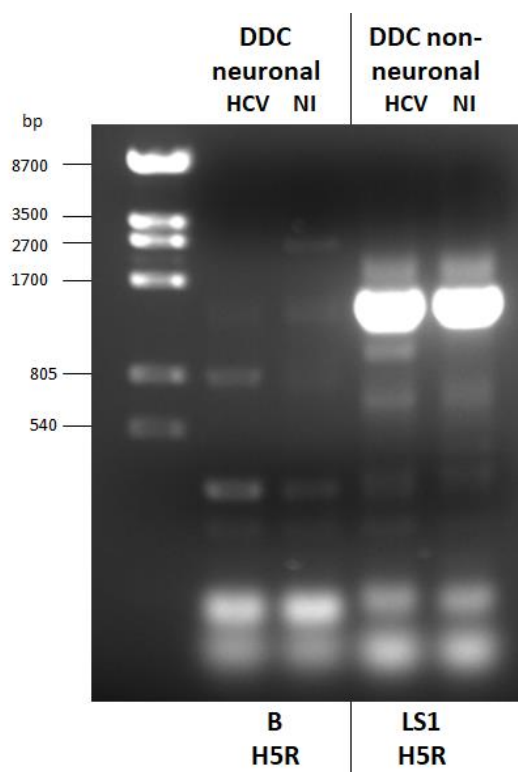
Εικόνα -18: Διερεύνηση του σταδίου του κύκλου ζωής του HCV που προκαλεί την αρνητική ρύθμιση της DDC. HCV JC1 RNA πλήρους γονιδιώματος (10 µg RNA/4x10⁶ cells) εισήχθη σε κύτταρα Huh7-Lunet με ηλεκτροδιάτρηση και καλλιεργήθηκαν στο 20% O₂. Λύθηκαν σε συγκεκριμένο χρόνο μετά τη μόλυνση για πρωτεΐνη. Western blot με anti-DDC-CT (1:1000), anti-DENV NS5A ή anti-β-actin αντισώματα. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΗCV ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ DDC ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Καθώς η DDC είναι ένα περίπλοκο μόριο, θέλουμε να ερευνήσουμε σε ποιο τύπο μετάγραφου εμφανίζεται σε σχέση με τον ιό, νευρικό ή μη νευρικό, καθώς και την τοπολογία της πρωτεΐνης στα ηπατικά κύτταρα. Επιπλέον, μια σειρά στοιχείων υποδεικνύουν ότι η DDC εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης - ενδιάμεσα ή συνδεδεμένη στη μεμβράνη - και πως η απελευθέρωσή της από τη αυτή πραγματοποιείται με ενζυμο-εξαρτώμενο μηχανισμό (249, 291, 401, 402). Για να εξετάσουμε αν η ιική μόλυνση επηρεάζει την υποκυττάρια κατανομή των διάφορων μορφών της DDC, κάναμε κυτταρική κλασματοποίηση διαχωρίζοντας τις πρωτεΐνες του κυττάρου σε κυτταροπλασματικές, μεμβρανικές, πυρηνικές και αδιάλυτες. Τέλος, εξετάσαμε την τοπολογία της DDC σε σχέση με τις θέσεις αντιγραφής του ΗCV με ανάλυση ανοσοφθορισμού σε μολυσμένα και μη κ'θDDC mRNA ισομορφές σε κύτταρα μολυσμένα με ΗCV

Για να ερευνήσουμε αν η μόλυνση με ΗCV προκαλεί οποιαδήποτε τροποποίηση στο mRNA της DDC, απομονώσαμε ολικό RNA από μολυσμένα και μη κύτταρα Huh7.5 και κάναμε αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση με PCR με τους πρόσθιους εκκινητές LS1 ή B, ειδικούς για τα πρώτα δύο εναλλακτικά μη μεταφραζόμενα εξώνια του mRNA της DDC, που περιέχονται στο μη νευρικό και νευρικό μεταγράφομα, αντίστοιχα. Το ολιγονουκλεοτίδιο H5R, συμπληρωματικό στο εξώνιο 14, κοινό και για το νευρικό και για το μη νευρικό mRNA, χρησιμοποιήθηκε σαν οπίσθιος εκκινητής. Κύτταρα Huh7.5 στρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον ΗCV τα μισά πηγάδια ώστε να υπάρχουν σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον Jc1 (MOI = 1) ιό για 4 h, έπειτα έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω. Τα κύτταρα λύθηκαν στις 72 h, απομονώθηκε το ολικό RNA και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (RT) όπου χρησιμοποιήσαμε oligodT με annealing στους 54 °C. Το δείγμα ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας το ειδικό ζεύγος εκκινητών για το μη νευρικού τύπου μετάγραφο LS1-H5R και το ειδικό ζεύγος εκκινητών για το νευρικού τύπου μετάγραφο B-H5R και ηλεκτροφορήθηκε σε gel

αγαρόζης 2%. Στην Εικόνα 19 βλέπουμε τις ζώνες της DDC με το αντίστοιχο μοριακό βάρος ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών. Στην εικόνα που πήραμε από την ηλεκτροφόρηση, φαίνεται ότι η ιική μόλυνση δεν επηρεάζει τον τύπο μεταγραφώματος της DDC που εκφράζεται, η οποία είναι κυρίως μη νευρικού τύπου. Ωστόσο μικρή αλλά ανιχνεύσιμη ποσότητα εμφανίζεται και για το νευρικού τύπου mRNA.



Εικόνα 19: Υποκυττάριος εντοπισμός της DDC σε κύτταρα Huh7.5 μολυσμένα με HCV. Ανάλυση (gel agarose) RT-PCR για το RNA της DDC σε κύτταρα Huh7.5 μολυσμένα με JC1 (MOI=1) για 72 ώρες και μη μολυσμένα κύτταρα. Έγινε ενίσχυση των εξονίων 1-14 της νευρικής και μη νευρικής ισομορφής της DDC με εκκινητές εμπρόσθιους τους B και LS1, και οπίσθιο τον H5R. κύτταρα.

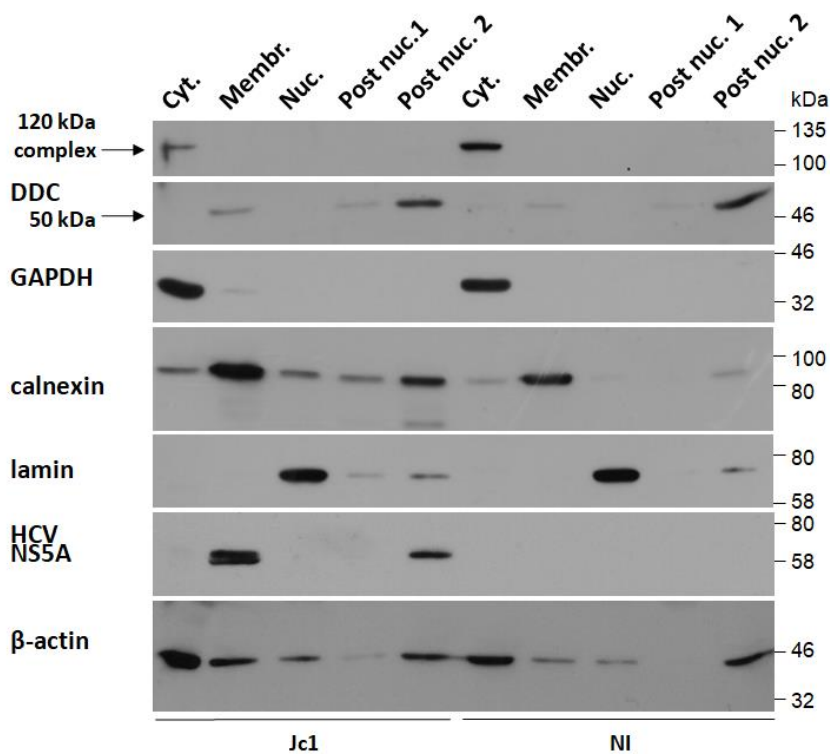
2.1. Επίδραση του HCV στην υποκυτταρική κατανομή των διάφορων ισομορφών της DDC πρωτεΐνης

Η υποκυτταρική κατανομή της DDC πρωτεΐνης, κάτι που δεν έχει διερευνηθεί προηγουμένως, εξετάστηκε σε κύτταρα μολυσμένα με HCV και μη. Για τον σκοπό αυτό δημιουργήσαμε διαφορετικά κλάσματα μολυσμένων με JC1 και μη κυττάρων, όπως κυτταροπλασματικό, μεμβρανικό, πυρηνικό και αδιάλυτο μετα-πυρηνικό. Σε κάθε ένα από αυτά τα κλάσματα ελέγξαμε τον εντοπισμό του συμπλόκου των 120 kDa και του μονομερούς των 50 kDa, αλλά και η ική πρωτεΐνη NS5A. Επιπλέον,

εντοπίστηκαν η GAPDH κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η calnexin μεμβρανική πρωτεΐνη, η lamin πυρηνική πρωτεΐνη και τέλος η β-ακτίνη σαν πρωτεΐνες ελέγχου.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και προεπώσθησαν στο 20% O₂ για 18 ώρες. Στη συνέχεια, τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον JC1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, νέο πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα επώσθησαν στο 20% O₂ για 72 h, οπότε και ακολουθήθηκε ειδικό πρωτόκολλο λύσης και δημιουργίας των διάφορων κλασμάτων με Digitonin (Fractionation). Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford και πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC και NS5A, καθώς και η GAPDH κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η calnexin μεμβρανική πρωτεΐνη, η lamin πυρηνική πρωτεΐνη σαν πρωτεΐνες ελέγχου για κάθε κλάσμα, και τέλος η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).

Στο ανοσοαποτύπωμα φαίνεται πως το σύμπλοκο των 120 kDa της DDC εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ το μονομερές των 50 kDa συγκεντρώνεται στο μεμβρανικό και τα αδιάλυτα πυρηνικά κλάσματα. Το πρώτο φαίνεται σχεδόν να εξαφανίζεται στα μολυσμένα κύτταρα, κάτι που συμφωνεί με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, σχετικά με την αρνητική ρύθμιση του HCV στη DDC. Συνεπώς παρατηρείται ότι η ιική μόλυνση προκαλεί μείωση στα επίπεδα του κυτταροπλασματικού συμπλόκου των 120 kDa και ταυτόχρονη συσσώρευση στο μεμβρανο-συνδεδεμένο μονομερές των 50 kDa της DDC, ενώ δεν αλλάζει η κατανομή των δύο τύπων της πρωτεΐνης ανάμεσα στα μεμονομένα κυτταρικά κλάσματα.



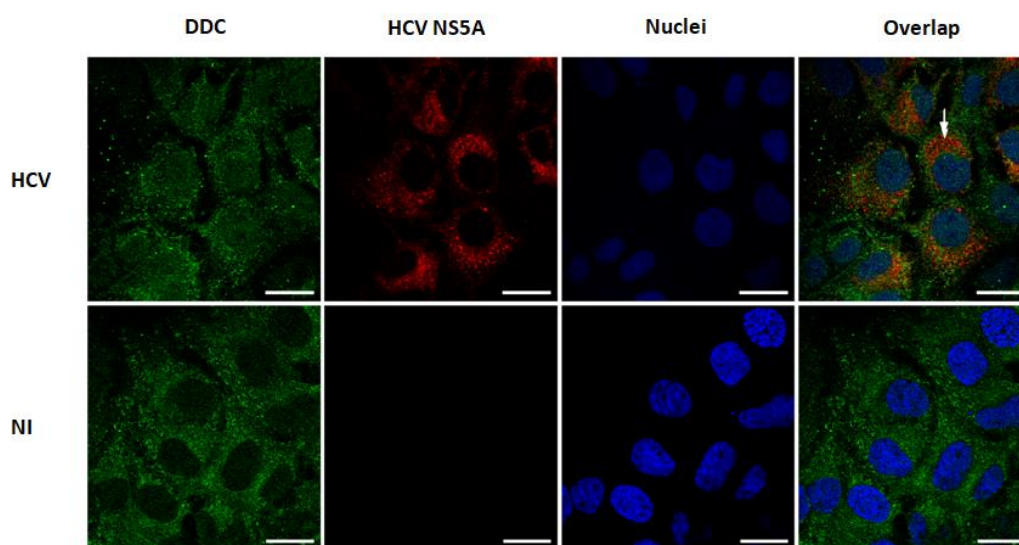
Εικόνα 20: Υποκυττάριος εντοπισμός της DDC σε κύτταρα Huh7.5 μολυσμένα με HCV. Υποκυτταρική κλασματοποίηση της πρωτεΐνης DDC σε κύτταρα Huh7.5 που μολύνθηκαν με Jc1 (MOI=1) για 72 h και για μη μολυσμένα κύτταρα. Φαίνεται η ενδοκυττάρια κατανομή της DDC στα κλάσματα: διαλυτό κυτταροπλασματικό (Cyt), μεμβρανικό (Membr), πυρηνικό (Nuc) και αδιάλυτο μετά-πυρηνικό 1 και 2 (Post-Nuc 1 - 2) σε Western blot. Τα αντισώματα GAPDH, calnexin και lamin A χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες για τα διάφορα κλάσματα. Φαίνεται επίσης η κατανομή της ιικής πρωτεΐνης του HCV NS5A. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

2.2. Πρωτεϊνική κατανομή της DDC πρωτεΐνης σχετικά με τις θέσεις αντιγραφής του HCV

Τέλος, με πειράματα ανοσοφθορισμού ανιχνεύσαμε την τοπολογία της DDC σε σχέση με τις θέσεις αντιγραφής του HCV σε κύτταρα Huh7.5, μολυσμένα και μη. Χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα για κάθε πρωτεΐνη που εντοπίσαμε. Η DDC δίνει πράσινο χρώμα, η ιική πρωτεΐνη NS5A εντοπίστηκε με κόκκινο χρώμα και τέλος οι πυρήνες με μπλε φθορίζουσα ουσία.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% στην οποία είχαν τοποθετηθεί αρχικά κυκλικά τζαμάκια και προεπώστηκαν στο 20% O₂ για 18 ώρες. Στη συνέχεια, τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον

JC1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, νέο πλήρες θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα επωάστηκαν στο 20% O₂ για 72 h, οπότε και ακολουθήθηκε ειδικό πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων, τοποθέτησης ειδικού αντισώματος για κάθε πρωτεΐνη, σήμανση της κάθε πρωτεΐνης με διαφορετικού χρώματος φθορίζουσα ουσία και λήψη εικόνων στο μικροσκόπιο φθορισμού. Ανιχνεύθηκαν η DDC πρωτεΐνη με anti-DDC C-T αντίσωμα, η ιική HCV NS5A με ειδικό αντίσωμα anti-NS5A, καθώς και οι πυρήνες με TO-PRO-3 iodide.



Εικόνα 21: Υποκυττάριος εντοπισμός της DDC σε κύτταρα Huh7.5 μολυσμένα με HCV. Εικόνες της τοπολογίας της DDC πρωτεΐνης (DDC-CT αντίσωμα) από συνεστιακό μικροσκόπιο σε Huh7.5 κύτταρα μη μολυσμένα (κάτω σειρά εικόνων) ή μολυσμένα με JC1 (MOI = 1) για 72 h (επάνω σειρά εικόνων). Για κάθε πρωτεΐνη που ανιχνεύθηκε χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα με διαφορετικό χρώμα. Στην πρώτη στήλη βλέπουμε την DDC με πράσινο χρώμα, στη δεύτερη στήλη την NS5A ιική πρωτεΐνη του HCV με κόκκινο χρώμα, στην τρίτη στήλη τους πυρήνες με μπλε χρώμα και στην τελευταία στήλη την επικάλυψή τους.

Έπειτα από ανάλυση με ανοσοφθορισμό της πρωτεΐνης DDC σε Huh7.5 μολυσμένα κύτταρα με HCV και σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα, παρατηρούμε πως η DDC δεν συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με την ιική πρωτεΐνη HCV NS5A, παρόλο που σημαντική ποσότητα της DDC εντοπίστηκε στο μεμβρανικό κλάσμα του κυττάρου στο προηγούμενο πείραμα (Εικόνα 20). Συγκεκριμένα, η DDC φαίνεται να απουσιάζει από θέσεις ιικής αντιγραφής, όπως υποδεικνύει το λευκό βέλος στην Εικόνα 21. Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι στα HCV μολυσμένα κύτταρα παρατηρούνται

συνολικά μικρότερες ποσότητες της DDC, κάτι που συμφωνεί με την διαμεσολαβούμενη από τον ιό αρνητική ρύθμιση του mRNA και του συμπλόκου 120 kDa της DDC (Εικόνα 18,19).

3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ DDC ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΟΥ HCV

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση της ενζυμικής ενεργότητας της DDC στον πολλαπλασιασμό του HCV χρησιμοποιώντας τον ανταγωνιστικό αναστολέα της DDC, καρβιντόπα (403), η οποία προσδέεται αναστρέψιμα και απενεργοποιεί τον συμπαράγοντα της DDC, PLP (404, 405). Για το σκοπό αυτό ποσοτικοποιήθηκε η ικανότητα αντιγραφής και μολυσματικότητας του ιού κατά την απενεργοποίηση της δράσης της DDC με καρβιντόπα, τόσο με πρωτόκολλα ανίχνευσης λουσιφεράσης, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

3.1.Επίδραση της καρβιντόπας, αναστολέα της DDC, στην αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του HCV.

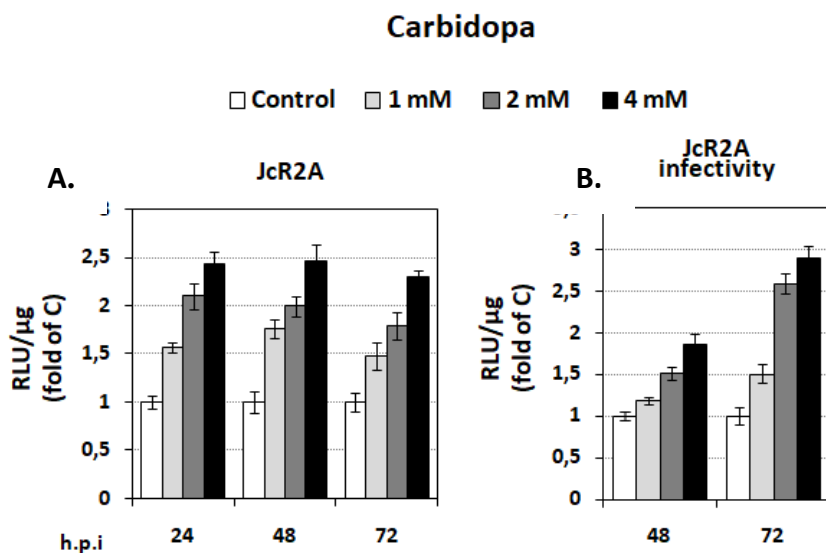
Για να ελέγξουμε πως επιδρά η DDC στον HCV χρησιμοποιήσαμε τον ιό HCV JcR2A που φέρει το γονίδιο αναφοράς της Renilla λουσιφεράσης, καθώς και τον βασικό αναστολέα της DDC που είναι η καρβιντόπα. Ο αναστολέας δοκιμάστηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις για 24-72 h και διερευνήθηκε η ικανότητα αντιγραφής και μολυσματικότητας του ιού, με ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της λουσιφεράσης.

Κύτταρα Huh7.5 στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε πυκνότητες 30% και προεπώστηκαν στο 20% O₂. Έπειτα από 18 ώρες μολύνθηκαν με τον JcR2A (MOI=0.5) που εκφράζει το γονίδιο *Renilla luciferase*. Τα κύτταρα επώστηκαν για 4 ώρες με τον ιό, στη συνέχεια ο ιός απομακρύνθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε ο αναστολέας αραιωμένος σε συγκεντρώσεις 1 ή 2 ή 4 mM σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO. Τα κύτταρα επώστηκαν για 24-72 h και λύθηκαν σε συγκεκριμένο χρόνο με renilla lysis buffer (RLB). Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα της λουσιφεράσης και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στην εικόνα 22Α παρατηρούμε ότι η καρβιντόπα αυξάνει σημαντικά την ιική αντιγραφή, σχεδόν 2,5 φορές στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της, σε όλες τις χρονικές

στιγμές. Τα επίπεδα της λουσιφεράσης αυξάνονται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή παρατηρείται αύξηση στον πολλαπλασιασμό του HCV όσο περισσότερο αναστέλλεται η DDC.

Νέα κύτταρα Huh7.5 στρώθηκαν σε πλάκες 96well σε πυκνότητες 30% και προεπώστηκαν στο 20% O₂. Έπειτα από 18 ώρες επώστηκαν με υπερκείμενο από μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί καρβιντόπα ή DMSO για 48 ή 72 ώρες (δεύτερος κύκλος μόλυνσης). Στις 24 ώρες έγινε αλλαγή υλικού, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα λύθηκαν στις 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης για ποσοτικοποίηση του ιού. Στην Εικόνα 22B παρατηρούμε ότι η καρβιντόπα αυξάνει σημαντικά την μολυσματική ικανότητα του ιού, μέχρι 3 φορές στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της. Τα επίπεδα της λουσιφεράσης αυξάνονται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή παρατηρείται βελτίωση της μολυσματικότητας του HCV όσο περισσότερο αναστέλλεται η DDC.

Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως relative light units (RLU) ανά μg ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του δείγματος χωρίς αναστολέα (Control) που το θεωρούμε ως 1. Χρησιμοποιήθηκαν τρία τεχνικά αντίγραφα ως ξεχωριστά πειραματικά δείγματα για κάθε περίπτωση



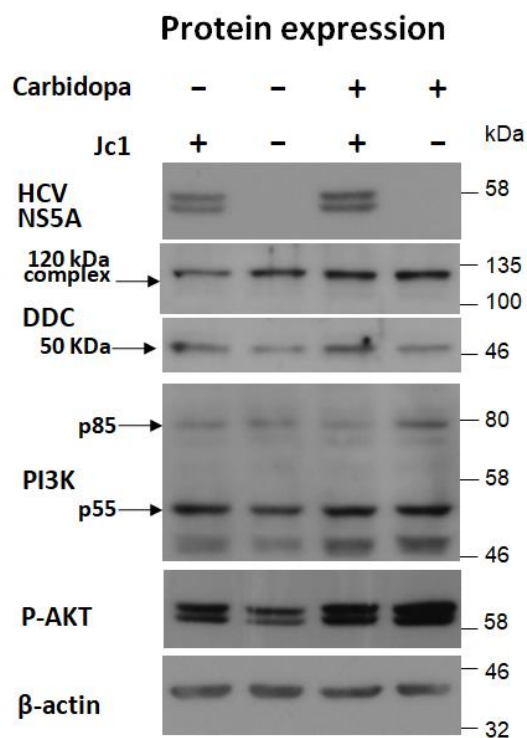
Εικόνα 22: Η επίδραση της καρβιντόπας-αναστολέα της DDC, στην αντιγραφή και την μολυσματικότητα του HCV. **A)** Κύτταρα Huh7.5 επώστηκαν με JcR2A (MOI=0.5) για 4h, ο ιός αφαιρέθηκε και προστέθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα (1/2/4 mM) ή DMSO (control) μέχρι που τα κύτταρα λύθηκαν στις 24,48 ή 72 h. **B)** Νέα κύτταρα Huh7.5 επώστηκαν με υπερκείμενο από μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε

προστεθεί Carbidorα ή DMSO για 48 ή 72 h. Στις 24 h έγινε αλλαγή υλικού, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα λύθηκαν στις 48 ή 72 h. Μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης (Renilla luciferase /R-Luc) για ποσοτικοποίηση του ιού.

3.2.Επίδραση της καρβιντόπας, στην σχέση της DDC με τον HCV.

Επηρεασμένοι από τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος (Εικόνα 22), όπου παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση στον πολλαπλασιασμό του HCV από την DDC, και αποτελεσμάτων από δημοσιευμένη έρευνα (406), στην οποία έχει δείχθει η συσχέτιση της DDC με τον PI3K απουσία ικής μόλυνσης, προχωρήσαμε σε περαιτέρω διερεύνηση σε επίπεδο πρωτεΐνης. Μελετήσαμε την επίδραση της αναστολής του ενζύμου για την DDC, για τον ιό αλλά και για τις πρωτεΐνες του κυττάρου PI3K και AKT, κατά την μόλυνση με HCV.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30%. Έπειτα από 18 ώρες, τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον JC1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, ο αναστολέας καρβιντόπα σε συγκέντρωση 2mM αραιωμένος σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO για τα δείγματα ελέγχου. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο 20% O₂ για 48 h, οπότε και λύθηκαν για πρωτεΐνη. Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford και πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι NS5A, DDC, PI3K και P-AKT, ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).



Εικόνα 23: Έλεγχος της αντιγραφής του HCV, της σχέσης του PI3K και της φωσφορύλιωσης του AKT όταν προκαλείται αναστολή της DDC με καρβιντόπα. Κύτταρα Huh7.5 επώστηκαν με JC1 (MOI=1) για 4 h στο 20% O₂, έπειτα προστέθηκε καρβιντόπα (2mM) και λύθηκαν 48 h μετά τη μόλυνση. Western blot με anti-HCV NS5A, anti-DDC-CT, anti-PI3K, anti-P-AKT ή anti-β-actin αντισώματα. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

Αρχικά, παρατηρούμε την συσσώρευση της ιικής πρωτεΐνης NS5A παρουσία του αναστολέα καρβιντόπα, ένα αποτέλεσμα που υποδεικνύει τον αρνητικό ρόλο του ενζύμου στον κύκλο ζωής του ιού. Επιπλέον, φαίνεται ότι παρουσία του αναστολέα προκαλείται συσσώρευση των μορφών της DDC, 120 και 50 kDa. Ωστόσο, η καρβιντόπα δεν φαίνεται να επηρεάζει την διαμεσολαβούμενη από τον ιό ρύθμιση της DDC πρωτεΐνης. Όσον αφορά τη συσχέτιση της DDC με το μονοπάτι PI3K/AKT, ένα από τα βασικά βιοχημικά μονοπάτια για την κυτταρική επιβίωση, φαίνεται ότι παρουσία του αναστολέα παρατηρείται αύξηση τόσο στις επιμέρους υπομονάδες του PI3K, p55 και p85, αλλά και στα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου AKT, σε μολυσμένα και μη κύτταρα. Αυτό υποδεικνύει ότι η DDC σχετίζεται με το μονοπάτι PI3K/AKT και φανερώνει τη σημασία του ενζύμου για το κύτταρο.

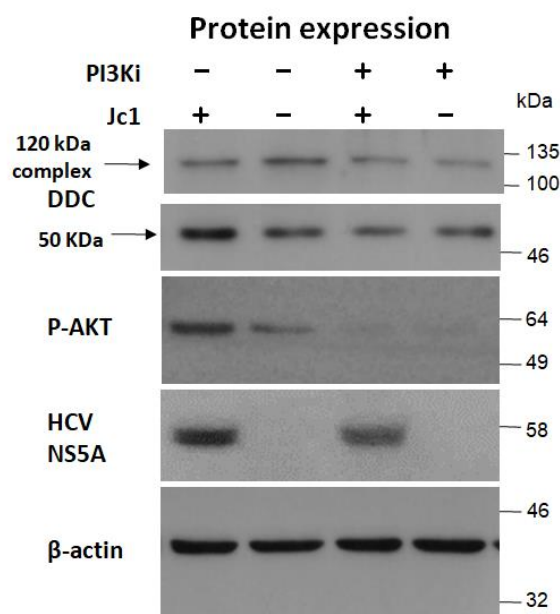
4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PI3K ΣΤΗΝ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC

Βασισμένοι στην αλληλεπίδραση της DDC με τον PI3K, θέλουμε να ερευνήσουμε αν η αναστολή του PI3K έχει αντίκτυπο στην μέσολαβούμενη από τον ιό, ρύθμιση της DDC. Ο αναστολέας του PI3K, LY294002, βρέθηκε να μην επηρεάζει την αλληλεπίδραση DDC-PI3K, σε προηγούμενη έρευνα απουσία ιικής μόλυνσης (406).

4.1. Επίδραση του PI3K, στην σχέση της DDC με τον HCV.

Έπειτα από τη συσχέτιση της DDC με τον PI3K, παρουσία (Εικόνα 23) και απουσία ιικής μόλυνσης (406), προχωρήσαμε σε περαιτέρω διερεύνηση σε επίπεδο πρωτεΐνης. Μελετήσαμε την επίδραση της αναστολής του PI3K τόσο για την DDC, για τον ιό αλλά και για τον P-AKT, κατά την μόλυνση με HCV.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30%. Έπειτα από 18 ώρες, μολύνθηκαν τα μισά πηγάδια σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον JC1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, ο αναστολέας PI3K, LY294002, σε συγκέντρωση 2.5 μ M αραιωμένος σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO για τα δείγματα ελέγχου. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο 20% O₂ για 72 ώρες, οπότε και λύθηκαν για πρωτεΐνη. Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford και πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC, P-AKT, και NS5A ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη β -ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).



Εικόνα 24: Επίδραση του PI3K αναστολέα στην διαμεσολαβούμενη από τον HCV ρύθμιση της DDC. Κύτταρα Huh7.5 επωάστηκαν για 4 h με Jc1 (MOI=1), έπειτα προστέθηκε σε αυτά ο αναστολέας PI3K LY294002 (2.5 μM) και λύθηκαν στις 72 h μετά τη μόλυνση. Western blot με anti-DDC-CT, anti- p-AKT, anti-HCV NS5A ή anti-β-actin αντισώματα. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

Ενδιαφέρον εμφανίζει ότι η δράση του αναστολέα του PI3K ανέστρεψε την επίδραση του HCV στα πρωτεϊνικά επίπεδα του 50 kDa μονομερούς της DDC και του 120 kDa συμπλόκου, (Εικόνα 24). Επιπλέον, παρουσία του αναστολέα του PI3K είναι ξεκάθαρη η μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης του AKT, ενώ επιβεβαιώνεται η θετική ρύθμιση του P-AKT από την μόλυνση με HCV (407). Τέλος, παρατηρείται ελάττωση της ιικής πρωτεΐνης NS5A κατά την αναστολή του PI3K..

4.2.Επίδραση της αναστολής του PI3K, στην αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του HCV.

Για να ελέγξουμε πως επιδρά ο PI3K στον HCV χρησιμοποιήσαμε τον ιό HCV JcR2A που φέρει το γονίδιο αναφοράς της *Renilla* λουσιφεράσης, καθώς και τον αναστολέα του PI3K, LY294002. Ο αναστολέας δοκιμάστηκε σε δύο συγκεντρώσεις για 48 ώρες και διερευνήθηκε η ικανότητα αντιγραφής και μολυσματικότητας του ιού, με ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της λουσιφεράσης.

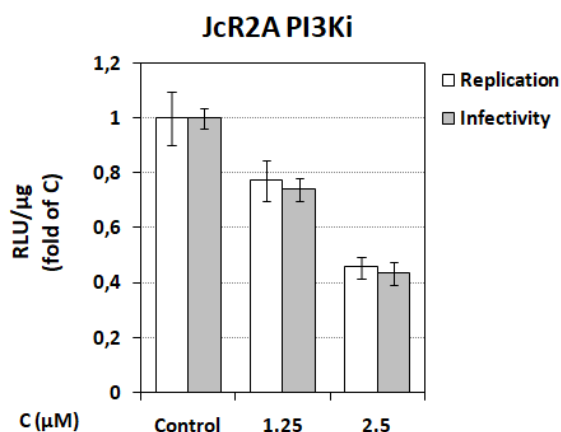
Κύτταρα Huh7.5 στρώθηκαν σε πλάκες 96well σε πυκνότητες 30% και προεπωάστηκαν στο 20% O₂. Έπειτα από 18 ώρες, μολύνθηκαν με τον JcR2A

(MOI=0.5) που εκφράζει το γονίδιο *Renilla luciferase*. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 4 ώρες με τον ιό, στη συνέχεια ο ιός απομακρύνθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε ο αναστολέας σε συγκεντρώσεις 1.25 ή 2.5 μM αραιωμένος σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO για τα δείγματα ελέγχου. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες οπότε και λύθηκαν με *renilla lysis buffer* (RLB). Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα της λουσιφεράσης και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford.

Νέα κύτταρα Huh7.5 στρώθηκαν σε πλάκες 96well σε πυκνότητες 30% και προεπωάστηκαν στο 20% O_2 . Έπειτα από 18 ώρες επωάστηκαν επωάστηκαν με υπερκείμενο από μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί αναστολέας LY294002 ή DMSO για 48 ώρες (δεύτερος γύρος μόλυνσης). Στις 24 ώρες έγινε αλλαγή υλικού, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα λύθηκαν στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης για ποσοτικοποίηση του ιού.

Βλέπουμε ότι τα επίπεδα ενεργότητας λουσιφεράσης μειώνονται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του αναστολέα, πράγμα που σημαίνει ότι η αναστολή του PI3K μορίου επηράζει αρνητικά την αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του ιού. Ενώ η αναστολή του PI3K φαίνεται να επηρεάζει την σχέση HCV-DDC, ωστόσο είναι ανεξάρτητη του ιικού πολλαπλασιασμού, συγκρίνοντας το ίδιο πείραμα σε άλλο ιό (408).

Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως relative light units (RLU) ανά μg ολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του δείγματος χωρίς αναστολέα (Control) που το θεωρούμε ως 1. Χρησιμοποιήθηκαν τρία τεχνικά αντίγραφα ως ξεχωριστά πειραματικά δείγματα για κάθε περίπτωση.



Εικόνα 25: Επίδραση του PI3K αναστολέα στην αντιγραφή και τη μολυσματικότητα του HCV. Κύτταρα Huh7.5 επωάστηκαν για 4 h με JcR2A, έπειτα προστέθηκε σε αυτά ο αναστολέας του PI3K, LY294002 σε δύο συγκεντρώσεις (2.5/1.25 μM) ή DMSO (control) και λύθηκαν στις 48 hpi. Νέα κύτταρα Huh7.5 επωάστηκαν με υπερκείμενο από μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε προστεθεί ο αναστολέας PI3K LY294002 σε δύο συγκεντρώσεις (2.5/1.25 μM) ή DMSO για 48 h. Στις 24 h έγινε αλλαγή υλικού, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα λύθηκαν στις 72 h.p.i. Μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης για ποσοτικοποίηση του ιού.

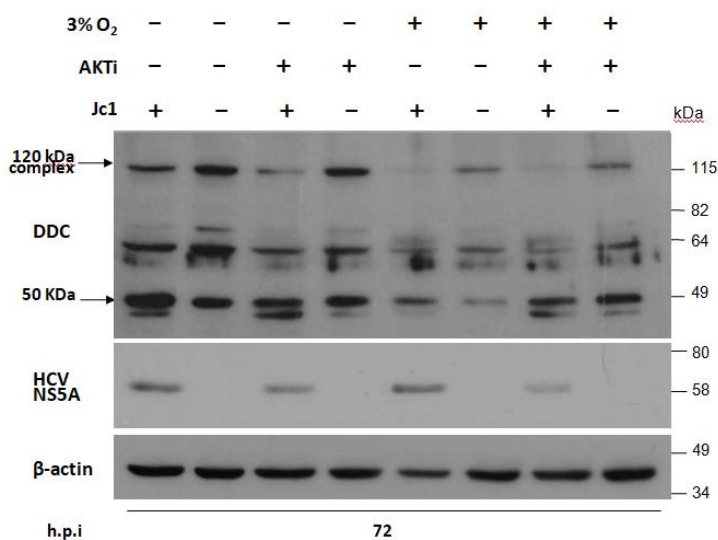
5. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΚΤ ΣΤΗΝ ΣΧΕΣΗ ΙΟΥ-ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC

Για την περαιτέρω διερεύνηση της συμμετοχής του PI3K στην αλληλεπίδραση μεταξύ HCV-DDC, θα χαρακτηρίσουμε το ρόλο του επόμενου μορίου στο μονοπάτι PI3K/AKT, του AKT, στη σχέση αυτή. Το μόριο AKT έχει δειχθεί να είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της ιικής αντιγραφής του HCV σε τάση οξυγόνου 3% O₂ (373). Τα δεδομένα αυτά μας εξάπτουν το ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη της δράσης του AKT, στη ρύθμιση της DDC κατά την μόλυνση με HCV και στις δύο συνθήκες οξυγόνου, ατμοσφαιρικές και υποξικές, χρησιμοποιώντας τον αναστολέα του AKT inhibitor VIII.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και προεπωάστηκαν στο 20 ή 3 % O₂ για 18 ώρες. Στη συνέχεια, τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον JC1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, ο αναστολέας AKT

VIII σε συγκέντρωση 5 μ M αραιωμένος σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO για τα δείγματα ελέγχου. Τα κύτταρα επωάστηκαν στο 20 ή 3% O₂ για 72 ώρες, οπότε και λύθηκαν για πρωτεΐνη. Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford και πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC, P-AKT, PI3K και NS5A ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη β -ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).

Η αναστολή του AKT, ομοίως με την αναστολή του PI3K, ακυρώνει την επίδραση του HCV στα επίπεδα της μονομερούς DDC των 50 kDa και στις δύο συνθήκες οξυγόνου, ωστόσο δεν φαίνεται να έχει επηρεάζει τα επίπεδα του συμπλόκου των 120 kDa. Επιπλέον, αντίθετα από τον PI3K αναστολέα, δεν προκαλεί διαφορές στα επίπεδα των ισομορφών του ενζύμου στα μη μολυσμένα κύτταρα στο 20% O₂. Συνεπώς, ο αναστολέας δεν επηρεάζει τα επίπεδα της DDC. Συνολικά, τα δεδομένα μας φανερώνουν την σημασία που έχει το μεταβολικό μονοπάτι PI3K/AKT στην διαμεσολαβούμενη από τον HCV ρύθμιση του ενζύμου της DDC, που δείχνουν ότι χρειάζεται ενεργοποίηση του PI3K/AKT μονοπατιού για να επιδράσει ο HCV στη DDC.

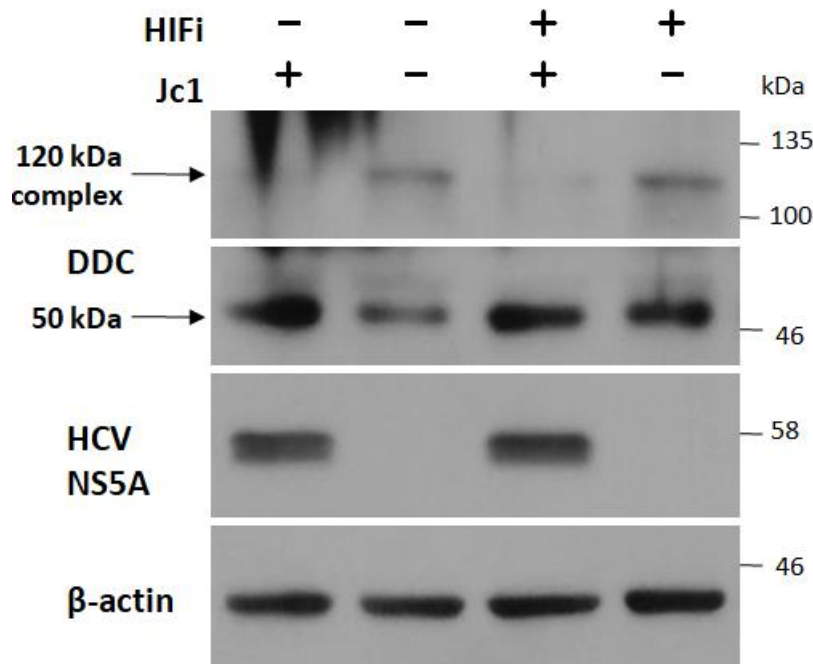


Εικόνα 26: Επίδραση του AKT αναστολέα στην DDC και τον HCV στο 20 ή 3% O₂. Κύτταρα Huh7.5 προεπωάζονται στο 20 ή 3 % O₂ για 18 h, μολύνονται με JC1 (MOI=1) για 4 h κι έπειτα προστίθεται αναστολέας του AKT VIII (5 μ M). Ακολουθεί επώαση στο 20 ή 3 % O₂ μέχρι τη λύση των κυττάρων στις 72 h.p.i. Western blot με anti-DDC-CT, anti-HCV NS5A ή anti- β -actin αντισώματα. Η β -actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

6. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ HIF ΣΤΗΝ ΣΧΕΣΗ ΙΟΥ-ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ HCV ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ DDC

Έχει δειχθεί σε παλαιότερη δημοσίευση, ότι ο ιός HCV ενεργοποιεί τον HIF (373). Επιπλέον, ο παράγοντας HIF-1α φαίνεται να είναι σημαντικός ρυθμιστής του υποξικού επαναπρογραμματισμού και εμπλέκεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην μείωση των επιπέδων mRNA της DDC στο 3% O₂, όπως φαίνεται και από την RT-qPCR ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε Huh7 κύτταρα που επωάστηκαν με τον αναστολέα του HIF, NSC-134754 (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου). Η συγκέντρωση του αναστολέα επιλέχθηκε στα 1.25 μM, ώστε να είναι επαρκής, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα. Βασισμένοι στα παραπάνω, μελετήσαμε την επίδραση του HCV στα επίπεδα της DDC μέσω αναστολής του HIF στο 20% O₂.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και προεπωάστηκαν στο 20% O₂ για 18 ώρες. Στη συνέχεια, τα μισά πηγάδια μολύνθηκαν σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον Jc1 (MOI=1), έπειτα από 4 ώρες ο ιός απομακρύνθηκε και προστέθηκαν στα πηγάδια, μολυσμένα και μη, ο αναστολέας HIF αναστολέας NSC-134754 σε συγκέντρωση 1.25 μM αραιωμένος σε πλήρες θρεπτικό υλικό ή DMSO για τα δείγματα ελέγχου. Τα κύτταρα επωάστηκαν στο 20% O₂ για 72 ώρες, οπότε και λύθηκαν για πρωτεΐνη. Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford και πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC και NS5A ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene). Ο HCV δεν επηρεάζεται από τον αναστολέα του HIF, καθώς δεν παρατηρείται επίδραση στη σχέση HCV-DDC, όπως φαίνεται από την ανίχνευση της HCV NS5A και των μορφών 50 kDa και 120 kDa DDC στο ανοσοαποτύπωμα. Συνεπώς, ο HIF δεν φαίνεται να επιδρά στην πρωτεΐνη DDC, ενδεχομένως όμως, να επιδρά στο mRNA της.



Εικόνα 27: Επίδραση του HIF1 αναστολέα στην DDC και τον HCV. Κύτταρα Huh7.5 προεπωάζονται στο 20% O₂ για 18 ώρες, μολύνονται με JC1 (MOI=1) για 4 h, κι έπειτα προστίθεται αναστολέας του HIF-1 NSC-134754 συγκέντρωση (1.25 μM). Ακολουθεί επώαση μέχρι τη λύση των κυττάρων στις 72 h.p.i. Western blot με anti-DDC-CT, anti-HCV NS5A ή anti-β-actin αντισώματα. Η β-actin χρησιμοποιήθηκε σαν control.

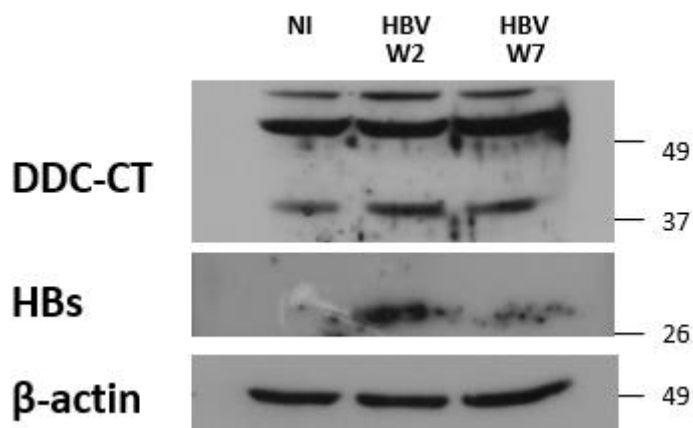
7. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ HBV ΣΤΑ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΗΣ DDC

Στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του ενζύμου DDC, προχωρήσαμε στη μελέτη της σχέσης του με έναν άλλο ιό που προσβάλλει το ήπαρ, τον HBV. Παρατηρήσαμε πως η μόλυνση με τον ιό διαμορφώνει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου DDC. Με ανοσοαποτύπωμα ανιχνεύσαμε την πρωτεΐνη DDC, έπειτα από επώαση σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας 20% O₂, σε κύτταρα HepG2-NTCP που εκφράζουν τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα NTCP, ο οποίος διευκολύνει τον ιό της Ηπατίτιδας Β να εισέρχεται στο κύτταρο.

Κύτταρα HepG2-NTCP επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και έπειτα από 18 ώρες κάποια πηγάδια μολύνθηκαν με HBV της δεύτερης, άλλα και της έβδομης εβδομάδας παραγωγής, και άλλα παρέμειναν μη μολυσμένα. Ο ιός αφήνεται όλο το βράδυ και την επόμενη μέρα κάνουμε δύο πλύσεις με PBS 1x, για απομάκρυνση του PEG, και το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με νέο θρεπτικό υλικό

με DMSO 2% και PEG 2%, το οποίο αφήνεται να επωαστεί για 6 ακόμα ημέρες. Την έβδομη μέρα μετά την μόλυνση, τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS 1x και λύνονται με το διάλυμα λύσης για πρωτεΐνη. Τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford κι έπειτα πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν ήταν οι DDC και η ιική πρωτεΐνη επιφανείας HBs, ενώ σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).

Στην εικόνα που πήραμε δεν παρατηρήθηκε καμία ξεκάθαρη αλλαγή στα επίπεδα του μονομερούς των 50 kDa της DDC μεταξύ μολυσμένων και μη κυττάρων. Επιπλέον, το αντίσωμα για το αντιγόνο επιφάνειας του ιού HBV δεν έδωσε σταθερή εικόνα κάτι που δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπεράσματος για την συσχέτιση ιού και DDC. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-ακτίνης εμφανίζονται σταθερά σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, επιβεβαιώνοντας την παρόμοια ποσότητα δείγματος πρωτεΐνης που εξετάζεται. Η πρωτεΐνη DDC ανιχνεύθηκε με το ειδικό αντίσωμα C-T αραιωμένο 1:1000 και το αντιγόνο Hbs με ειδικό αντίσωμα αραιωμένο 1:500.



Εικόνα 28: Συσχέτιση του ιού HBV και της DDC. Μόλυνση με MOI=2000 με ιό HBV από το στοκ της δεύτερης εβδομάδας παραγωγής και το στοκ της έβδομης εβδομάδας παραγωγής που με πειράματα ανοσοφθορισμού είδαμε στο μικροσκόπιο ότι έχουν την καλύτερη ικανότητα μόλυνσης των κυττάρων HepG2-NTCP.

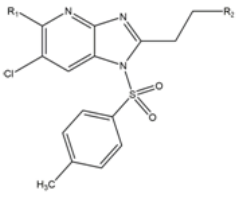
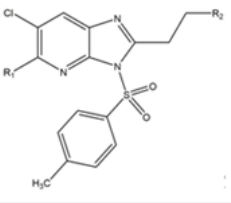
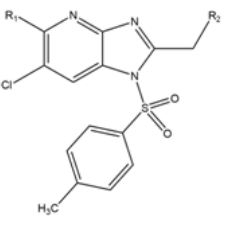
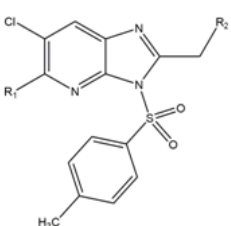
8. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ HBV

Στην προσπάθεια απαλοιφής της νόσου και παρά την ύπαρξη εμβολίου, η επόμενη πειραματική προσέγγιση σχετικά την ηπατίτιδα Β περιλαμβάνει την δοκιμή νέων φαρμακευτικών ουσιών που να είναι δραστικές έναντι του HBV. Γι' αυτό προχωρήσαμε σε έλεγχο της κυτταροτοξικότητας και της ανασταλτικής δράσης νεοσυντιθέμενων φαρμακευτικών αναλόγων στην κυτταρική σειρά HepG2-NTCP. Πρώτα χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις των μορίων σε μη μολυσμένα κύτταρα με σκοπό να αξιολογηθεί η κυτταροτοξικότητά τους, με μέτρηση του ενδοκυττάριου ATP (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Το ATP αποτελεί ευαίσθητο δείκτη, που μαρτυρά πιθανές μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων, εξαιτίας της δράσης των αναστολέων. Για κάθε αντικό ανάλογο χρησιμοποιήθηκαν τρία τεχνικά δείγματα και από τη μέτρηση των δειγμάτων για την κάθε συγκέντρωση των μορίων, υπολογίστηκε ο μέσος όρος για το ATP και εκφράστηκε ως προς % των αντίστοιχων τιμών που προσδιορίστηκαν στους πληθυσμούς που επώαστηκαν μόνο με DMSO (δείγματα ελέγχου). Για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη των κυττάρων μέσω αντίδρασης Bradford. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της ανασταλτικής ικανότητας των φαρμακευτικών ουσιών έναντι της ηπατίτιδας Β.

8.1. Επίδραση των αντικών αναλόγων στα επίπεδα του rcDNA του HBV

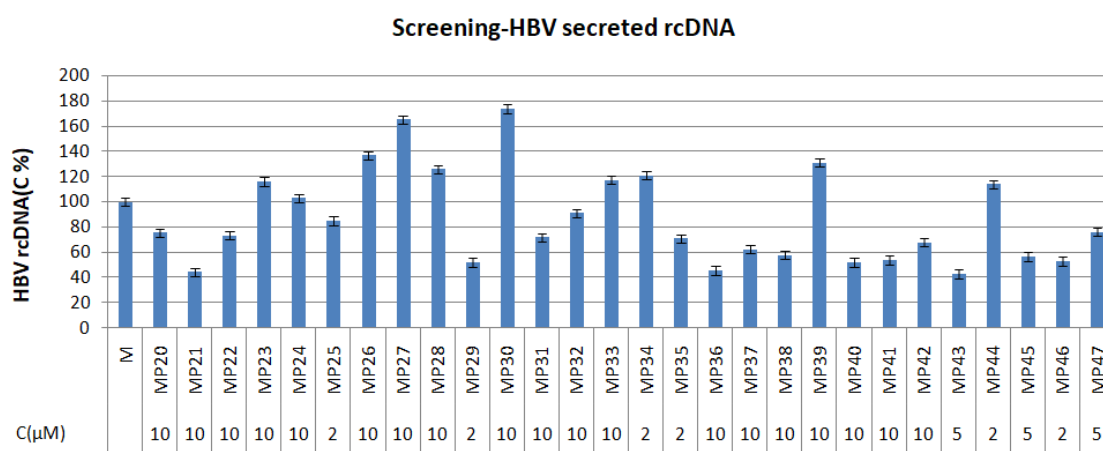
Για τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β, χρησιμοποιήθηκαν οι μέγιστες ασφαλείς συγκεντρώσεις των φαρμακευτικών αναλόγων, οι οποίες δεν εμφάνισαν καμία αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Κύτταρα HepG2-NTCP στρώνονται σε πλάκες πολλαπλών πηγαδιών (24 πηγάδια) σε πυκνότητα 30%. Την επόμενη μέρα κάνουμε προεπάση με τον αναστολέα 1-2 ώρες πριν τη μόλυνση. Μετά την προεπάση το θρεπτικό μέσο με τους αναστολείς αφαιρείται. Έπειτα γίνεται μόλυνση με τον ιό και προστίθεται εκ νέου θρεπτικό υλικό με τον αναστολέα στην κατάλληλη συγκέντρωση. Η μόλυνση μένει στον επωαστικό θάλαμο, στους 37 °C με 5% CO₂, για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα

αφαιρούμε το μίγμα ιού-αναστολέα, κάνουμε δύο πλύσεις με PBS 1x, για απομάκρυνση του PEG, και ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό με τον αναστολέα παρουσία DMSO 2% και PEG 2%, το οποίο αφήνεται να επωαστεί για 6 ακόμα ημέρες. Την έβδομη μέρα μετά την μόλυνση, τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS 1x και λύνονται με το κατάλληλο διάλυμα λύσης, ενώ τα υπερκείμενα τους αποθηκεύονται σαν δείγματα ολικού DNA. Ακολουθεί απομόνωση του ολικού DNA από τα υπερκείμενα των δειγμάτων, εκεί όπου εντοπίζεται το εκκρινόμενο από το κύτταρο rcDNA του ιού της ηπατίτιδας Β και το οποίο μας δείχνει τα επίπεδα αναστολής της αντιγραφής του ιού παρουσία των αναστολέων. Η διαδικασία γίνεται με kit με στήλες απομόνωσης DNA και ακολουθεί η ενίσχυση τους με qPCR και ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (pgRNA Sense-Antisense) για την περιοχή του 3' άκρου του γονιδιώματος του ιού, από την οποία εξάγεται και η ποσοτικοποίηση του ιικού εκκρινόμενου DNA. Η qPCR σε πραγματικό χρόνο μετρά τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, στηριζόμενη σε αντίδραση φθορισμού. Συγκρίνοντας με το δείγμα ελέγχου μπορούμε να υπολογίσουμε την αναστολή που έχει προκληθεί για κάθε έναν από τους αναστολείς. Ακολουθούν τα αποτελέσματα σε διάγραμμα και πίνακα.

Chemical type	Name	C (μM)	R ₁	R ₂	Mean	SD	% HBV Inhibition
	MP29	2	H	Piperidine	52.09	2.45	47.91
	MP31	10	H	N-methyl-piperazine	71.94	8.49	28.06
	MP33	10	H	Morpholine	117.13	0.44	0
	MP41	10	Cl	Piperidine	53.91	2.22	46.09
	MP42	10	Cl	N-methyl-piperazine	67.96	4.82	32.04
	MP44	2	Cl	Morpholine	113.83	8.88	0
	MP28	10	H	Piperidine	125.78	10.55	0
	MP30	10	H	N-methyl-piperazine	173.63	4.83	0
	MP32	10	H	Morpholine	91.08	2.09	8.92
	MP43	5	Cl	Morpholine	43	3,11	47
	MP21	10	H	Piperidine	44.43	1.26	55.57
	MP23	10	H	N-methyl-piperazine	115.99	2.8	0
	MP25	2	H	Morpholine	84.89	6.05	15.11
	MP27	10	H	Diethylamine	164.87	6.22	0
	MP36	10	Cl	Piperidine	45.62	2.02	54.38
	MP38	10	Cl	N-methyl-piperazine	57.77	2.13	42.23
	MP40	10	Cl	Morpholine	52.13	2	47,87
	MP20	10	H	Piperidine	75.56	3.5	24.44
	MP22	10	H	N-methyl-piperazine	73.43	2.23	26.57
	MP24	10	H	Morpholine	103	0.4	0
	MP26	10	H	Diethylamine	136.61	5.56	0
	MP35	2	Cl	Piperidine	70.98	5.53	29.02
	MP37	10	Cl	N-methyl-piperazine	62.5	2.94	37.5
	MP39	10	Cl	Morpholine	130.99	2.44	0

Chemical Structure	MP34	2	H	Ethene	120.86	3.24	0
		MP45	5	Cl	Ethene	56.63	3.42
Chemical Structure	MP46	2	Cl	Morpholine	53.03	0.68	46.97
		MP47	5	Morpholine	Morpholine	76.12	2.3

Πίνακας 4: Αντί-HBV δράση των τοζυλοπαραγώγων εκφραζόμενη ως % αναστολή του ιικού DNA. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι φαρμακευτικές ουσίες κατά του HBV, καθώς επίσης και η ασφαλής συγκέντρωση στην οποία ελέγχθηκε κάθε ουσία, οι υποκαταστάτες κάθε ουσίας, το ποσοστό rcDNA του HBV που ανιχνεύθηκε, η τυπική απόκλιση και η αναστολή % της αντιγραφής του HBV που προκαλεί το κάθε φάρμακο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (M). Με πράσινο σημειώθηκαν οι ουσίες με την καλύτερη αντί-HBV δράση, ενώ με κόκκινα γράμματα εκείνες που δεν παρουσίασαν καμία αναστολή.



Διάγραμμα 1: Αντί-HBV δράση των τοζυλοπαραγώγων εκφραζόμενη ως % αναστολή του ιικού DNA: Κότταρα HepG2-NTCP μολύνθηκαν με HBV (MOI=1) και επώαστηκαν στο 20% O₂ παρουσία κάθε μιας από τις αντικές ουσίες, από τα οποία μια εβδομάδα μετά τη μόλυνση συλλέχθηκε το υπερκείμενο και λύθηκαν για RNA και DNA. Ανάλυση RT-qPCR για το rcDNA του HBV που ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο από κώτταρα HepG2-NTCP μολυσμένα με τον ιό. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ποσότητα αντιγράφων των rcDNA του HBV έπειτα από την επώαση με αντικές ουσίες.

Από την ομάδα των τοζυλικών παραγώγων τα MP21, MP29, MP36, MP40, MP41, MP43 και MP46 αποδείχτηκαν δραστικά με αναστολή του ιού πάνω από 45% σε σχέση

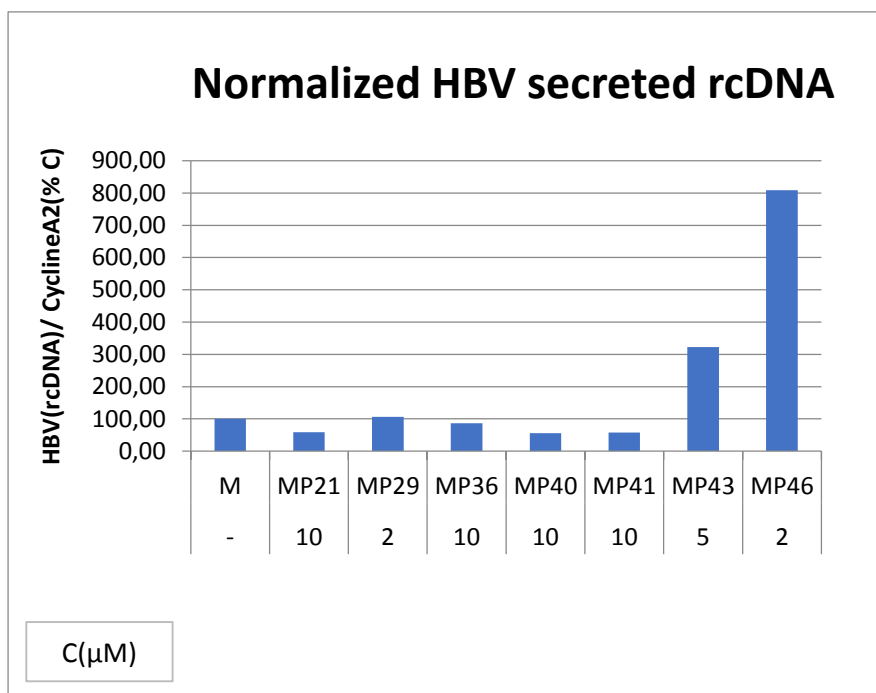
με το δείγμα ελέγχου. Παρατηρούμε ότι οι περισσότερες εκ των δραστικών ουσιών φέρουν σαν υποκαταστάτη πιπεριδίνη, ενώ μόνο μια ουσία με τον ίδιο υποκαταστάτη φαίνεται να μην εμφανίζει ανασταλτική δράση. Ωστόσο, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των τιμών IC₅₀ και CC₅₀, για πιο αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

8.2.Κανονικοποίηση δραστικών αντι-HBV ουσιών

Μετά τον έλεγχο του εκκρινόμενου rcDNA, επιλέγουμε τις ουσίες που φάνηκαν να είναι οι πιο δραστικές έναντι του HBV και προχωράμε σε περαιτέρω ανάλυση. Αυτή τη φορά ποσοτικοποιούμε το κυτταρικό γονίδιο της κυκλίνης από το δείγμα των πυρήνων και ακολουθεί κανονικοποίηση των προηγούμενων αποτελεσμάτων για το rcDNA. Πιο συγκεκριμένα για τα δείγματα πυρήνα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης πυρήνων παρόμοιο του DNA extraction (βλ. Υλικά-Μεθόδους 2.22.1). Μετά την απομόνωση ακολούθησε qPCR ανάλυση με εκκινητή CyclinA σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις ανά δείγμα και κανονικοποίηση .

C (μM)		Mean	SD	Inhibition %
-	M	100,00	11,01	
10	MP21	58,47	1,78	41,53
2	MP29	105,86	12,02	0
10	MP36	86,06	2,05	13,94
10	MP40	55,38	2,12	44,62
10	MP41	57,28	2,35	42,72
5	MP43	323,02	17,27	0
2	MP46	809,18	2,40	0

Πίνακας 5: Αντι-HBV δράση των αντικών ουσιών εκφρασμένη ως % αναστολή του ιϊκού DNA κανονικοποιημένα με CyclinA. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι φαρμακευτικές ουσίες με την καλύτερη δράση κατά του HBV, καθώς επίσης και η ασφαλής συγκέντρωση στην οποία ελέγχθηκε κάθε ουσία, το ποσοστό κανονικοποιημένου rcDNA του HBV που ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο και η αναστολή % που προκαλεί το κάθε φάρμακο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (M) μετά την κανονικοποίηση..

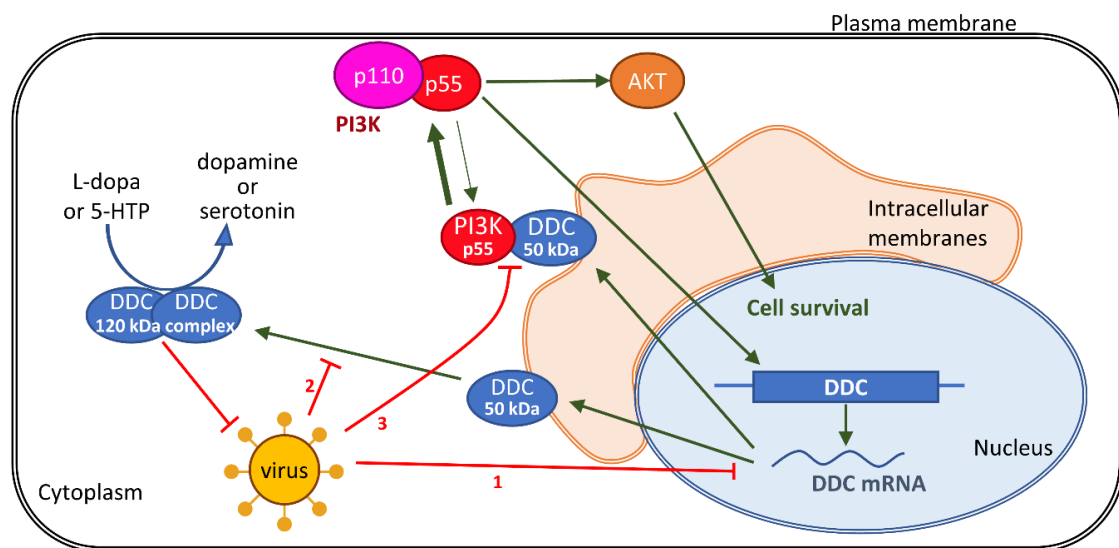


Διάγραμμα 2: Αντι-HBV δράση των αντικών ουσιών εκφρασμένη ως % αναστολή του ιικού DNA κανονικοποιημένα με CyclinA: Κύτταρα HepG2-NTCP μολύνθηκαν με HBV (MOI=1) και επώστηκαν στο 20% O₂ παρουσία κάθε μιας από τις αντικές ουσίες, από τα οποία μια εβδομάδα μετά τη μόλυνση συλλέχθηκε το υπερκείμενο και λύθηκαν για RNA και DNA. Ανάλυση RT-qPCR για το κυτταρικό γονίδιο της κυκλίνης από κύτταρα HepG2-NTCP μολυσμένα με τον ιό. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η ποσότητα αντιγράφων των rcDNA του HBV που ανιχνεύθηκε στο υπερκείμενο κανονικοποιημένα ως προς το γονίδιο της κυκλίνης που ανιχνεύθηκε στον πυρήνα έπειτα από την επώαση με αντικές ουσίες.

Με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου υπολογίσαμε το κυτταρικό γονίδιο της κυκλίνης A που ανιχνεύεται στους πυρήνες των πιο δραστικών δειγμάτων και έπειτα κανονικοποιήσαμε με βάση αυτά τα δεδομένα, τα αποτελέσματα των rcDNA των υπερκειμένων. Έτσι λαμβάνουμε την εικόνα του Πίνακα 5 και του Διαγράμματος 2, τα οποία υποδεικνύουν ότι τα πιο δραστικά από τα ανάλογα είναι το MP21 με 41,53%, το MP40 με 44,62% και το MP41 με 42,72% αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού του HBV. Τα MP21 και MP41 φέρουν πιπεριδίνη σαν πλευρικό υποκαταστάτη, ενώ το MP40 που εμφάνισε και τη μεγαλύτερη αναστολή, φέρει μορφολίνη.

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την παρούσα μελέτη εξάγεται το συμπέρασμα ότι η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC), ένα ένζυμο που καταλύει την βιοσύνθεση της ντοπαμίνης, είναι καθοριστικός παράγοντας στον κύκλο ζωής του HCV, αλλά και αντίστροφα, η DDC ρυθμίζεται αρνητικά από τον ιό. Πιο συγκεκριμένα, και το mRNA της DDC αλλά και η πρωτεΐνη φαίνεται να σχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα της ιικής αντιγραφής σε ηπατικά κύτταρα, όπως προκύπτει από τα πειράματα μολύνσεων με HCV. Επιπλέον, η ενζυμική αναστολή της DDC, βελτιώνει τον ιικό πολλαπλασιασμό. Τέλος, βασισμένοι σε πρόσφατη δημοσίευση για την αλληλεπίδραση της DDC με τον PI3K, αλλά και γνωρίζοντας τον ρόλο του PI3K στην ιική αντιγραφή, διερευνήσαμε πως ο παράγοντας PI3K εμπλέκεται στην σχέση HCV-DDC. Από τα αποτελέσματα προέκυψε η Εικόνα 29 που περιγράφει το μηχανισμό της τριμερούς σχέσης μεταξύ των HCV-DDC-PI3K.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού στη σχέση μεταξύ HCV μόλυνσης, DDC και PI3K/AKT μονοπατιού. Η ιική μόλυνση αναστέλλει τη DDC σε τρία επίπεδα: 1) ρυθμίζει αρνητικά το DDC mRNA, 2) μειώνει την απελευθέρωση του 50 kDa DDC μονομερούς από τις ενδοκυττάρειες μεμβράνες και παράλληλα τον σχηματισμό του 120 kDa συμπλόκου της DDC, που πιθανώς αποτελεί την ενζυμικά ενεργή μορφή της πρωτεΐνης και 3) παρεμποδίζει την σύνδεση του 50 kDa DDC μονομερούς με την υπομονάδα p55 του PI3K, κάτι που επιτρέπει στην p55 να αλληλεπιδρά με την p110, αυξάνοντας την ενεργότητα του PI3K/AKT μονοπατιού υπέρ της κυτταρικής επιβίωσης και του ιικού πολλαπλασιασμού σε όλα τα στάδια της HCV μόλυνσης. Αντίστροφα, η ενζυμική ενεργότητα της DDC καταστέλλει τον ιικό πολλαπλασιασμό (408)

Παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση στην έκφραση της DDC κατά τη μόλυνση με HCV σε Huh7,5 κύτταρα, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικού οξυγόνου (20% O₂), που χρησιμοποιείται συνήθως στις κυτταρικές καλλιέργειες, αλλά και σε συνθήκες υποξίας που προσομοιάζουν τη νορμοξία του ήπατος (3% O₂). Η αρνητική ρύθμιση του DDC mRNA που προκαλείται από την μόλυνση με HCV, εντοπίζεται χρονικά αργότερα μετά τη μόλυνση (96 h) σε ατμοσφαιρικό O₂ (Εικόνα 16). Όσον αφορά τον αντίκτυπο του HCV στην πρωτεΐνη DDC, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ιική μόλυνση μειώνει τα επίπεδα της DDC 120 kDa με παράλληλη συσσώρευση του μονομερούς των 50 kDa και στις δύο συνθήκες οξυγόνου από τις πρώτες χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση (Εικόνα 17). Η πρωτεΐνη ~120 kDa της DDC που ανιχνεύσαμε διαθέτει ένα μοριακό βάρος παρόμοιο με την υποτιθέμενη ενζυμικά ενεργή μορφή της πρωτεΐνης (244) και πιθανώς να πρόκειται για το συγκεκριμένο ανθεκτικό στο SDS υδρόφοβο σύμπλοκο. Οι άλλες ανοσοδραστικές μορφές της DDC ~60 και ~80 kDa δεν φαίνεται να επηρεάζονται από τον ιό κι έτσι δεν μελετήθηκαν περαιτέρω. Επιπλέον, η ρύθμιση της DDC από τον HCV, εξαρτάται έστω μερικώς από το στάδιο της ιικής αντιγραφής.

Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των DDC mRNA μεταγράφων και την υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης σε μολυσμένα κύτταρα με HCV, κάτι που δεν έχει δειχθεί στο παρελθόν, συμπεραίνουμε ότι η ιική μόλυνση δεν επηρεάζει τους τύπους των DDC μεταγράφων, που εκφράζονται σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος και αποτελούνται κυρίως από μη νευρικού τύπου μετάγραφα και χαμηλά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα νευρικού τύπου (Εικόνα 19). Ο νευρικός τύπος του DDC μεταγραφώματος έχει προηγουμένως ανιχνευθεί και σε άλλους μη νευρικούς ιστούς, όπως πλακούντα, νεφρό και λευκοκύτταρα (241) (235, 238). Επιπλέον, για πρώτη φορά έγινε υποκυτταρική κλασματοποίηση και ανίχνευση της DDC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μόλυνση με HCV μειώνει τα επίπεδα του συμπλόκου 120 kDa και παράλληλα αυξάνουν το μεμβρανο-συνδεδεμένο μονομερές 50 kDa, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την κατανομή τους στα διάφορα κυτταρικά κλάσματα (κυτταροπλασματικό, μεμβρανικό, πυρηνικό και μετα-πυρηνικό 1/2). Το μονομερές 50 kDa εντοπίζεται στο μεμβρανικό και το αδιάλυτο, μετα-πυρηνικό κλάσμα 1 και 2, φανερώνοντας την υδροφοβικότητα του μορίου, ενώ το σύμπλοκο 120 kDa βρέθηκε στο διαλυτό, κυτταροπλασματικό κλάσμα (Εικόνα 20), που συμπίπτει με την τοπολογία στο κύτταρο

της ενεργούς μορφής της DDC (249). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για το mRNA και την πρωτεΐνη της DDC, σε εικόνα ανοσοφθορισμού κυττάρων μολυσμένων με HCV παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ενδοκυττάριας DDC πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα, καθώς και ότι η DDC δεν συνεντοπιζόταν με την ιική πρωτεΐνη HCV NS5A (Εικόνα 21). Βάσει των παραπάνω δεδομένων, προτείνουμε ότι το μονομερές 50 kDa απελευθερώνεται από το μεμβρανικό κλάσμα με ενζυμο-εξαρτώμενο μηχανισμό και ο HCV μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά τη DDC μέσω αναστολής της απελευθέρωσής της και τη μεταφορά της από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα.

Μελετώντας της επίδραση του ενζύμου DDC στον HCV, τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η DDC αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του HCV, καθώς ο αναστολέας της DDC, καρβιντόπα, προκαλεί επαγωγή της ιικής αντιγραφής και μολυσματικότητας (Εικόνα 22). Συγκεκριμένα, κατά τη δράση της καρβιντόπας παρατηρείται παράλληλα με την αύξηση της αντιγραφής και της μολυσματικότητας, ταυτόχρονη αύξηση και του ενδοκυττάριου ATP, που μπορεί να συσχετιστεί με αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων (408). Αυτό μπορεί να συνδέεται με την μέσω της αναστολής της DDC, ενεργοποίηση του PI3K/AKT μονοπατιού, που περιμένουμε να επηρεάζει θετικά τον HCV πολλαπλασιασμό. Επιπλέον η καρβιντόπα, δεν επηρεάζει την διαμεσολαβούμενη από τον ιό, ρύθμιση των επιπέδων του συμπλόκου 120 kDa και του μονομερούς 50 kDa της DDC, παρά το γεγονός ότι επάγει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της DDC (Εικόνα 23) σε μολυσμένα και μη κύτταρα.

Η αρνητική επίδραση της καρβιντόπας στο σύμπλοκο DDC-PI3K (406), έχει πιθανότατα θετική επίδραση για τον ιό. Ειδικότερα, έπειτα από επώαση με καρβιντόπα, η απελευθέρωση του PI3K από το σύμπλοκο DDC-PI3K, μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του PI3K, υπονοώντας ότι η DDC αναστέλλει τη δράση του PI3K, απομονώνοντάς τον. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν ότι η καρβιντόπα επάγει την φωσφορυλίωση του AKT και αυξάνει τα επίπεδα της p55 υπομονάδας του PI3K (Εικόνα 23), σε μολυσμένα και μη κύτταρα. Έτσι η καρβιντόπα, μέσω της απελευθέρωσης και της ενεργοποίησης του PI3K, μπορεί να επηρεάσει θετικά την ιική αντιγραφή και ο ιός με τη σειρά του να στοχεύει σε

αποδιοργάνωση του συμπλόκου DDC-PI3K, με σκοπό να αυξήσει την ενεργότητα του PI3K/AKT μονοπατιού.

Μετά τον εντοπισμό του μονομερούς της DDC 50 kDa στη μεμβράνη, γνωρίζοντας ότι ο PI3K στρατολογείται σε μεμβρανικές περιοχές (409, 410), αλλά και μετά από πρόσφατα δεδομένα για αλληλεπίδραση των δύο μορίων (406), οδηγούμαστε σε συσχετισμό των δύο με τον HCV. Η ενεργότητα του PI3K/AKT μονοπατιού, που είναι γνωστό ότι συμβάλλει στην χρόνια λοίμωξη με HCV (340, 347, 392, 411-413), φαίνεται να είναι σημαντική για την επίδραση του HCV στα επίπεδα του 50 kDa πρωτεϊνικού μονομερούς (Εικόνα 24). Η αναστολή του PI3K προκαλεί μείωση της πρωτεϊνικής έκφρασης της DDC, αν και φαίνεται να δρα με ανεξάρτητο τρόπο για τον ιό (408), καθώς και ανεξάρτητα του AKT (Εικόνα 26). Η αρνητική ρύθμιση στην έκφραση του DDC γονιδιώματος μέσω της αναστολής του PI3K, μπορεί να μεταφραστεί σαν απόκριση στην κυτταρική επιβίωση, αφού η DDC έχει συσχετιστεί με τον αποπτωτικό μηχανισμό (414). Συμπερασματικά, ενώ η ενεργότητα του PI3K επάγει την έκφραση της DDC, η ιική μόλυνση, η οποία ρυθμίζει θετικά τον PI3K από τα πρώτα στάδια της μόλυνσης, δεν επιτρέπει την διαμεσολαβούμενη από τον PI3K αύξηση της DDC, με σκοπό να εξασφαλίσει την κυτταρική επιβίωση προς όφελος του ιού, με σκοπό να διατηρήσει τον ιικό πολλαπλασιασμό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κατά τη μόλυνση, επηρεάζεται και η ενεργοποίηση του παράγοντα HIF-1 από τον ιό, σε όνιμο στάδιο μετά τις 72 h.p.i. Επιπλέον, στο 3% O₂ τα επίπεδα mRNA της DDC στα μη μολυσμένα φαίνονται ελαφρώς μειωμένα, μέσω του HIF-1 (373). Από τα δεδομένα αυτά, μπορούμε να πιθανολογήσουμε ότι το αρνητικό αποτέλεσμα της HCV μόλυνσης στην έκφραση του mRNA της DDC μπορεί να οφείλεται, έστω και μερικώς, στην μέσω του ιού, θετική ρύθμιση του HIF. Αν και το χαμηλό O₂ δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DDC στα μη μολυσμένα κύτταρα, παρατηρήσαμε ότι έπειτα από μόλυνση με τον HCV προκαλείται μείωση στα επίπεδα του συμπλόκου των 120 kDa της DDC, με ταυτόχρονη συσσώρευση του μονομερούς των 50 kDa και στις δύο συνθήκες οξυγόνου, 20 και 3% (Εικόνα 17). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ειδικό αναστολέα του HIF-1, φάνηκε ότι το σύμπλοκο των 120 kDa και το μονομερές των 50 kDa της DDC είναι ανεξάρτητα από την επαγωγή του HIF-1 μέσω του ιού στο 20% O₂ (Εικόνα 27).

Συμπερασματικά, αν και η DDC είχε μείνει ένα αφανές και παρεξηγημένο ένζυμο, καθώς η λειτουργία του στους περιφερειακούς ιστούς παραμένει άγνωστη, τα δεδομένα μας παρέχουν νέες αποδείξεις για τον ρόλο της στη ρύθμιση της HCV αντιγραφής σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος.. Η μελέτη δείχνει την σημασία της πρωτεΐνης L-Dora αποκαρβοξυλάσης στην πολύπλοκη αντίδραση του HCV με το κύτταρο ξενιστή και ανοίγει νέους δρόμους στην εύρεση καινοτόμων θεραπευτικών στόχων. Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί πως η συμμετοχή του PI3K/AKT μονοπατιού στη σχέση HCV-DDC και στην έκφραση της DDC, καθώς και ο ρόλος του στην εγκαθίδρυση του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (415), μπορούν να αποτελέσουν σημαντικούς παράγοντες στην καρκινογένεση εξαιτίας του HCV.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας επιλέχθηκε ένας άλλος ιός που προσβάλλει το ήπαρ, για εξέταση του τρόπου με τον οποίο επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου DDC. Όσον αφορά τη συσχέτιση της ηπατίτιδας Β με την πρωτεΐνη DDC, τα πρώιμα ενδεικτικά πειράματα που έγιναν δεν έδωσαν σαφή εικόνα. Δεν υπήρξε αλλαγή στην ποσότητα του συμπλόκου 120 kDa, αλλά ούτε και στο μονομερές 50 kDa της DDC μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων. Επίσης η ασαφής εικόνα της ιικής HBs πρωτεΐνης δυσκολεύει την εξαγωγή συμπεράσματος και υποδεικνύει την ανάγκη για νέα πειράματα. Ωστόσο, η συσχέτιση κι άλλων ηπατοτρόπων ιών με την DDC αποτελεί ένα καινοτόμο ερευνητικό τομέα με ενδιαφέροντα ζητήματα.

Μελετώντας περαιτέρω την ηπατίτιδα Β, προχωρήσαμε στην αξιολόγηση νέων φαρμακευτικών αναλόγων κατά του HBV. Παρά την ύπαρξη εμβολίου και φαρμακευτικών ουσιών έναντι της ηπατίτιδας Β, είναι επιτακτική η ανάγκη για εύρεση νέων αντικών αναλόγων με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, κυρίως λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας των ικών στελεχών. Βασισμένοι στις θετικές ενδείξεις ενός βενζιμιδαζολικού αναλόγου για τη δράση του κατά του ιού HBV, ο καθ.Μαράκος και η ομάδα του ανέπτυξαν έναν σημαντικό αριθμό βενζιμιδαζολικών αναλόγων, τα οποία ελέγχθηκαν σε κύτταρα HepG2-NTCP στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ.

Από τα συνολικά 28 νέα αντικά ανάλογα αυτά που εμφάνισαν αξιόλογη δράση έναντι του HBV ήταν τα MP21, MP29, MP36, MP40, MP41, MP43 και MP46 με αναστολή του ιού πάνω από 45% συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου στο

κυτταροπλασματικό δείγμα, με ανίχνευση του HBV rcRNA. Συγκεκριμένα το MP21 εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό αναστολής του HBV που φτάνει το 55,27% και ακολουθεί το MP36 με 54,38% αναστολή. Παρατηρούμε ότι τα MP21, MP29, MP36 και MP41 φέρουν πιπεριδίνη, ενώ τα MP40, MP43 και MP46 φέρουν μορφολίνη σαν υποκαταστάτη. Επιπλέον μόνο ένα ανάλογο με πιπεριδίνη για υποκαταστάτη παρουσίασε μηδενική αναστολή. Τα ανάλογα με υποκαταστάτες αιθένιο, N-μεθυλπιπεραζίνη και διεθυλαμίνη δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική αναστολή στην αντιγραφή του ιού. Σε περαιτέρω μελέτη των πλέον δραστικών αναλόγων, έγινε κανονικοποίηση του rcDNA των υπερκειμένων με το κυτταρικό γονίδιο της κυκλίνης A των πυρήνων, και φάνηκε ότι τα MP21, MP40 και MP41 παρουσιάζουν αναστολή 40-45% στην ιική αντιγραφή.

Η δομή της ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνης, εξαιτίας της ισοστερείας της με το δακτύλιο της πουρίνης πιθανόν να προσφέρει αυξημένη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με ιικά ένζυμα και κυτταρικά στοιχεία. Τα αντικά ανάλογα που συντέθηκαν διαφοροποιούνται σε σχέση με το BM601 στην υποκατάσταση του πυριδινικού δακτυλίου με την προσθήκη του τοζυλικού υποκαταστάτη και στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας στη 2-θέση της ιμιδαζοπυριδίνης. Με βάση τα πρώιμα αυτά αποτελέσματα, φαίνεται ότι η δομή τόσο της πιπεριδίνης όσο και της μορφολίνης, ετεροκυκλικών οργανικών ενώσεων, αλληλεπιδρούν με στοιχεία και μηχανισμούς του κυττάρου σε σχέση με τον HBV, παρουσιάζοντας αξιόλογα αντικά αποτελέσματα. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι τα δεδομένα που παρατίθενται αποτελούν προκαταρκτικά αποτελέσματα, καθώς για την αξιόπιστη σύγκριση των μορίων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των τιμών IC₅₀ (συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή της σύνθεσης του ιικού DNA) και CC₅₀ (συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί θάνατο στο 50% των ηπατικών κυττάρων).

Στόχους για μελλοντική διερεύνηση αποτελεί τόσο ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της ενζυμικής δράσης της DDC στο κύτταρο και σε σχέση με άλλους ηπατοτρόπους ιούς, όσο και ο προσδιορισμός των τιμών IC₅₀ και CC₅₀ για τα αντικά φάρμακα κατά του HBV. Η DDC είναι ένα ενδιαφέρον μόριο με πολλές άγνωστες ακόμα λειτουργίες που χρήζουν μελέτης, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε συσχέτιση με την ιική μόλυνση, καθώς μπορεί να εμπλέκεται σε θεμελιώδη μονοπάτια του κυττάρου και να

αποτελέσει έναν μελλοντικό φαρμακευτικό στόχο. Αντίστοιχα, πρέπει να πραγματοποιηθεί ολοκληρωμένη αξιολόγηση των αντικών ουσιών έτσι ώστε να προχωρήσει η μελέτη τους από το εργαστηριακό στάδιο στην κλινική μελέτη και τελικά να εμπλουτίσουν την φαρέτρα της επιστήμης με νέα φαρμακευτικά ανάλογα έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β.

Βιβλιογραφία

1. WHO. What is hepatitis? WHO [cited 2018 Jun 10]. Available from: <http://www.who.int/features/qa/76/en/>
2. Vergani D MI, Mieli-Vergani G. . The Autoimmune Diseases Elsevier; 2014 p. 889–907.
3. Hoofnagle JH. Therapy of acute and chronic viral hepatitis. *Advances in internal medicine*. 1994;39:241-75.
4. Zuckerman AJ. Hepatitis Viruses. 1996. In: *Medical Microbiology* [Internet]. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 4th. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7864/>.
5. Zuckerman AJ. Viral hepatitis. *Transfusion medicine*. 1993;3(1):7-19.
6. Scheel TK, Simmonds P, Kapoor A. Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses. *Antiviral research*. 2015;115:83-93.
7. Knodell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology*. 1975;69(6):1278-85.
8. Prince AM, Brotman B, Grady GF, Kuhns WJ, Hazzi C, Levine RW, et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*. 1974;2(7875):241-6.
9. Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*. 1975;2(7940):838-41.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989;244(4902):359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244(4902):362-4.
12. Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet*. 2008;372(9635):321-32.
13. Conry-Cantilena C, VanRaden M, Gibble J, Melpolder J, Shakil AO, Viladomiu L, et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 1996;334(26):1691-6.
14. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S21-9.
15. Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *Journal of hepatology*. 2001;34(5):730-9.

16. Zignego AL, Ferri C, Pileri SA, Caini P, Bianchi FB, Italian Association of the Study of Liver Commission on Extrahepatic Manifestations of HCVi. Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2007;39(1):2-17.
17. Louie KS, Micallef JM, Pimenta JM, Forssen UM. Prevalence of thrombocytopenia among patients with chronic hepatitis C: a systematic review. *Journal of viral hepatitis*. 2011;18(1):1-7.
18. Alter MJ. HCV routes of transmission: what goes around comes around. *Seminars in liver disease*. 2011;31(4):340-6.
19. Tohme RA, Holmberg SD. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? *Hepatology*. 2010;52(4):1497-505.
20. Ponde RA. Hidden hazards of HCV transmission. *Medical microbiology and immunology*. 2011;200(1):7-11.
21. Lam NC, Gotsch PB, Langan RC. Caring for pregnant women and newborns with hepatitis B or C. *American family physician*. 2010;82(10):1225-9.
22. Mast EE. Mother-to-infant hepatitis C virus transmission and breastfeeding. *Advances in experimental medicine and biology*. 2004;554:211-6.
23. Thomas DL, Villano SA, Riester KA, Hershow R, Mofenson LM, Landesman SH, et al. Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study. *The Journal of infectious diseases*. 1998;177(6):1480-8.
24. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(17):2436-41.
25. Abdelwahab KS, Ahmed Said ZN. Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(2):862-73.
26. Hagan H, Pouget ER, Des Jarlais DC. A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(1):74-83.
27. Schiff ER, de Medina M, Kahn RS. New perspectives in the diagnosis of hepatitis C. *Seminars in liver disease*. 1999;19 Suppl 1:3-15.
28. Germer JJ, Zein NN. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. *Mayo Clinic proceedings*. 2001;76(9):911-20.
29. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C. *Hepatology*. 1997;26(3 Suppl 1):2S-10S.
30. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*. 1996;23(2):205-9.

31. Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of virology*. 1999;73(12):9718-25.
32. Paul D, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell host & microbe*. 2014;16(5):569-79.
33. Elberry MH, Darwish NHE, Mousa SA. Hepatitis C virus management: potential impact of nanotechnology. *Virology journal*. 2017;14(1):88.
34. Moradpour D, Blum HE. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2005;17(5):477-83.
35. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(17):2406-15.
36. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2004;39(1):5-19.
37. Rijnbrand RC, Lemon SM. Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication. *Current topics in microbiology and immunology*. 2000;242:85-116.
38. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Advances in virus research*. 2004;63:71-180.
39. Vassilaki N, Friebe P, Meuleman P, Kallis S, Kaul A, Paranhos-Baccala G, et al. Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication. *Journal of virology*. 2008;82(23):11503-15.
40. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *Journal of virology*. 2001;75(24):12047-57.
41. Kim YK, Kim CS, Lee SH, Jang SK. Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(1):105-12.
42. Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *Journal of virology*. 2002;76(11):5326-38.
43. Yi M, Lemon SM. 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*. 2003;77(6):3557-68.
44. Yi M, Lemon SM. 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):331-45.
45. Spangberg K, Wiklund L, Schwartz S. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 1):113-20.
46. Cristofari G, Ivanyi-Nagy R, Gabus C, Boulant S, Lavergne JP, Penin F, et al. The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs

dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro. *Nucleic acids research*. 2004;32(8):2623-31.

47. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *Journal of virology*. 2005;79(17):11353-65.

48. Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *Journal of virology*. 2010;84(18):9118-27.

49. de Chasse B, Navratil V, Tafforeau L, Hiet MS, Aublin-Gex A, Agaoglu S, et al. Hepatitis C virus infection protein network. *Molecular systems biology*. 2008;4:230.

50. Boulant S, Montserret R, Hope RG, Ratinier M, Targett-Adams P, Lavergne JP, et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(31):22236-47.

51. Dubuisson J. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Current topics in microbiology and immunology*. 2000;242:135-48.

52. Ralston R, Thudium K, Berger K, Kuo C, Gervase B, Hall J, et al. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *Journal of virology*. 1993;67(11):6753-61.

53. Deleersnyder V, Pillez A, Wychowski C, Blight K, Xu J, Hahn YS, et al. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of virology*. 1997;71(1):697-704.

54. Carrere-Kremer S, Montpellier-Pala C, Cocquerel L, Wychowski C, Penin F, Dubuisson J. Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 2002;76(8):3720-30.

55. Clarke D, Griffin S, Beales L, Gelais CS, Burgess S, Harris M, et al. Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(48):37057-68.

56. Luik P, Chew C, Aittoniemi J, Chang J, Wentworth P, Jr., Dwek RA, et al. The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(31):12712-6.

57. Chandler DE, Penin F, Schulten K, Chipot C. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS computational biology*. 2012;8(9):e1002702.

58. Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses*. 2010;2(9):2078-95.

59. Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(13):5342-7.

60. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C Virus Proteins: From Structure to Function. 2013;369:113-42.

61. Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, et al. Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 1998;72(8):6758-69.
62. Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *Journal of virology*. 2000;74(5):2293-304.
63. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;369:113-42.
64. Raney KD, Sharma SD, Moustafa IM, Cameron CE. Hepatitis C virus non-structural protein 3 (HCV NS3): a multifunctional antiviral target. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(30):22725-31.
65. Asabe SI, Tanji Y, Satoh S, Kaneko T, Kimura K, Shimotohno K. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *Journal of virology*. 1997;71(1):790-6.
66. Hugle T, Fehrmann F, Bieck E, Kohara M, Krausslich HG, Rice CM, et al. The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*. 2001;284(1):70-81.
67. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of virology*. 2002;76(12):5974-84.
68. Gosert R, Egger D, Lohmann V, Bartenschlager R, Blum HE, Bienz K, et al. Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of virology*. 2003;77(9):5487-92.
69. Lin C, Wu JW, Hsiao K, Su MS. The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins. *Journal of virology*. 1997;71(9):6465-71.
70. Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, et al. Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nature biotechnology*. 2008;26(9):1019-27.
71. Einav S, Elazar M, Danieli T, Glenn JS. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *Journal of virology*. 2004;78(20):11288-95.
72. Thompson AA, Zou A, Yan J, Duggal R, Hao W, Molina D, et al. Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity. *Biochemistry*. 2009;48(5):906-16.
73. Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *Journal of virology*. 2009;83(5):2163-77.

74. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 3):721-9.
75. Reed KE, Xu J, Rice CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase. *Journal of virology*. 1997;71(10):7187-97.
76. Ross-Thrieland D, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: enigmatic but still promiscuous 10 years on! *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 4):727-38.
77. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO journal*. 1996;15(1):12-22.
78. Lohmann V, Korner F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *Journal of virology*. 1997;71(11):8416-28.
79. Lesburg CA, Cable MB, Ferrari E, Hong Z, Mannarino AF, Weber PC. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nature structural biology*. 1999;6(10):937-43.
80. Simister P, Schmitt M, Geitmann M, Wicht O, Danielson UH, Klein R, et al. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *Journal of virology*. 2009;83(22):11926-39.
81. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-27.
82. Borgia SM, Hedskog C, Parhy B, Hyland RH, Stamm LM, Brainard DM, et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. *The Journal of infectious diseases*. 2018;218(11):1722-9.
83. Hedskog C, Parhy B, Chang S, Zeuzem S, Moreno C, Shafran SD, et al. Identification of 19 Novel Hepatitis C Virus Subtypes—Further Expanding HCV Classification. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019;6(3).
84. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/56/hcv-classification.
85. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *The Journal of general virology*. 1993;74 (Pt 11):2391-9.
86. Nakano T, Lau GM, Lau GM, Sugiyama M, Mizokami M. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(2):339-45.

87. Ohno O, Mizokami M, Wu RR, Saleh MG, Ohba K, Orito E, et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(1):201-7.
88. Kato N, Ootsuyama Y, Ohkoshi S, Nakazawa T, Sekiya H, Hijikata M, et al. Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;189(1):119-27.
89. Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, Stump DD, Keller TR, Rodriguez A, et al. Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions. *Rna*. 2002;8(5):557-71.
90. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(34):7824.
91. Triantos C, Konstantakis C, Tselekouni P, Kalafateli M, Aggeletopoulou I, Manolakopoulos S. Epidemiology of hepatitis C in Greece. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(36):8094.
92. Forton DM, Wright M, Knapp S, Thursz MR, Taylor-Robinson SD, Thomas HC. New insights into hepatitis C. *Clinical medicine*. 2002;2(6):554-9.
93. Isaguliantis MG. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2003;4(3):169-83.
94. Poenisch M, Bartenschlager R. New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications. *Seminars in liver disease*. 2010;30(4):333-47.
95. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 7):1631-48.
96. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*. 1998;282(5390):938-41.
97. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(22):12766-71.
98. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*. 2006;80(14):6964-72.
99. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):7271-6.
100. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837-49.

101. Lavie M, Dubuisson J. Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during virus entry and assembly. *Biochimie*. 2017;141:62-9.
102. Tsukiyama-Kohara K, Iizuka N, Kohara M, Nomoto A. Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*. 1992;66(3):1476-83.
103. Wang C, Sarnow P, Siddiqui A. Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *Journal of virology*. 1993;67(6):3338-44.
104. Reynolds JE, Kaminski A, Kettinen HJ, Grace K, Clarke BE, Carroll AR, et al. Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *The EMBO journal*. 1995;14(23):6010-20.
105. Hellen CU, Pestova TV. Translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of viral hepatitis*. 1999;6(2):79-87.
106. Bushell M, Sarnow P. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. *The Journal of cell biology*. 2002;158(3):395-9.
107. Moriishi K. The potential of signal peptide peptidase as a therapeutic target for hepatitis C. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2017;21(9):827-36.
108. Bartenschlager R, Cosset FL, Lohmann V. Hepatitis C virus replication cycle. *J Hepatol*. 2010;53(3):583-5.
109. Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2000;6(4):396-406.
110. Rice CM. New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *Topics in antiviral medicine*. 2011;19(3):117-20.
111. Gastaminza P, Kapadia SB, Chisari FV. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of virology*. 2006;80(22):11074-81.
112. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *Journal of Hepatology*. 2016;65(1):S2-S21.
113. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*. 1999;285(5424):110-3.
114. Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *Journal of virology*. 2001;75(3):1437-49.
115. Blight KJ, McKeating JA, Marcotrigiano J, Rice CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *Journal of virology*. 2003;77(5):3181-90.

116. Saeed M, Scheel TK, Gottwein JM, Marukian S, Dustin LB, Bukh J, et al. Efficient replication of genotype 3a and 4a hepatitis C virus replicons in human hepatoma cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(10):5365-73.
117. Kato T, Date T, Miyamoto M, Furusaka A, Tokushige K, Mizokami M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1808-17.
118. Wose Kinge CN, Espiritu C, Prabdial-Sing N, Sithebe NP, Saeed M, Rice CM. Hepatitis C virus genotype 5a subgenomic replicons for evaluation of direct-acting antiviral agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5386-94.
119. Yu M, Peng B, Chan K, Gong R, Yang H, Delaney Wt, et al. Robust and persistent replication of the genotype 6a hepatitis C virus replicon in cell culture. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2638-46.
120. Steinmann E, Pietschmann T. *Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus*. 2013;369:17-48.
121. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. *International journal of medical sciences*. 2006;3(2):29-34.
122. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005;309(5734):623-6.
123. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*. 2005;11(7):791-6.
124. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9294-9.
125. Yamane D, McGivern DR, Wauthier E, Yi M, Madden VJ, Welsh C, et al. Regulation of the hepatitis C virus RNA replicase by endogenous lipid peroxidation. *Nat Med*. 2014;20(8):927-35.
126. Ramirez S, Mikkelsen LS, Gottwein JM, Bukh J. Robust HCV Genotype 3a Infectious Cell Culture System Permits Identification of Escape Variants With Resistance to Sofosbuvir. *Gastroenterology*. 2016;151(5):973-85.e2.
127. Disson O, Haouzi D, Desagher S, Loesch K, Hahne M, Kremer EJ, et al. Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology*. 2004;126(3):859-72.
128. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nature medicine*. 2001;7(8):927-33.
129. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-65.

130. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England journal of medicine*. 2002;347(13):975-82.
131. Foster GR, Pianko S, Brown A, Forton D, Nahass RG, George J, et al. Efficacy of sofosbuvir plus ribavirin with or without peginterferon-alfa in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection and treatment-experienced patients with cirrhosis and hepatitis C virus genotype 2 infection. *Gastroenterology*. 2015;149(6):1462-70.
132. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(7):482-96.
133. Cuyppers L, Ceccherini-Silberstein F, Van Laethem K, Li G, Vandamme A-M, Rockstroh JK. Impact of HCV genotype on treatment regimens and drug resistance: a snapshot in time. *Reviews in medical virology*. 2016;26(6):408-34.
134. Baumert TF, Juhling F, Ono A, Hoshida Y. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC medicine*. 2017;15(1):52.
135. Barth H. Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. *World journal of hepatology*. 2015;7(5):725.
136. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication--an update. *Journal of viral hepatitis*. 1996;3(5):217-26.
137. Mavilia MG, Wu GY. HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation. *J Clin Transl Hepatol*. 2018;6(3):296-305.
138. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication. *Trends in microbiology*. 1993;1(6):221-8.
139. Lee WM. Hepatitis B virus infection. *The New England journal of medicine*. 1997;337(24):1733-45.
140. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2014;34 Suppl 1:29-37.
141. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiologic reviews*. 2006;28:112-25.
142. Shiffman ML. Management of acute hepatitis B. *Clinics in liver disease*. 2010;14(1):75-91; viii-ix.
143. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *The Journal of infectious diseases*. 1985;151(4):599-603.
144. Lee WM. Etiologies of acute liver failure. *Seminars in liver disease*. 2008;28(2):142-52.
145. McMahon BJ. Chronic hepatitis B virus infection. *The Medical clinics of North America*. 2014;98(1):39-54.

146. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*. 1994;19(6):1513-20.
147. Tang LSY, Covert E, Wilson E, Kottlilil S. Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *Jama*. 2018;319(17):1802-13.
148. McMahon BJ. Natural history of chronic hepatitis B - clinical implications. *Medscape journal of medicine*. 2008;10(4):91.
149. Chang C, Zhou S, Ganem D, Standring DN. Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *Journal of virology*. 1994;68(8):5225-31.
150. Kramvis A. The clinical implications of hepatitis B virus genotypes and HBeAg in pediatrics. *Reviews in medical virology*. 2016;26(4):285-303.
151. Kaito M, Ohba H, Chiba J, Kohara M, Tanaka H, Fujita N, et al. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Medical molecular morphology*. 2006;39(3):136-45.
152. Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J. Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *Journal of virology*. 2008;82(16):7812-7.
153. Gerlich WH. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology journal*. 2013;10:239.
154. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*. 1980;21(3):801-9.
155. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*. 2015;479-480:672-86.
156. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology international*. 2011;5(2):644-53.
157. Lee AT, Lee CG. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellularcarcinoma--the etiopathogenic link. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2007;12:234-45.
158. Glebe D, Bremer CM. The molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in liver disease*. 2013;33(2):103-12.
159. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(1):22-38.
160. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(1):65-73.
161. Vanlandschoot P, Leroux-Roels G. Viral apoptotic mimicry: an immune evasion strategy developed by the hepatitis B virus? *Trends in immunology*. 2003;24(3):144-7.
162. Diab A, Foca A, Zoulim F, Durantel D, Andrisani O. The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBc) in the viral life cycle: Implications for the development of HBc-targeting antivirals. *Antiviral research*. 2018;149:211-20.

163. Verrier ER, Schuster C, Baumert TF. Advancing hepatitis B virus entry inhibitors. *Journal of hepatology*. 2017;66(4):677-9.
164. Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, et al. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 4):871-82.
165. Kumar V, Sarkar DP. Hepatitis B Virus X Protein: Structure-Function Relationships and Role in Viral Pathogenesis. 2004;166:377-407.
166. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular microbiology*. 2008;10(1):122-33.
167. Clark DN, Hu J. Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future virology*. 2015;10(3):283-95.
168. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(1):14-21.
169. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289-309.
170. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(18):5427-34.
171. Fujiwara K, Tanaka Y, Orito E, Ohno T, Kato T, Sugihara K, et al. Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(41):6410-5.
172. Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral research*. 2015;121:24-30.
173. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*. 2010;52(2):282-4.
174. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus research*. 2008;134(1-2):235-49.
175. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2009;51(3):581-92.
176. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *The New England journal of medicine*. 2004;350(11):1118-29.
177. Knaus T, Nassal M. The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic acids research*. 1993;21(17):3967-75.
178. Inoue T, Tanaka Y. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. *Microbial cell*. 2016;3(9):420-37.
179. Yang W, Summers J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *Journal of virology*. 1999;73(12):9710-7.

180. Tu T, Budzinska MA, Shackel NA, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses*. 2017;9(4).
181. Sandhu P, Haque M, Humphries-Bickley T, Ravi S, Song J. Hepatitis B Virus Immunopathology, Model Systems, and Current Therapies. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
182. Chang CM, Jeng KS, Hu CP, Lo SJ, Su TS, Ting LP, et al. Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line. *EMBO J*. 1987;6(3):675-80.
183. Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(4):1005-9.
184. Hantz O, Parent R, Durantel D, Gripon P, Guguen-Guillouzo C, Zoulim F. Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells. *Journal of General Virology*. 2009;90(1):127-35.
185. Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, Zaifert K, Wang GH, Guo JT, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41(8):1715-20.
186. Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Fälth M, et al. Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014;146(4):1070-83.e6.
187. Wieland SF. The Chimpanzee Model for Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015;5(6):a021469-a.
188. Dienstag JL, Popper H, Purcell RH. The pathology of viral hepatitis types A and B in chimpanzees. A comparison. *The American journal of pathology*. 1976;85(1):131-48.
189. Li H, Zhuang Q, Wang Y, Zhang T, Zhao J, Zhang Y, et al. HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cellular & Molecular Immunology*. 2014;11(2):175-83.
190. Larkin J, Clayton M, Sun B, Perchonock CE, Morgan JL, Siracusa LD, et al. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nature Medicine*. 1999;5(8):907-12.
191. Dandri M. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2001;33(4):981-8.
192. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;34 Suppl 1:S1-3.
193. Raney AK, Hamatake RK, Hong Z. Agents in clinical development for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert opinion on investigational drugs*. 2003;12(8):1281-95.

194. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373(9663):582-92.
195. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007;45(2):507-39.
196. Dusheiko G, Antonakopoulos N. Current treatment of hepatitis B. *Gut*. 2008;57(1):105-24.
197. Gish RG, Given BD, Lai C-L, Locarnini SA, Lau JYN, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Research*. 2015;121:47-58.
198. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *The Journal of general virology*. 2000;81(Pt 10):2341-64.
199. Craxi A, Cooksley WG. Pegylated interferons for chronic hepatitis B. *Antiviral research*. 2003;60(2):87-9.
200. Stein LL, Loomba R. Drug targets in hepatitis B virus infection. *Infectious disorders drug targets*. 2009;9(2):105-16.
201. Tacke F, Kroy DC. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Annals of translational medicine*. 2016;4(18):334.
202. Wang YJ, Yang L, Zuo JP. Recent developments in antivirals against hepatitis B virus. *Virus research*. 2016;213:205-13.
203. Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge JA, Dickinson B, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology*. 2005;41(6):1349-56.
204. Bourne C, Lee S, Venkataiah B, Lee A, Korba B, Finn MG, et al. Small-molecule effectors of hepatitis B virus capsid assembly give insight into virus life cycle. *Journal of virology*. 2008;82(20):10262-70.
205. Durantel D, Alotte C, Zoulim F. Glucosidase inhibitors as antiviral agents for hepatitis B and C. *Current opinion in investigational drugs*. 2007;8(2):125-9.
206. Holtz P, Heise R, Lüdtke K. Fermentativer Abbau von l-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1938;191(1):87-118.
207. Lancaster GA, Sourkes TL. Purification and properties of hog-kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase. *Canadian journal of biochemistry*. 1972;50(7):791-7.
208. Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S. Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1970;141(1):356-67.
209. Paterson IA, Juorio AV, Boulton AA. 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? *Journal of neurochemistry*. 1990;55(6):1827-37.

210. Dyck LE, Dewar KM. Inhibition of aromatic L-amino acid decarboxylase and tyrosine aminotransferase by the monoamine oxidase inhibitor phenelzine. *Journal of neurochemistry*. 1986;46(6):1899-903.
211. Jones RS, Boulton AA. Interactions between p-tyramine, m-tyramine, or beta-phenylethylamine and dopamine on single neurones in the cortex and caudate nucleus of the rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1980;58(2):222-7.
212. Gillbro JM, Marles LK, Hibberts NA, Schallreuter KU. Autocrine Catecholamine Biosynthesis and the β 2-Adrenoceptor Signal Promote Pigmentation in Human Epidermal Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004;123(2):346-53.
213. Eaton MJ, Gudehithlu KP, Quach T, Silvia CP, Hadjiconstantinou M, Neff NH. Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *The Journal of comparative neurology*. 1993;337(4):640-54.
214. Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S. On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(2):343-7.
215. Crow TJ. Positive and negative schizophrenia symptoms and the role of dopamine. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 1981;139:251-4.
216. Beltramo M, Krieger M, Calas A, Franzoni MF, Thibault J. Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) immunohistochemistry in vertebrate brainstem with an antiserum raised against AADC made in *E. coli*. *Brain research bulletin*. 1993;32(2):123-32.
217. Tison F, Normand E, Jaber M, Aubert I, Bloch B. Aromatic L-amino-acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in dopaminergic and serotonergic cells of the rat brainstem. *Neuroscience letters*. 1991;127(2):203-6.
218. Snyder SH. Catecholamines in the brain as mediators of amphetamine psychosis. *Archives of general psychiatry*. 1972;27(2):169-79.
219. Fahn S, Libsch LR, Cutler RW. Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. *Journal of the neurological sciences*. 1971;14(4):427-55.
220. Kandel DB, Davies M. Cocaine use in a national sample of U.S. youth (NLSY): ethnic patterns, progression, and predictors. *NIDA research monograph*. 1991;110:151-88.
221. Park DH, Woo JI, Hwang O, Ehrlich M, Abate C, Joh TH. Different charge forms of aromatic-L-amino-acid decarboxylase. *Brain research*. 1986;370(2):375-7.
222. Jaeger CB, Teitelman G, Joh TH, Albert VR, Park DH, Reis DJ. Some neurons of the rat central nervous system contain aromatic-L-amino-acid decarboxylase but not monoamines. *Science*. 1983;219(4589):1233-5.

223. Mura A, Jackson D, Manley MS, Young SJ, Groves PM. Aromatic L-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous L-DOPA to dopamine. *Brain research*. 1995;704(1):51-60.
224. Bowsher RR, Henry DP. Decarboxylation of p-tyrosine: a potential source of p-tyramine in mammalian tissues. *Journal of neurochemistry*. 1983;40(4):992-1002.
225. Lindstrom P, Sehlin J. Mechanisms underlying the effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in pancreatic islets. A proposed role for L-aromatic amino acid decarboxylase. *Endocrinology*. 1983;112(4):1524-9.
226. Mappouras DG, Fragoulis EG. L-dopa decarboxylase in *Ceratitris capitata* white puparia and human: a comparative study. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. 1990;97(2):301-6.
227. Rahman MK, Nagatsu T, Kato T. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates. *Biochemical pharmacology*. 1981;30(6):645-9.
228. Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fandriks L, Lonroth H, et al. Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(11):3864-71.
229. Lauweryns JM, Van Ranst L. Immunocytochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in human, rat, and mouse bronchopulmonary and gastrointestinal endocrine cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1988;36(9):1181-6.
230. Dockray GJ, Varro A, Dimaline R. Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products. *Physiol Rev*. 1996;76(3):767-98.
231. Hussein HS, Balzer HO. Use of TSK-SW columns for the high-performance liquid chromatographic analysis of proteins, isolated from sympathetic nerves and fractionated by fractogel TSK-HW chromatography. Purification of L-DOPA decarboxylase. *Journal of chromatography*. 1984;297:375-83.
232. Voltattorni CB, Minelli A, Cirotto C, Barra D, Turano C. Subunit structure of 3, 4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase from pig kidney. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1982;217(1):58-64.
233. Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Ohye T, Hagino Y, Fujita K, Nagatsu T. Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochemistry*. 1992;31(46):11546-50.
234. Maneckjee R, Baylin SB. Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase. *Biochemistry*. 1983;22(26):6058-63.
235. Mappouras DG, Stiakakis J, Fragoulis EG. Purification and characterization of L-dopa decarboxylase from human kidney. *Molecular and cellular biochemistry*. 1990;94(2):147-56.

236. Ando-Yamamoto M, Hayashi H, Sugiyama T, Fukui H, Watanabe T, Wada H. Purification of L-dopa decarboxylase from rat liver and production of polyclonal and monoclonal antibodies against it. *Journal of biochemistry*. 1987;101(2):405-14.
237. Nishigaki I, Ichinose H, Tamai K, Nagatsu T. Purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody. *The Biochemical journal*. 1988;252(2):331-5.
238. Shirota K, Fujisawa H. Purification and characterization of aromatic L-amino acid decarboxylase from rat kidney and monoclonal antibody to the enzyme. *Journal of neurochemistry*. 1988;51(2):426-34.
239. Siow YL, Dakshinamurti K. Purification of dopa decarboxylase from bovine striatum. *Molecular and cellular biochemistry*. 1990;94(2):121-31.
240. Nasrin S, Ichinose H, Nagatsu T. Comparison of characteristics of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase with human enzyme. *Biochimica et biophysica acta*. 1992;1118(3):318-22.
241. Dominici P, Moore PS, Voltattorni CB. Modified purification of L-aromatic amino acid decarboxylase from pig kidney. *Protein expression and purification*. 1993;4(4):345-7.
242. Maras B, Dominici P, Barra D, Bossa F, Voltattorni CB. Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) decarboxylase. Primary structure and relationships to other amino acid decarboxylases. *European journal of biochemistry*. 1991;201(2):385-91.
243. Burkhard P, Dominici P, Borri-Voltattorni C, Jansonius JN, Malashkevich VN. Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase. *Nature structural biology*. 2001;8(11):963-7.
244. Bertoldi M. Mammalian Dopa decarboxylase: structure, catalytic activity and inhibition. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;546:1-7.
245. Giardina G, Montioli R, Gianni S, Cellini B, Paiardini A, Voltattorni CB, et al. Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(51):20514-9.
246. Ichinose H, Kojima K, Togari A, Kato Y, Parvez S, Parvez H, et al. Simple purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from human pheochromocytoma using high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*. 1985;150(2):408-14.
247. Siow YL, Dakshinamurti K. Effect of pyridoxine deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase in adult rat brain. *Experimental brain research*. 1985;59(3):575-81.
248. Rahman MK, Nagatsu T. Demonstration of aromatic l-amino acid decarboxylase activity in human brain with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Neurochemistry international*. 1982;4(1):1-6.

249. Sims KL, Davis GA, Bloom FE. Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylases in rat brain: assay characteristics and distribution. *Journal of neurochemistry*. 1973;20(2):449-64.
250. Rahman MK, Nagatsu T. Demonstration of aromatic l-amino acid decarboxylase activity in human brain with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Neurochemistry International*. 1982;4(1):1-6.
251. Rahman MK, Nagatsu T, Nagatsu I, Iizuka R, Narabayashi H. **AROMATIC L-AMINO ACID DECARBOXYLASE ACTIVITY IN BRAINS FROM NORMAL HUMAN SUBJECTS AND FROM PATIENTS WITH EXTRAPYRAMIDAL DISEASES**. *Biomedical Research*. 1981;2(5):560-6.
252. Bender DA, Coulson WF. Variations in aromatic amino acid decarboxylase activity towards DOPA and 5-hydroxytryptophan caused by pH changes and denaturation. *Journal of neurochemistry*. 1972;19(12):2801-10.
253. Lancaster GA, Sourkes TL. Purification and Properties of Hog-Kidney 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1972;50(7):791-7.
254. Srinivasan K, Awapara J. Substrate specificity and other properties of DOPA decarboxylase from guinea pig kidneys. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. 1978;526(2):597-604.
255. Bowsher RR, Henry DP. Decarboxylation of p-Tyrosine: A Potential Source of p-Tyramine in Mammalian Tissues. *Journal of Neurochemistry*. 1983;40(4):992-1002.
256. Ichinose H, Kojima K, Togari A, Kato Y, Parvez S, Parvez H, et al. Simple purification of aromatic l-amino acid decarboxylase from human pheochromocytoma using high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 1985;150(2):408-14.
257. Nishigaki I, Ichinose H, Tamai K, Nagatsu T. Purification of aromatic l-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody. *Biochemical Journal*. 1988;252(2):331-5.
258. Dairman W, Horst WD, Marchelle ME, Bautz G. The proportionate loss of L-3,4-dihydroxyphenylalanine and L-5-hydroxytryptophan decarboxylating activity in rat central nervous system following intracisternal administration of 5, 6-dihydroxytryptamine or 6-hydroxydopamine. *Journal of neurochemistry*. 1975;24(4):619-23.
259. Melamed E, Hefti F, Pettibone DJ, Liebman J, Wurtman RJ. Aromatic L-amino acid decarboxylase in rat corpus striatum: implications for action of L-dopa in parkinsonism. *Neurology*. 1981;31(6):651-5.
260. Tanaka T, Horio Y, Taketoshi M, Imamura I, Ando-Yamamoto M, Kangawa K, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(20):8142-6.

261. Sumi C, Ichinose H, Nagatsu T. Characterization of Recombinant Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Expressed in COS Cells. *Journal of Neurochemistry*. 1990;55(3):1075-8.
262. Jebai F, Hanoun N, Hamon M, Thibault J, Peltre G, Gros F, et al. Expression, Purification, and Characterization of Rat Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 1997;11(2):185-94.
263. Coge F, Krieger-Pouliet M, Gros F, Thibault J. Comparative and quantitative study of L-DOPA decarboxylase mRNA in rat neuronal and non-neuronal tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990;170(3):1006-12.
264. Siaterli M-Z. *Neurochemical Research*. 2003;28(6):797-803.
265. Porter CC, Watson LS, Titus DC, Totaro JA, Byer SS. Inhibition of DOPA decarboxylase by the hydrazino analog of alpha-methylDOPA. *Biochemical pharmacology*. 1962;11:1067-77.
266. Carlsson A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 1988;1(3):179-86.
267. Maycock AL, Aster SD, Patchett AA. Inactivation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine decarboxylase by 2-(fluoromethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine. *Biochemistry*. 1980;19(4):709-18.
268. Jonkers N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat. *Journal of neural transmission*. 2001;108(5):559-70.
269. Black BC, Pentz ES, Wright TR. The alpha methyl dopa hypersensitive gene, 1(2)amd, and two adjacent genes in *Drosophila melanogaster*: physical location and direct effects of amd on catecholamine metabolism. *Molecular & general genetics : MGG*. 1987;209(2):306-12.
270. Bertoldi M, Gonsalvi M, Voltattorni CB. Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of dopa decarboxylase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;284(1):90-3.
271. Sumi-Ichinose C, Ichinose H, Takahashi E, Hori T, Nagatsu T. Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry*. 1992;31(8):2229-38.
272. Craig SP, Thai AL, Weber M, Craig IW. Localisation of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) to chromosome 7p13-->p11 by in situ hybridisation. *Cytogenetics and cell genetics*. 1992;61(2):114-6.
273. Scherer LJ, McPherson JD, Wasmuth JJ, Marsh JL. Human dopa decarboxylase: localization to human chromosome 7p11 and characterization of hepatic cDNAs. *Genomics*. 1992;13(2):469-71.
274. Ichinose H, Kurosawa Y, Titani K, Fujita K, Nagatsu T. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid

decarboxylase. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;164(3):1024-30.

275. Jahng JW, Wessel TC, Houpt TA, Son JH, Joh TH. Alternate promoters in the rat aromatic L-amino acid decarboxylase gene for neuronal and nonneuronal expression: an in situ hybridization study. *Journal of neurochemistry*. 1996;66(1):14-9.

276. Siaterli MZ, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG. Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase. *Neurochemical research*. 2003;28(6):797-803.

277. Kokkinou I, Nikolouzou E, Hatzimanolis A, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D. Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes. *Blood cells, molecules & diseases*. 2009;42(1):92-8.

278. Li XM, Juorio AV, Paterson IA, Zhu MY, Boulton AA. Specific irreversible monoamine oxidase B inhibitors stimulate gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 1992;59(6):2324-7.

279. Li XM, Juorio AV, Qi J, Boulton AA. L-deprenyl induces aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) mRNA in the rat substantia nigra and ventral tegmentum. An in situ hybridization study. *Molecular and chemical neuropathology*. 1998;35(1-3):149-55.

280. Kim KT, Park DH, Joh TH. Parallel up-regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by dexamethasone in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*. 1993;60(3):946-51.

281. Hadjiconstantinou M, Rossetti ZL, Wemlinger TA, Neff NH. Dizocilpine enhances striatal tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activity. *European journal of pharmacology*. 1995;289(1):97-101.

282. Wessel TC, Joh TH. Parallel upregulation of catecholamine-synthesizing enzymes in rat brain and adrenal gland: effects of reserpine and correlation with immediate early gene expression. *Brain research Molecular brain research*. 1992;15(3-4):349-60.

283. Li XM, Juorio AV, Boulton AA. Induction of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA by interleukin-1 beta and prostaglandin E2 in PC12 cells. *Neurochemical research*. 1994;19(5):591-5.

284. Li XM, Juorio AV, Boulton AA. NSD-1015 alters the gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat PC12 pheochromocytoma cells. *Neurochemical research*. 1993;18(8):915-9.

285. Buckland PR, O'Donovan MC, McGuffin P. Changes in dopa decarboxylase mRNA but not tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain following antipsychotic treatment. *Psychopharmacology*. 1992;108(1-2):98-102.

286. Li XM, Juorio AV, Qi J, Boulton AA. Amantadine increases aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in PC12 cells. *Journal of neuroscience research*. 1998;53(4):490-3.

287. Buckland PR, Spurlock G, McGuffin P. Amphetamine and vigabatrin down regulate aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA levels. *Brain research Molecular brain research*. 1996;35(1-2):69-76.
288. Li XM, Qi J, Juorio AV, Boulton AA. Reciprocal regulation of the content of aromatic L-amino acid decarboxylase and tyrosine hydroxylase mRNA by NGF in PC12 cells. *Journal of neuroscience research*. 1997;47(4):449-54.
289. O'Malley KL, Harmon S, Moffat M, Uhland-Smith A, Wong S. The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms. *Journal of neurochemistry*. 1995;65(6):2409-16.
290. Chang YT, Mues G, Hyland K. Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA. *Neuroscience letters*. 1996;202(3):157-60.
291. Kokkinou I, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D. The U937 macrophage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase. *Journal of neuroimmunology*. 2009;216(1-2):51-8.
292. Rorsman F, Husebye ES, Winqvist O, Bjork E, Karlsson FA, Kampe O. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(19):8626-9.
293. Vassilacopoulou D, Sideris DC, Vassiliou AG, Fragoulis EG. Identification and characterization of a novel form of the human L-dopa decarboxylase mRNA. *Neurochemical research*. 2004;29(10):1817-23.
294. Gudehithlu KP, Duchemin AM, Silvia CP, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Expression of cloned aromatic L-amino acid decarboxylase in *Xenopus laevis* oocytes. *Neurochemistry international*. 1992;21(2):275-9.
295. Kang SH, Fuchs MS. Purification and partial-characterization of a protease inhibitor from *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta*. 1980;611(2):379-83.
296. Young EA, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain. *Journal of neurochemistry*. 1993;60(6):2331-3.
297. Young EA, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Phorbol ester administration transiently increases aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the mouse striatum and midbrain. *Journal of neurochemistry*. 1994;63(2):694-7.
298. Keabian PR, Keabian JW, Carpenter DO. Regulation of cyclic AMP in heart and gill of *Aplysia* by the putative neurotransmitters dopamine and serotonin. *Life sciences*. 1979;24(19):1757-64.
299. Rubi B, Maechler P. Minireview: new roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. *Endocrinology*. 2010;151(12):5570-81.

300. Lu M, Li J, Luo Z, Zhang S, Xue S, Wang K, et al. Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *OncoTargets and therapy*. 2015;8:1543-52.
301. Zou J, Li H, Huang Q, Liu X, Qi X, Wang Y, et al. Dopamine-induced SULT1A3/4 promotes EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(10):1010428317719272.
302. Liu XF, Long HJ, Miao XY, Liu GL, Yao HL. Fisetin inhibits liver cancer growth in a mouse model: Relation to dopamine receptor. *Oncology reports*. 2017;38(1):53-62.
303. He S, Lin B, Chu V, Hu Z, Hu X, Xiao J, et al. Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection. *Science translational medicine*. 2015;7(282):282ra49.
304. Cao L, Chen J, Wang Y, Yang Y, Qing J, Rao Z, et al. Identification of serotonin 2A receptor as a novel HCV entry factor by a chemical biology strategy. *Protein & Cell*. 2018;10(3):178-95.
305. Simanjuntak Y, Liang JJ, Lee YL, Lin YL. Repurposing of prochlorperazine for use against dengue virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(3):394-404.
306. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*. 2011;63(1):182-217.
307. Gastaminza P, Whitten-Bauer C, Chisari FV. Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(1):291-6.
308. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *The Journal of cell biology*. 1993;123(5):1107-17.
309. Ishida H, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, et al. Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;412(1):92-7.
310. Pramod AB, Foster J, Carvelli L, Henry LK. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. *Molecular aspects of medicine*. 2013;34(2-3):197-219.
311. Jia X, Wang F, Han Y, Geng X, Li M, Shi Y, et al. miR-137 and miR-491 Negatively Regulate Dopamine Transporter Expression and Function in Neural Cells. *Neuroscience bulletin*. 2016;32(6):512-22.
312. Richter S, Qin N, Pacak K, Eisenhofer G. Role of hypoxia and HIF2alpha in development of the sympathoadrenal cell lineage and chromaffin cell tumors with distinct catecholamine phenotypic features. *Advances in pharmacology*. 2013;68:285-317.

313. Brown ST, Kelly KF, Daniel JM, Nurse CA. Hypoxia inducible factor (HIF)-2 alpha is required for the development of the catecholaminergic phenotype of sympathoadrenal cells. *Journal of neurochemistry*. 2009;110(2):622-30.
314. Buchkovich NJ, Yu Y, Zampieri CA, Alwine JC. The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(4):266-75.
315. Munter S, Way M, Frischknecht F. Signaling during pathogen infection. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2006;2006(335):re5.
316. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 10):2359-76.
317. Langland JO, Jacobs BL. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology*. 2002;299(1):133-41.
318. Berro R, Pedati C, Kehn-Hall K, Wu W, Klase Z, Even Y, et al. CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing. *Journal of virology*. 2008;82(14):7155-66.
319. Arias C, Walsh D, Harbell J, Wilson AC, Mohr I. Activation of host translational control pathways by a viral developmental switch. *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000334.
320. Vogt PK, Hart JR, Gymnopoulos M, Jiang H, Kang S, Bader AG, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;347:79-104.
321. Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings BA, et al. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS biology*. 2007;5(4):e95.
322. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current opinion in cell biology*. 1998;10(2):262-7.
323. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, et al. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *The EMBO journal*. 2008;27(14):1932-43.
324. Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7421-6.
325. Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in cancer biology*. 2009;19(1):25-31.
326. Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chinese journal of cancer*. 2015;34(1):4-16.
327. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.

328. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature Cell Biology*. 2002;4(9):699-704.
329. Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, et al. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature cell biology*. 2002;4(9):699-704.
330. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(5):2110-5.
331. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Current biology : CB*. 1999;9(11):601-4.
332. Kaur S, Katsoulidis E, Plataniias LC. Akt and mRNA translation by interferons. *Cell cycle*. 2008;7(14):2112-6.
333. Kaur S, Sassano A, Dolniak B, Joshi S, Majchrzak-Kita B, Baker DP, et al. Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(12):4808-13.
334. Thomas KW, Monick MM, Staber JM, Yarovinsky T, Carter AB, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):492-501.
335. Peng L, Liang D, Tong W, Li J, Yuan Z. Hepatitis C virus NS5A activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, contributing to cell survival by disrupting the interaction between FK506-binding protein 38 (FKBP38) and mTOR. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(27):20870-81.
336. Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*. 2007;318(5852):977-80.
337. Street A, Macdonald A, McCormick C, Harris M. Hepatitis C Virus NS5A-Mediated Activation of Phosphoinositide 3-Kinase Results in Stabilization of Cellular -Catenin and Stimulation of -Catenin-Responsive Transcription. *Journal of virology*. 2005;79(8):5006-16.
338. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, et al. Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of virology*. 2002;76(18):9207-17.
339. Cheng D, Zhang L, Yang G, Zhao L, Peng F, Tian Y, et al. Hepatitis C virus NS5A drives a PTEN-PI3K/Akt feedback loop to support cell survival. *Liver International*. 2015;35(6):1682-91.
340. He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, et al. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction

with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of virology*. 2002;76(18):9207-17.

341. Street A, Macdonald A, Crowder K, Harris M. The Hepatitis C virus NS5A protein activates a phosphoinositide 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(13):12232-41.

342. Banerjee S, Saito K, Ait-Goughoulte M, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein upregulates serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs the downstream akt/protein kinase B signaling pathway for insulin resistance. *Journal of virology*. 2008;82(6):2606-12.

343. Bose SK, Shrivastava S, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *Journal of virology*. 2012;86(11):6315-22.

344. Liu Z, Tian Y, Machida K, Lai MM, Luo G, Fong SK, et al. Transient activation of the PI3K-AKT pathway by hepatitis C virus to enhance viral entry. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(50):41922-30.

345. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in cell & developmental biology*. 2004;15(2):177-82.

346. Cox AD, Der CJ. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(56):8999-9006.

347. Manova P, Beretta L. Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR pathway by hepatitis C virus: control of cell survival and viral replication. *Journal of virology*. 2005;79(14):8742-9.

348. Lee JS, Vo TT, Fruman DA. Targeting mTOR for the treatment of B cell malignancies. *British journal of clinical pharmacology*. 2016;82(5):1213-28.

349. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S5-S16.

350. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(24):8421-5.

351. Zhou L, Huang Y, Li J, Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*. 2009;27(2):255-61.

352. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554.

353. Brugge J, Hung M-C, Mills GB. A New Mutational activation in the PI3K Pathway. *Cancer Cell*. 2007;12(2):104-7.

354. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M, et al. AKT1E17K in human solid tumours. *Oncogene*. 2008;27(42):5648-50.

355. Malanga D, Scrima M, De Marco C, Fabiani F, De Rosa N, de Gisi S, et al. Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT in a subset of squamous cell carcinoma of the lung. *Cell Cycle*. 2014;7(5):665-9.
356. Honda M, Kaneko S, Matsushita E, Kobayashi K, Abell GA, Lemon SM. Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology*. 2000;118(1):152-62.
357. Vassilaki N, Frakolaki E. Virus-host interactions under hypoxia. *Microbes and infection*. 2017;19(3):193-203.
358. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(6):1239-53.
359. de Groot H, Noll T. Oxygen gradients: the problem of hypoxia. *Biochemical Society transactions*. 1987;15(3):363-5.
360. Jobst A. [Pal Bugat, reformer of Hungarian medical terminology]. *Orvosi hetilap*. 1993;134(42):2321-2.
361. Paulson OB. Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2002;12(6):495-501.
362. Zhang CC, Sadek HA. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(12):1891-901.
363. Torre C, Perret C, Colnot S. Molecular determinants of liver zonation. *Progress in molecular biology and translational science*. 2010;97:127-50.
364. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *The New England journal of medicine*. 2011;365(6):537-47.
365. Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, et al. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(32):22575-85.
366. Werth N, Beerlage C, Rosenberger C, Yazdi AS, Edelmann M, Amr A, et al. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PloS one*. 2010;5(7):e11576.
367. Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(46):32631-7.
368. Kwon SJ, Song JJ, Lee YJ. Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1 α phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(21):7607-13.

369. Wilson GK, Tennant DA, McKeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions. *Journal of hepatology*. 2014;61(6):1397-406.
370. Webster KA. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *The Journal of experimental biology*. 2003;206(Pt 17):2911-22.
371. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
372. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*. 2010;330(6009):1340-4.
373. Vassilaki N, Kalliampakou KI, Kotta-Loizou I, Befani C, Liakos P, Simos G, et al. Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. *Journal of virology*. 2013;87(5):2935-48.
374. Cuthbertson DP. Creatine and Creatinine Metabolism. *Nature*. 1944;154(3914):564-5.
375. Ch'ng WC, Stanbridge EJ, Yusoff K, Shafee N. The oncolytic activity of Newcastle disease virus in clear cell renal carcinoma cells in normoxic and hypoxic conditions: the interplay between von Hippel-Lindau and interferon-beta signaling. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2013;33(7):346-54.
376. Chen AY, Kleiboeker S, Qiu J. Productive parvovirus B19 infection of primary human erythroid progenitor cells at hypoxia is regulated by STAT5A and MEK signaling but not HIF1 α . *PLoS pathogens*. 2011;7(6):e1002088.
377. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of cellular physiology*. 2009;219(2):271-5.
378. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(13):5431-6.
379. Ngo H, Tortorella SM, Ververis K, Karagiannis TC. The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities. *Molecular biology reports*. 2015;42(4):825-34.
380. Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, Stupack DG, Siddiqui A. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1 α and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *Journal of virology*. 2007;81(19):10249-57.
381. Ripoli M, D'Aprile A, Quarato G, Sarasin-Filipowicz M, Gouttenoire J, Scrima R, et al. Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 α -mediated glycolytic adaptation. *Journal of virology*. 2010;84(1):647-60.

382. Wilson GK, Brimacombe CL, Rowe IA, Reynolds GM, Fletcher NF, Stamataki Z, et al. A dual role for hypoxia inducible factor-1alpha in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration. *Journal of hepatology*. 2012;56(4):803-9.
383. Yu Y, Maguire TG, Alwine JC. ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, enhances glucose metabolism to support biosynthesis in human cytomegalovirus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(5):1951-6.
384. Ramiere C, Rodriguez J, Enache LS, Lotteau V, Andre P, Diaz O. Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A. *Journal of virology*. 2014;88(6):3246-54.
385. Wartelle-Bladou C, Le Folgoc G, Bourliere M, Lecomte L. Hepatitis C therapy in non-genotype 1 patients: the near future. *Journal of viral hepatitis*. 2012;19(8):525-36.
386. Kish T, Aziz A, Sorio M. Hepatitis C in a New Era: A Review of Current Therapies. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*. 2017;42(5):316-29.
387. Edlin BR. Access to treatment for hepatitis C virus infection: time to put patients first. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(9):e196-e201.
388. Ceccherini-Silberstein F, Cento V, Di Maio VC, Perno CF, Craxi A. Viral resistance in HCV infection. *Current opinion in virology*. 2018;32:115-27.
389. Machain-Williams C, Talavera-Aguilar L, Cetina-Trejo RC, Carrillo-Navarrete J, Rivero-Cardenas N, Salazar MI, et al. Detection of hepatitis C virus coinfection in patients with dengue diagnosis. *BioMed research international*. 2014;2014:321286.
390. Lohmann V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Medical microbiology and immunology*. 2019;208(1):3-24.
391. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, et al. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: Considerations for scientists and funding agencies. *Virus research*. 2018;248:53-62.
392. Chen HH, Chen CC, Lin YS, Chang PC, Lu ZY, Lin CF, et al. AR-12 suppresses dengue virus replication by down-regulation of PI3K/AKT and GRP78. *Antiviral research*. 2017;142:158-68.
393. Cao L, Chen J, Wang Y, Yang Y, Qing J, Rao Z, et al. Identification of serotonin 2A receptor as a novel HCV entry factor by a chemical biology strategy. *Protein & cell*. 2019;10(3):178-95.
394. Smith JL, Stein DA, Shum D, Fischer MA, Radu C, Bhinder B, et al. Inhibition of dengue virus replication by a class of small-molecule compounds that antagonize dopamine receptor d4 and downstream mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of virology*. 2014;88(10):5533-42.

395. Tonelli M, Novelli F, Tasso B, Vazzana I, Sparatore A, Boido V, et al. Antiviral activity of benzimidazole derivatives. III. Novel anti-CVB-5, anti-RSV and anti-Sb-1 agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2014;22(17):4893-909.
396. Luo Y, Yao JP, Yang L, Feng CL, Tang W, Wang GF, et al. Synthesis and anti-hepatitis B virus activity of a novel class of thiazolylbenzimidazole derivatives. *Archiv der Pharmazie*. 2011;344(2):78-83.
397. Xu YB, Yang L, Wang GF, Tong XK, Wang YJ, Yu Y, et al. Benzimidazole derivative, BM601, a novel inhibitor of hepatitis B virus and HBsAg secretion. *Antiviral research*. 2014;107:6-15.
398. Polaris Observatory HCVC. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The lancet Gastroenterology & hepatology*. 2017;2(3):161-76.
399. Triantos C, Konstantakis C, Tselekouni P, Kalafateli M, Aggeletopoulou I, Manolakopoulos S. Epidemiology of hepatitis C in Greece. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(36):8094-102.
400. Raptopoulou M, Touloumi G, Tzourmakliotis D, Nikolopoulou G, Dimopoulou M, Giannoulis G, et al. Significant epidemiological changes in chronic hepatitis C infection: results of the nationwide HEPNET-GREECE cohort study. *Hippokratia*. 2011;15(1):26-31.
401. Chalatsa I, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D. Release of membrane-associated L-dopa decarboxylase from human cells. *Neurochemical research*. 2011;36(8):1426-34.
402. Poulidakos P, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG. L-DOPA decarboxylase association with membranes in mouse brain. *Neurochemical research*. 2001;26(5):479-85.
403. Glasgow GL, Henley JW, Willoughby EW. L-alpha-methyldopa hydrazine (Carbidopa) combined with L-dopa in the treatment of Parkinson's disease. *Australian and New Zealand journal of medicine*. 1974;4(4):373-8.
404. Das Gupta V, Gupta A. Effect of pyridoxal 5-phosphate on carbidopa and decarboxylation of levodopa. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1980;69(10):1145-8.
405. Wang X, Canary JW. Rapid catalyst-free hydrazone ligation: protein-pyridoxal phosphoramides. *Bioconjugate chemistry*. 2012;23(12):2329-34.
406. Vassiliou AG, Siaterli MZ, Frakolaki E, Gkogkosi P, Paspaltsis I, Sklaviadis T, et al. L-Dopa decarboxylase interaction with the major signaling regulator RhoIota3Kappa in tissues and cells of neural and peripheral origin. *Biochimie*. 2019;160:76-87.
407. Cheng D, Zhang L, Yang G, Zhao L, Peng F, Tian Y, et al. Hepatitis C virus NS5A drives a PTEN-PI3K/Akt feedback loop to support cell survival. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(6):1682-91.

408. Frakolaki E, Kalliampakou KI, Kaimou P, Moraiti M, Kolaitis N, Boleti H, et al. Emerging Role of l-Dopa Decarboxylase in Flaviviridae Virus Infections. *Cells*. 2019;8(8).
409. Qin S, Chock PB. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase membrane recruitment in hydrogen peroxide-induced activation of PI3K and Akt. *Biochemistry*. 2003;42(10):2995-3003.
410. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 8):1439-45.
411. Street A, Macdonald A, McCormick C, Harris M. Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription. *J Virol*. 2005;79(8):5006-16.
412. Liu Y, Liu H, Zou J, Zhang B, Yuan Z. Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Virology*. 2014;448:15-25.
413. Lee CJ, Liao CL, Lin YL. Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *Journal of virology*. 2005;79(13):8388-99.
414. Vassiliou AG, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D. Detection, purification and identification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human placenta. *Neurochemical research*. 2009;34(6):1089-100.
415. Yuan YU. Role of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Linchuang Gandanbing Zazhi*. 2014;30(9):954-7.