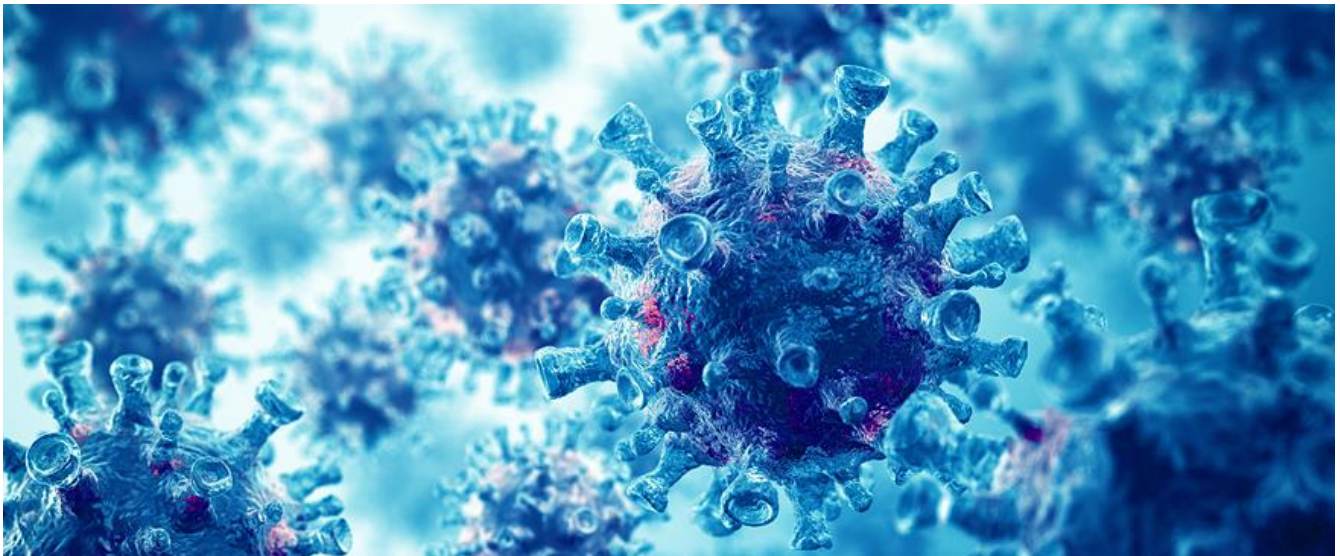




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ LSD-1 ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ”



ΠΕΤΡΟΥΛΙΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## “ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ LSD-1 ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ”

ΠΕΤΡΟΥΛΙΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

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

**ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:** Γεωργοπούλου Ουρανία, Διευθύντρια Ερευνών Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Γεωργοπούλου Ουρανία, Διευθύντρια Ερευνών Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
- Στραβοπόδης Ι. Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

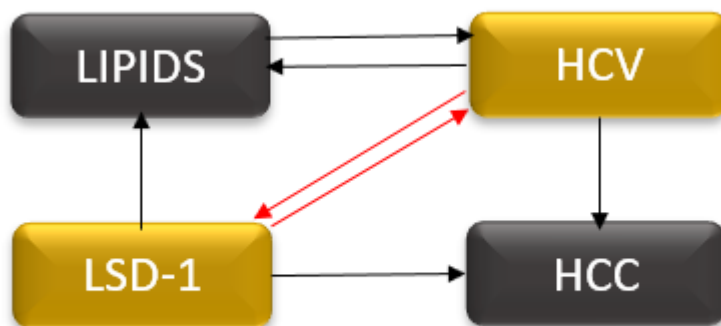
## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι επιγενετικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί εξασφαλίζουν κληρονομήσιμες μεταβολές κυτταρικών καταστάσεων χωρίς να επηρεάζουν τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς ο επιγενετικός έλεγχος της μεταγραφής αποτελεί τη βάση για τη φαινοτυπική και λειτουργική ποικιλομορφία διαφορετικών κυτταρικών τύπων που φέρουν όμοια ή σχεδόν πανομοιότυπα γονιδιώματα. Οι επιγενετικοί ρυθμιστές επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και τη δραστικότητα των γονιδιακών υποκινητών με τη δημιουργία σταθερών αλλά αναστρέψιμων τροποποιήσεων σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με DNA ή στο ίδιο το DNA. Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον μας εστιάζεται στον επιγενετικό παράγοντα LSD-1. Πρόκειται για ένα ένζυμο που βρίσκεται στον κυτταρικό πυρήνα και ανήκει στην οικογένεια των ειδικών για λυσίνη απομεθυλασών ιστονών. Η πρωτεΐνη LSD-1 ειδικά απομεθυλιώνει μόνο- ή διμεθυλιωμένη λυσίνη 4 (H3K4) και λυσίνη 9 (H3K9) στο μόριο της ιστόνης 3 μέσω μιας οξειδοαναγωγικής διαδικασίας. Πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα έδειξαν ότι, η LSD-1 απαιτείται για τη φυσιολογική διαφοροποίηση, την κυτταρική συντήρηση και την ομοιόσταση του κυτταρικού μεταβολισμού. Ωστόσο, υπερέκφραση της πρωτεΐνης LSD-1 παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου και πιστεύεται ότι συμβάλλει στη δημιουργία όγκων.

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι μια ετερογενής ομάδα όγκου που ποικίλει σε παράγοντες κινδύνου πρόκλησής του και σε γεγονότα γενετικής και επιγενετικής αλλοίωσης με βάση όσα προαναφέρθηκαν. Πολλοί παράγοντες όπως οι ιοί, οι χημικές ουσίες και οι εκ γενετής καθώς και οι μεταβολικές ασθένειες, είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ειδικότερα, το ΗΚΚ συνδέεται στενά με τον ιό της ηπατίτιδας C. Ηπατική βλάβη που προκαλείται από ιικούς παράγοντες επηρεάζει πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως κυτταρική σηματοδότηση, απόπτωση και επιδιόρθωση του DNA. Η HCV-επαγόμενη ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος θεωρείται μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που εξελίσσεται σε διάστημα 20-40 ετών και περιλαμβάνει: εγκαθίδρυση χρόνιας HCV μόλυνσης, χρόνια ηπατική φλεγμονή, προοδευτική ηπατική ίνωση, εμφάνιση νεοπλασματικών κλώνων που συνοδεύονται από μη αναστρέψιμες σωματικές γενετικές/επιγενετικές αλλοιώσεις. Είναι καλά πιστοποιημένο ότι ο ιός HCV χρησιμοποιεί τους μεταβολικούς μηχανισμούς των λιπιδίων του ξενιστή για να προωθήσει την αναπαραγωγή του και να εξασφαλίσει τη συναρμολόγηση των ικών λιποσωματιδίων του. Οι ικές δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στη σύνθεση λιπιδίων και παρεμβάλλονται στην έκκριση πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών. Αυτές οι ικές HCV πρωτεΐνες αναστέλλουν

επίσης την οξειδωση λιπαρών οξέων και ενισχύουν την απελευθέρωση λιπαρών οξέων από τα λιποκύτταρα και τελικά οδηγούν σε ηπατική στεάτωση.

Μέχρι στιγμής, δημιουργούνται συσχετίσεις μεταξύ των LSD-1 και HKK, HKK και ιού HCV. Στην παρούσα μελέτη κάτω από το πρίσμα του λιπιδικού μεταβολισμού, επιδιώξαμε να διερευνήσουμε πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του επιγενετικού παράγοντα LSD-1 και του ιού HCV σε καρκινικές ηπατικές κυτταρικές σειρές. Αναλυτικότερα, ερευνήσαμε πώς ο ιός HCV επηρεάζει την έκφραση της LSD-1 όταν μολύνει τα ηπατικά κύτταρα και επίσης πώς η υπερέκφραση της LSD-1, επηρεάζει την ανάπτυξη του HCV. Με βάση τα αποτελέσματά μας έχουμε καταλήξει στο συμπέρασμα ότι ο HCV υπό συνθήκες ενδογενούς έκφρασης της LSD-1 επάγει την αύξηση των επιπέδων της LSD-1 με σκοπό την προώθηση της λιπογένεσης μέσω της αυξορρύθμισης της έκφρασης γονιδίων, όπως της FAS. Η LSD-1 μπορεί να προκαλέσει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με τη λιπογένεση, ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες SREBPs. Πραγματοποιώντας ηλεκτροδιάτρηση με δύο τύπους ρεπλικονίων - JCR2A (πλήρους μήκους HCV γονιδίωμα) και PFKWT (πρωτεΐνες NS3-NS5B) - διεκρινίσαμε ποιος τύπος ιικής πρωτεΐνης είναι πιθανώς



Εικόνα 1: Πιθανές συσχετίσεις μεταξύ LSD-1, HCV, HKK και Λιπιδικού Μεταβολισμού.

υπεύθυνος για αυτό το αποτέλεσμα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη Core εμπλέκεται σε αυξημένα επίπεδα λιπογένεσης και τα δεδομένα μας δείχνουν ότι: α) υπό την παρουσία της πρωτεΐνης Core τα ποσοστά της αντιγραφής HCV είναι υψηλότερα και β) ένας πιθανός τρόπος μέσω του οποίου επιτυγχάνει η πρωτεΐνη Core να αυξήσει τη σύνθεση των λιπιδίων είναι μέσω της επαγωγής της έκφρασης της LSD-1.

Επίσης, διερευνήσαμε τον τρόπο με τον οποίο δύο διαφορετικοί τύποι ιικών πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες NS5A και Core, επηρεάζουν την έκφραση της LSD-1 και τα δεδομένα μας δείχνουν ότι έχουν

αντίστροφη συσχέτιση με την LSD-1. Η πρωτεΐνη NS5A μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της LSD-1 ενώ η πρωτεΐνη Core τα αυξάνει. Η NS5A εμπλέκεται στη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, οπότε πιθανώς ο ιός HCV κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου του κύκλου του δεν απαιτεί πρόσληψη λιπιδίων, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Core που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του ιϊκού καψιδίου όπου απαιτούνται λιπίδια.

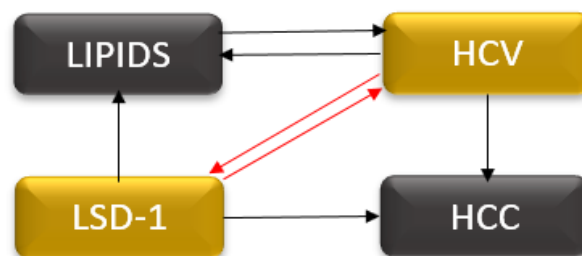
Επίσης, σύμφωνα με τους *Abdulla et al.*, 2014, η υπερέκφραση της LSD-1 δημιουργεί ένα κυρίαρχο αρνητικό αποτέλεσμα όπου μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων εντός των ηπατοκυττάρων και επιβεβαιώσαμε αυτά τα δεδομένα, προχωρώντας σε χρώση *Oil Red O* και *Bodipy* σε κύτταρα κλώνου που υπερεκφράζει την LSD-1, καθώς και σε κύτταρα μάρτυρα. Διαπιστώσαμε σημαντική μείωση στον αριθμό και το μέγεθος των λιπιδικών σταγονιδίων μέσα στα ηπατικά κύτταρα. Όταν πραγματοποιήσαμε ηλεκτροδιάτρηση σε αυτόν τον κλώνο με τον ιό JCR2A παρατηρήσαμε σχεδόν μηδενικά επίπεδα αντιγραφής του HCV σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, πράγμα που υποδηλώνει ότι ο ιός προσπαθεί αλλά δεν είναι σε θέση να ξεπεράσει το αποτέλεσμα που δημιουργεί η υπερέκφραση της LSD-1, ακόμη και παρουσία της πρωτεΐνης NS5A.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συνεισφέρουν στην καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ιού και του κύτταρου ξενιστή. Θα ήταν επομένως ενδιαφέρον να διερευνηθεί η επίδραση των αναστολέων της LSD-1 σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό του ιού τόσο σε επίπεδο ιικού φορτίου όσο και σε επίπεδο ανοσοαπόκρισης του ξενιστή, έτσι ώστε να γίνει ένα πολύτιμο εργαλείο στο μέλλον για τη βελτίωση και την αποτελεσματικότερη αντιϊκή θεραπεία της ηπατίτιδας C και του ΗΚΚ.

## SUMMARY

Epigenetic regulatory mechanisms ensure the heritable alterations of cellular states without affecting the nucleotide sequence of the DNA. In multicellular organisms epigenetic control of transcription, forms the basis for the phenotypic and functional diversity of various cell types that carry identical or nearly identical genomes. Epigenetic regulators affect chromatin structure and promoter activity by depositing stable, but reversible, marks on DNA or DNA-associated proteins. In this current study our interest is directed towards the epigenetic factor called LSD-1. It's an enzyme located in the cellular nucleus, that belongs to the family of Lysine-specific Histone Demethylases. LSD-1 specifically demethylates mono- or dimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4) and H3 lysine 9 (H3K9) through a redox process. Recently evidences showed that LSD-1 is required for normal differentiation, cell maintenance and homeostasis of metabolism. However, LSD-1 is overexpressed in several types of cancer and thought to be tumor promoting.

Hepatocellular carcinoma is a heterogeneous group of a tumor that vary in risk factors and genetic and epigenetic alteration events as shown above. Multiple factors including viruses, chemicals, and inborn and acquired metabolic diseases are responsible for its development. More specifically, HCC is closely associated with hepatitis C virus. Liver injury caused by viral factors affects many cellular processes such as cell signaling, apoptosis, and DNA repair. HCV-induced HCC development is a multi-step process that may progress over 20-40 years and involves: establishment of chronic HCV infection, chronic hepatic inflammation, progressive liver fibrosis, initiation of neoplastic clones accompanied by irreversible somatic genetic/epigenetic alterations. It is well certified that HCV virus hijacks host lipid metabolic mechanisms to promote its replication and to ensure the assembly of its viral lipoparticles. Viral structural and nonstructural proteins interfere in lipid synthesis and very-low-density lipoprotein secretion. These HCV



Picture 1: Possible Correlations among LSD-1, HCV, HCC and Lipid Metabolism.

related proteins also inhibit fatty acid oxidation and enhance fatty acid release from adipocytes, and this finally results in hepatic steatosis.

So far, correlations are established between LSD-1 and HCC, HCC and HCV virus. In this study under the prism of lipid metabolism, we sought to explore possible interactions between epigenetic factor LSD-1 and HCV virus in cancerous hepatic cell lines. Therefore, we investigated how HCV virus affects LSD-1 expression when it infects hepatic cells, and also how LSD-1 overexpression, in this case, affects HCV's establishment. Based on our results we have concluded that HCV under conditions of endogenous LSD-1 expression, showcases the ability to increase the levels of LSD-1 in order to promote lipogenesis through the upregulation of the expression of genes like FAS. LSD-1 can induce such lipogenic genes by activating SREBP transcription factors. By proceeding to electroporation with two types of replicons - JCR2A (Full Length HCV Genome) and PFKWT (NS3-NS5B Proteins) - we specified which type of viral protein is possibly responsible for this effect. Many studies have shown that Core protein is involved in the increased rates of lipogenesis and our data show that: a) under the presence of Core protein the rates of HCV replication are higher and b) a possible way through which it succeeds in this role is by increasing the expression of LSD-1.

Also, we investigated how two different types of viral proteins, NS5A and Core, affect LSD-1 expression and our results show that they have a reverse correlation to LSD-1. NS5A reduces the levels of LSD-1 expression while Core increases them. NS5A is involved in the assembly of the viral particles, so possibly HCV virus during this stage of its cycle doesn't require the uptake of lipids, in contrast with Core that is responsible for formation of the viral capsid where lipids are needed.

At last, according to Abdulla *et. al.*, 2014, LSD-1 overexpression creates a dominant negative effect where it significantly decreases triglyceride levels and we confirmed this data by performing Oil red O and Bodipy staining to a clone that overexpresses LSD-1 and also to control cells. We have seen significant decrease in the number and the size of the lipid droplets inside the hepatic cells. When we performed electroporation to this clone with JCR2A genome, we observed almost zero levels of HCV replication comparing to the control cells, which implies that the virus tries but is unable to overcome the effect that the overexpression of LSD-1 creates, even in the presence of Core protein.

Our study has opened new pathways that can lead to a better understanding of the interaction of the virus with the host cell. It would therefore be, of interest to question the effect of LSD-1 inhibitors with respect to viral proliferation at both viral load and host immune response levels, so as to become a valuable tool in future for a better antiviral therapy for the treatment of hepatitis C and HCC.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», στο εργαστήριο της Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την καθοδήγηση της Δρ. Γεωργοπούλου Ουρανίας.

Καθότι η μέχρι τώρα ακαδημαϊκή μου πορεία έχει ακολουθήσει έναν ανορθόδοξο δρόμο, και επειδή για να φτάσω εδώ που βρίσκομαι σήμερα, καθένας από τους ανθρώπους που έχω συναντήσει έχει προσθέσει το δικό του λιθαράκι, οφείλω να πάω χρονικά λίγο πίσω και να ευχαριστήσω από καρδιάς την τετραμελή επιτροπή του μεταπτυχιακού (Δρ. Παπασιδέρη, Δρ. Γαϊτανάκη, Δρ. Στραβοπόδη και Δρ. Λυμπέρη), που τον Οκτώβριο του 2016, μου έδωσαν μια δεύτερη ευκαιρία και με αποδέχτηκαν να φοιτήσω σε αυτό μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα μου Δρ. Ουρανία Γεωργοπούλου γιατί με αποδέχτηκε χωρίς αμφιβολίες ή δισταγμούς, και με εμπιστεύτηκε με αυτήν την ευγένεια και ζεστασιά που τη διακρίνει και η οποία είναι αδύνατον να περάσει απαρατήρητη. Ήταν πάντοτε εκεί και στα εύκολα και στα δύσκολα. Όλη μου την εργαστηριακή κατάρτιση την οφείλω σε εκείνη, και στους υπόλοιπους ανθρώπους που στελεχώνουν το εργαστήριο. Σε καμία περίπτωση δεν μπορώ να μην αναφέρω τη συμβολή της στο να κάνω πραγματικότητα ένα όνειρο ζωής πολλών ετών. *Η συμβολή της έχει υπάρξει καθοριστική και δε θα την ξεχάσω ποτέ.*

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω με πολλή αγάπη την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, για την κατανόηση και την υπομονή που έχει επιδείξει αυτά τα δυο χρόνια εκπόνησης της διπλωματικής μου. Αν και η έλλειψη χρόνου δε μου επέτρεπαν να τη συναντώ συχνότερα, ωστόσο, κάθε φορά, οι συζητήσεις μας ήταν ουσιαστικές και μου αφιέρωνε περισσότερο χρόνο από όσο θα μπορούσε, προκειμένου να με καθοδηγήσει και με συμβουλέψει σωστά, πάντοτε με ηρεμία και καλή διάθεση.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Γεωργοπούλου και τη Δρ. Φωκά για την από κοινού απόφασή τους να μου εμπιστευτούν την περάτωση ενός τόσο ενδιαφέροντος και πολύπλοκου προτζεκτ, που μου προσέφερε τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ σε πληθώρα εργαστηριακών μοριακών μεθόδων και σταδιακά να αποκτήσω κριτική σκέψη και προσεκτική διαχείριση επιστημονικών ερωτημάτων. Η Δρ. Φωκά είναι επίσης ένας από τους ανθρώπους που με βοήθησαν να κάνω το επόμενο βήμα και να προχωρήσω τις σπουδές μου σε διδακτορικό επίπεδο και δε θα το ξεχάσω ποτέ.



Σε καμία περίπτωση δεν μπορώ να ξεχάσω και τους υπόλοιπους ανθρώπους που εργάζονται στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, ο καθένας με το δικό του τρόπο με άλλαξαν ως άνθρωπο. Καταρχάς, τη *Δρ. Ειρήνη Καραμιχάλη* για την αγάπη της και το ενδιαφέρον που καθημερινά έδειχνε και το υπέροχο χιούμορ με το οποίο αντιμετώπιζε όποιο πρόβλημα προέκυπτε, ώστε ποτέ να μην πέφτει το ηθικό μου. Είναι ένας πολύ αξιόλογος άνθρωπος και της εύχομαι σύντομα να αποκτήσει τον τίτλο της Ερευνήτριας γιατί τον αξίζει πραγματικά. Αναμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στο *Δρ. Αλέξη Δημητριάδη* ο οποίος με εμπιστεύτηκε να πραγματοποιήσω πειράματα δικού του ερευνητικού προγράμματος. Είναι άψογος συνεργάτης και άνθρωπος με φοβερό χιούμορ και αστάλινη ψυχραιμία. Δε θα ξεχάσω το *Δρ. Θάνο Κακκανά* για τις απίστευτες συζητήσεις επί παντός θέματος τις οποίες είχαμε σε καθημερινό επίπεδο, γεμάτος χιούμορ και καλή διάθεση, με απύθμενες γνώσεις, και πάντοτε πρόθυμος να συμβουλέψει και να βοηθήσει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά τα οποία εργάζονται στο εργαστήριο ως προπτυχιακοί φοιτητές και υποψήφιοι διδάκτορες. Παρά το φόρτο εργασίας, οι ώρες και οι μέρες περνούσαν ευχάριστα, γεμάτες στιγμές γέλιου και χαράς. Η *Βανέσσα Βαλιάκου* υπήρξε ένας από τους ακρογωνιαίους λίθους της εκπαίδευσής μου, αναμφισβήτητα της οφείλω τα περισσότερα από όσα έμαθα, και τη θεωρώ έναν άνθρωπο που ήρθε πολύ κοντά μου και έχουμε μοιραστεί πολλές στιγμές στο εργαστήριο. Η *Γεωργία Παπαδοπούλου* επίσης με βοήθησε ώστε να κατανοήσω το θέμα το οποίο ανέλαβα και το οποίο είναι συνέχεια της δικής της μεταπτυχιακής διπλωματικής, πάντοτε με ηρεμία μου εξηγούσε οτιδήποτε χρειαζόμουν. Πέρα από την επιστήμη, και οι τρεις μας πιστεύω ότι έχουμε αναπτύξει ένα δεσμό ουσιαστικό μετά από δυο χρόνια συνύπαρξης. Η *Μαρία Λίτσα*, η *Λήδα Κατοπόδη*, η *Έλσα Ιωαννίδου* και ο *Γιώργος Αναστασίου*, προπτυχιακοί φοιτητές, παιδιά με πολλές δυνατότητες, έκαναν κάθε μέρα στο εργαστήριο πιο ενδιαφέρουσα και διασκεδαστική! Τους εύχομαι κάθε επιτυχία και θα μου λείψουν όλοι τους.

Είναι σημαντικό να αναφέρω τη *Δρ. Ουρανία Τσιτσιλώνη*, η οποία πίστεψε σε μένα, γεγονός που με βοήθησε να πιστέψω και γω στις δυνατότητες μου και να στοχεύσω πιο ψηλά. Της οφείλω τεράστια ευγνωμοσύνη και να είναι σίγουρη ότι θα κάνω τα πάντα για τη βγάλω ασπροπρόσωπη στο εξωτερικό, όπως χαρακτηριστικά μου είπε.

Τέλος, θέλω να εκφράσω την αγάπη μου για την οικογένειά μου, στη *μητέρα μου Όλγα* και στο *Στέλιο*, που είναι μονίμως στο πλευρό μου πάρα τις άπειρες δυσκολίες που έχουμε περάσει, πάντοτε με εμπυχώνουν και μου δίνουν ώθηση να προχωρήσω, έχουν υπάρξει ο βράχος στη ζωή μου. Στην αδερφή

μου, *Μαίρη* και στο γαμπρό μου *Μάκη*, γιατί πάντα είναι δίπλα μου, ουσιαστικά, καθώς και στα ανίψια μου, *Κωνσταντίνο*, *Ναταλία* και *Όλγα* για την αγάπη που απλόχερα μου προσφέρουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1-32</b>
A.1.1. ΠΕΡΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ.....	1
A.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ.....	2
A.1.2.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA.....	2
A.1.2.2. ΜΗ-ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA.....	3
A.1.2.3. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	3
A.1.2.3.1. ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	5
A.1.3. Η ΑΠΟΜΕΘΥΛΑΣΗ LSD-1 (KDM1A).....	6
A.1.3.1. Η ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1.....	6
A.1.3.2. Η ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1.....	7
A.1.3.3. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1.....	8
A.1.3.3.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ.....	8
A.1.3.3.1.1. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ.....	9
A.1.3.3.1.2. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ.....	9
A.1.4. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	10
A.1.4.1. ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	11
A.1.4.2. ΙΝΩΣΗ, ΚΙΡΡΩΣΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	11
A.1.4.3. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	12
A.1.4.3.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA.....	12
A.1.4.3.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	13
A.1.4.3.3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA.....	13
A.1.4.4. ΗCV ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ.....	14
A.1.5. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	15
A.1.5.1. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	15
A.1.5.1.1. Η ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	15
A.1.5.1.2. ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	16
A.1.5.1.2.1. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	17
A.1.5.1.2.1.1. ΟΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	17
A.1.5.1.2.1.1.1. ΟΙ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΙΝΕΣ E1 ΚΑΙ E2.....	18
A.1.5.1.2.1.1.2. Η ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ CORE.....	19
A.1.5.1.2.1.2. ΤΟ ΚΑΝΑΛΙ ΙΟΝΤΩΝ P7.....	20

A.1.5.1.2.1.3. ΟΙ ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....	21
A.1.5.1.2.1.3.1. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ NS2.....	21
A.1.5.1.2.1.3.2. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ NS3.....	21
A.1.5.1.2.1.3.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ NS4A ΚΑΙ NS4B.....	21
A.1.5.1.2.1.3.4. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ NS5A ΚΑΙ NS5B.....	22
A.1.5.1.2.2. ΟΙ 5' ΚΑΙ 3' ΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ.....	24
A.1.5.1.3. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	25
A.1.5.1.4. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	27
A.1.5.1.5. Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ Η ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	28
A.1.5.1.6. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
A.1.5.1.7. ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΣΤΟ ΛΙΠΙΔΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ.....	31
<b>ΣΤΟΧΟΣ.....</b>	<b>33</b>
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>34-80</b>
B. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	34
B.1. ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑΣ.....	34
B.2. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΚΛΙΒΑΝΟΣ).....	34
B.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	35
B.3.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	35
B.3.2. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	36
B.3.2.1. ΓΕΝΕΤΙΣΙΝΗ.....	36
B.3.2.2. ΥΓΡΟΜΥΚΙΝΗ Β.....	36
B.3.2.3. ΔΟΞΥΚΥΚΛΙΝΗ.....	36
B.3.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	37
B.4. ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	38
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΕΣ.....	39
B.4.1. ΗΗΗ7 ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	39
ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΠΑΣΤΕΡ.....	39
B.4.2. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1.....	39
B.4.3. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ HCV CORE.....	41
B.4.4. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΗ ΔΟΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ HCV NS5A.....	41
B.4.4.1. ΤΕΤ ON ΚΑΙ ΤΕΤ OFF ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	42
B.5. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.....	44

B.5.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ PFKWT.....	44
B.5.2. ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ JCR2A.....	44
B.5.3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ E. coli K12 JM109 ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA.....	45
B.5.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....	47
B.5.4.1. ΜΙΚΡΗΣ ΚΑΙ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....	47
B.5.5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΩ ΠΕΨΗΣ.....	48
B.5.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	50
B.5.7. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	51
B.5.8. RNA IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	52
B.5.9. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ IN VITRO ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	53
B.6. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ.....	53
B.7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗΣ.....	56
B.7.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ FIREFLY.....	56
B.7.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ RENILLA.....	58
B.7.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	59
B.7.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	61
B.8. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ.....	62
B.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	64
B.10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	65
B.11. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ.....	67
B.12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA.....	70
B.13. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	71
B.14. PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	73
B.15. ΧΡΩΣΗ OIL RED O.....	77
B.16. ΧΡΩΣΗ BODIPY.....	79
B.17. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE.....	80
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>82-97</b>
Γ.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1.....	82
Γ.1.1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ RT-QPCR.....	83

Γ.1.1.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	84
Γ.1.2. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΡFKWT ΚΑΙ JCR2A.....	86
Γ.1.3. ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HUΗ7 ΚΑΙ ΣΕ ΚΛΩΝΟ HUΗ1B.....	87
Γ.1.3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΡΕΠΛΙΚΟΝΙΩΝ JCR2A & ΡFKWT.....	87
Γ.1.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ mRNA ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ.....	90
Γ.1.4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ mRNA ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE.....	93
Γ.1.4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE.....	95
Γ.1.5. ΧΡΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ OIL RED O ΣΕ ΡCDNA ΚΑΙ ΚΛΩΝΟ HUΗ1B.....	96
Γ.1.6. ΧΡΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ BODIPY ΣΕ ΡCDNA ΚΑΙ ΚΛΩΝΟ HUΗ1B.....	97
<b>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>98-111</b>
Δ.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	98
Δ.1.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΙΟΥ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ.....	98
Δ.1.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1 ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ.....	101
Δ.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1..	103
Δ.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1 ΣΤΟΝ ΙΟ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C.....	109
Δ.2.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	112
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>114-122</b>

<i>Πίνακας συντμήσεων</i>		
<i>Σύντμηση</i>	<i>Αγγλικός όρος</i>	<i>Ελληνικός όρος</i>
<i>3'UTR</i>	<i>3' Untranslated Region</i>	<i>3' μη μεταφραστική περιοχή</i>
<i>5'UTR</i>	<i>5' Untranslated Region</i>	<i>5' μη μεταφραστική περιοχή</i>
<i>AASLD</i>	<i>American Association for The Study Of Liver Diseases</i>	<i>Αμερικανική ένωση για τη μελέτη των ασθενειών του ήπατος</i>
<i>ADMA</i>	<i>Asymmetric Dimethyl-Arginine</i>	<i>Ασύμμετρη διμεθυλο-αργινίνη</i>
<i>AKT</i>	<i>Protein Kinase B</i>	<i>Πρωτεϊνική Κινάση Β</i>
<i>ALT</i>	<i>Alanine Transaminase</i>	<i>Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης</i>
<i>ANGPTL-3</i>	<i>Angiotensin-Like Protein 3</i>	<i>Ομοιάζουσα στην αγγειοποιητίνη πρωτεΐνη 3</i>
<i>AO</i>	<i>Amino Oxidase</i>	<i>Αμινο-οξειδάση</i>
<i>AP-2</i>	<i>Transcription Factor AP-2 Alpha</i>	<i>Μεταγραφικός παράγοντας AP-2 άλφα</i>
<i>APC</i>	<i>Adenomatous Polyposis Coli Protein</i>	<i>Πρωτεΐνη αδενωματώδους πολυποδίασης κόλου</i>
<i>ApoB</i>	<i>Apolipoprotein B</i>	<i>Απολιποπρωτεΐνη Β</i>
<i>ApoE</i>	<i>Apolipoprotein E</i>	<i>Απολιποπρωτεΐνη Ε</i>
<i>APS</i>	<i>Ammonium Persulfate</i>	<i>Υπερθειικό αμμώνιο</i>
<i>ARFP</i>	<i>Alternative Reading Frame Protein</i>	<i>Πρωτεΐνη εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης</i>
<i>ARID1A/2</i>	<i>AT-Rich Interactive Domain-Containing Protein 1a/2</i>	<i>Πρωτεΐνες 1A/2 με επικράτεια αλληλεπίδρασης πλούσια σε αδενίνη/θυμίνη</i>
<i>AST</i>	<i>Aspartate Transaminase</i>	<i>Αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosine Triphosphate</i>	<i>Τριφωσφορική αδενοσίνη</i>
<i>BMI</i>	<i>Body Mass Index</i>	<i>Δείκτης μάζας σώματος</i>
<i>Bp</i>	<i>Base Pairs</i>	<i>Ζεύγη βάσεων</i>
<i>BRG1</i>	<i>Transcription Activator BRG1</i>	<i>Ενεργοποιητής μεταγραφής BRG1</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine Serum Albumin</i>	<i>Αλβουμίνη ορού βοός</i>

<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης
<b>CD133</b>	<i>Prominin 1/Cluster of Differentiation 133</i>	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 133
<b>CD81</b>	<i>Cluster of Differentiation 81</i>	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης 81
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control And Prevention</i>	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης Ασθενειών
<b>CDH1</b>	<i>Cadherin 1</i>	Καδερίνη 1
<b>CDK4</b>	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενη Κινάση 4
<b>CDK6</b>	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενη Κινάση 6
<b>CDKN2A</b>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2a</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινάσης 2A
<b>CDKN2B</b>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2b</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινάσης 2B
<b>cDNA</b>	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>CHD1L</b>	<i>Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 Like</i>	Ομοιάζουσα στην πρωτεΐνη 1 πρόσδεσης σε χρωμοπεριοχή DNA ελικάσης
<b>CIAP</b>	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>	Αλκαλική φωσφατάση εντέρου βοός
<b>CK2</b>	<i>Casein Kinase 2</i>	Κινάση καζεΐνης-2
<b>MCLDN1</b>	<i>Claudin 1</i>	Κλωδίνη 1
<b>CMV</b>	<i>Cytomegalovirus</i>	Κυτταρομεγαλοϊός
<b>CoREST</b>	<i>Corepressor for element-1-silencing transcription factor</i>	Μεταγραφικός παράγοντας συν-καταστολέας στοιχείου 1 σίγασης
<b>CRE</b>	<i>Cis-Acting Element</i>	Cis-δρων στοιχείο
<b>CSCs</b>	<i>Cancer Stem Cells</i>	Καρκινικά βλαστικά κύτταρα
<b>Cys</b>	<i>Cysteine</i>	Κυστεΐνη
<b>DAAs</b>	<i>Direct-Acting Antivirals</i>	Αντιϊικά άμεσης δράσης
<b>dC</b>	<i>Deoxycytosine</i>	Δεοξυκυτοσίνη



<b>ddNTP</b>	<i>Di-Deoxynucleoside Triphosphate</i>	Τριφωσφορικός διδεοξυριβονουκλεοζίτης
<b>DDR</b>	<i>DNA Damage Response</i>	Απόκριση σε DNA βλάβη
<b>DIM5</b>	<i>H3 Lysine-9 Specific Dim-5</i>	Μεθυλοτρανσφεράση ειδική για το κατάλοιπο λυσίνης 9 της ιστόνης H3
<b>dmC</b>	<i>Deoxy-5-Methylcytosine</i>	Δεοξυμεθυλοκυτοσίνη
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleotide Acid</i>	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>DNMT</b>	<i>DNA (Deoxyribonucleic Acid) Methyltransferases</i>	Μεθυλομεταφοράσες δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>	Τριφωσφορικός δεοξυριβονουκλεοζίτης
<b>DTT</b>	<i>Dithiothreitol</i>	Διθειοθρεϊτόλη
<b>E2F1</b>	<i>E2f Transcription Factor 1</i>	Μεταγραφικός παράγοντας E2F 1
<b>EASL</b>	<i>European Association for The Study Of The Liver</i>	Ευρωπαϊκή ένωση για τη μελέτη του ήπατος
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Επιδερμικός αυξητικός Παράγοντας
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	Ενζυμική ανοσοπροσορητική δοκιμασία
<b>ER</b>	<i>Endoplasmic Reticulum</i>	Ενδοπλασματικό δίκτυο
<b>EZH2</b>	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>	Ειδική για το κατάλοιπο λυσίνης 27 της ιστόνης H3 μεθυλοτρανσφεράση
<b>FAD</b>	<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>	Φλαβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο
<b>FAPP2</b>	<i>Golgi-Associated Four-Phosphate Adaptor Protein 2</i>	Συσχετιζόμενη με το σύστημα Golgi τετραφωσφορική πρωτεΐνη προσαρμογέας 2

<b>FAS</b>	<i>Fatty Acid Synthase</i>	Συνθάση λιπαρού οξέος
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>	Ορός εμβρύου βοός
<b>GBVB</b>	<i>Gb Virus B</i>	Gb ιός B
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
<b>GLUT1</b>	<i>Glucose transporter 1</i>	Μεταφορέας γλυκόζης 1
<b>GTP</b>	<i>Guanosine Triphosphate</i>	Τριφωσφορική γουανοσίνη
<b>HAT</b>	<i>Histone Acetyltransferase</i>	Ακετυλομεταφοράση ιστονών
<b>HBV</b>	<i>Hepatitis B Virus</i>	Ιός της ηπατίτιδας B
<b>HCC</b>	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C Virus</i>	Ιός της ηπατίτιδας C
<b>HCVcc</b>	<i>Hepatitis C Cell Culture System</i>	Σύστημα κυτταροκαλλιέργειας ηπατίτιδας C
<b>HDAC</b>	<i>Histone Deacetylase</i>	Αποακετυλάση ιστονών
<b>HDL-C</b>	<i>High-Density Lipoprotein Cholesterol</i>	Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη χοληστερόλης
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	<i>Hypoxia-inducible factor 1 <math>\alpha</math></i>	Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1 $\alpha$
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>	Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
<b>HKMT</b>	<i>Histone Lysine Methyltransferase</i>	Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης
<b>HMT</b>	<i>Histone Methyltransferase</i>	Μεθυλοτρανσφεράση ιστονών
<b>HOTAIR</b>	<i>HOX Transcript Antisense Intergenic RNA</i>	Αντινοσηματικό διαγονιδιακό RNA μεταγράφου HOX
<b>HRP</b>	<i>Horseradish Peroxidase</i>	Υπεροξειδάση αγριοραπανιού
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>	Αιμοποιητικό βλαστικό κύτταρο
<b>HSV</b>	<i>Herpes Simplex Virus</i>	Ιός του απλού έρπητα
<b>HVR</b>	<i>Hyper-Variable Region</i>	Υπερμεταβλητή περιοχή
<b>IAV</b>	<i>Influenza A Virus</i>	Ιός της γρίπης τύπου A
<b>IFITM</b>	<i>Interferon-Inducible Transmembrane Gene Family</i>	Επαγόμενη από ιντερφερόνη οικογένεια διαμεμβρανικών γονιδίων

<b><i>IgM</i></b>	<i>Immunoglobulin M</i>	<i>Ανοσοσφαιρίνη Μ</i>
<b><i>INF</i></b>	<i>Interferon</i>	<i>Ιντερφερόνη</i>
<b><i>IRES</i></b>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>	<i>Εσωτερική θέση πρόσδεσης ριβοσώματος</i>
<b><i>ISDR</i></b>	<i>Interferon-A Sensitivity- Determining Region</i>	<i>Περιοχή ευαισθησίας σε ιντερφερόνη-Α</i>
<b><i>JAK</i></b>	<i>Janus Kinase</i>	<i>Janus κινάση</i>
<b><i>JCR2A</i></b>	<i>Full-Length HCV Reporter Virus</i>	<i>Πλήρους μήκους ιικό γονιδίωμα HCV</i>
<b><i>JFH1</i></b>	<i>Japanese Fulminant Hepatitis 1</i>	<i>Ιαπωνική οξεία ηπατίτιδα 1</i>
<b><i>Kb</i></b>	<i>Kilobase</i>	<i>Κιλοβάση</i>
<b><i>KDa</i></b>	<i>Kilodalton</i>	<i>Κιλοντάλτον, μονάδα μέτρησης μοριακού βάρους</i>
<b><i>KDM1A</i></b>	<i>Lysine-Specific Histone Demethylase 1</i>	<i>Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση ιστόνης 1</i>
<b><i>KDM1B</i></b>	<i>Lysine-Specific Histone Demethylase 2</i>	<i>Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση ιστόνης 2</i>
<b><i>LB</i></b>	<i>Luria-Bertani Broth</i>	<i>Θρεπτικό υλικό Luria-Bertani</i>
<b><i>LCS</i></b>	<i>Low Complexity Sequences</i>	<i>Χαμηλής πολυπλοκότητας αλληλουχίες</i>
<b><i>LD</i></b>	<i>Lipid Droplets</i>	<i>Λιποσταγονίδια</i>
<b><i>LDL</i></b>	<i>Low Density Lipoprotein</i>	<i>Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη</i>
<b><i>LDLR</i></b>	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>	<i>Υποδοχέας χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης</i>
<b><i>LIPG</i></b>	<i>Endothelial Lipase</i>	<i>Ενδοθηλιακή λιπάση</i>
<b><i>LncRNA</i></b>	<i>Long Non-Coding RNA</i>	<i>Μακράς αλυσίδας μη-κωδικά RNA</i>
<b><i>LncRNA-HEIH</i></b>	<i>Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Ezh2-Associated Long Non-Coding RNA</i>	<i>Αυξορρυθμιζόμενο σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, συσχετιζόμενο με το ένζυμο EZH2 μακράς αλυσίδας μη-κωδικό RNA (βλέπε EZH2)</i>

<b>Lnc-RNA-HR1</b>	<i>Long non-coding RNA HCV regulated 1</i>	HCV-ρυθμιζόμενο μακράς αλυσίδας μη-κωδικό RNA
<b>LP</b>	<i>Lipoprotein</i>	Λιποπρωτεΐνη
<b>LPL</b>	<i>Lipoprotein Lipase</i>	Λιποπρωτεϊνική λιπάση
<b>LSD-1</b>	<i>Lysine-Specific Demethylase 1</i>	Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση 1
<b>LSD-2</b>	<i>Lysine-Specific Demethylase 2</i>	Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση 2
<b>LXR</b>	<i>Liver X Receptor</i>	Υποδοχέας X ήπατος
<b>LXRE</b>	<i>Liver X Receptor Responsive Element</i>	Στοιχείο απόκρισης σε υποδοχέα X ήπατος
<b>MALAT-1</b>	<i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i>	Μετάγραφο 1 συσχετιζόμενου με μετάσταση αδενοκαρκινώματος πνεύμονα
<b>MAO</b>	<i>Monoamine Oxidase</i>	Μονοαμινική οξειδάση
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Μιτογόνο-επαγόμενη πρωτεϊνική κινάση
<b>MBD2</b>	<i>Methyl-CpG Binding Domain Protein 2</i>	Πρωτεΐνη 2 με επικράτεια δέσμησης σε μεθυλιωμένα CpG νουκλεοτίδια
<b>MEK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>	Μιτογόνο-επαγόμενη πρωτεϊνική κινάση κινάση
<b>MeCP2</b>	<i>Methyl CpG Binding Protein 2</i>	Πρωτεΐνη 2 δέσμησης σε μεθυλιωμένα CpG δινουκλεοτίδια
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>	Μείζον συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας
<b>miRNA</b>	<i>Micro-Ribonucleic Acid</i>	Μίκρο-ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>M-MLV</b>	<i>Moloney-Murine Leukemia Virus</i>	Ιός λευχαιμίας ποντικού
<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>	Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

<b>NAFLD</b>	<i>Nonalcoholic Fatty Liver</i>	Μη-αλκοολική λιπώδης ηπατική νόσος
<b>NANBH</b>	<i>Non-A, Non-B Hepatitis</i>	Μη-Α, μη-Β ηπατίτιδα
<b>NEAA</b>	<i>Non-Essential Amino Acids</i>	Μη απαραίτητα αμινοξέα
<b>NES</b>	<i>Nestin</i>	Νεστίνη
<b>NS2</b>	<i>Non-Structural Protein 2</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 2
<b>NS3</b>	<i>Non-Structural Protein 3</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 3
<b>NS4A</b>	<i>Non-Structural Protein 4A</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 4A
<b>NS4B</b>	<i>Non-Structural Protein 4B</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 4B
<b>NS5A</b>	<i>Non-Structural Protein 5A</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 5A
<b>NS5B</b>	<i>Non-Structural Protein 5B</i>	Μη-δομική πρωτεΐνη 5B
<b>NuRD</b>	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</i>	Αποακετυλάση αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
<b>OSBP</b>	<i>Oxysterol-Binding Protein 1</i>	Πρωτεΐνη 1 πρόσδεσης οξυστερόλης
<b>p14arf</b>	<i>ARF Tumor Suppressor, ARF, P14arf</i>	Καταστολέας όγκου ARF
<b>p16ink4α</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, Multiple Tumor Suppressor 1</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινάσης 2A, πολλαπλός ογκοκαταστολέας 1
<b>P21</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1</i>	Κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινάσης 1
<b>P75</b>	<i>Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor</i>	Χαμηλής συνάφειας υποδοχέας νευρικού αυξητικού παράγοντα
<b>PADI4</b>	<i>Peptidyl Arginine Deiminase, Type IV</i>	Πεπτιδυλ-αργινίνης αποϊμινάση, τύπου 4
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffer Saline</i>	Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
<b>PCAF</b>	<i>P300/CBP-Associated Factor</i>	Ειδική για κατάλοιπα λυσίνης ακετυλοτρανσφεράση 2B

<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>PD-1</b>	<i>Programmed Cell Death-1</i>	Προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου πρωτεΐνη 1
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
<b>PEG</b>	<i>Polyethylene Glycol</i>	Πολυαιθυλαινογλυκόλη
<b>PEG-IFN</b>	<i>Pegylated Interferon</i>	Πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη
<b>PELP1</b>	<i>Proline-, Glutamic Acid-Iand Leucine-Rich Protein 1</i>	Πλούσια σε προλίνη, γλουταμικό οξύ και λευκίνη πρωτεΐνη 1
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>	Κινάση της 3-φωσφατιδιλοϊνοσιτόλης
<b>PI4KIIIa</b>	<i>Phosphatidylinositol 4-Kinase Alpha</i>	Κινάση άλφα της 4-φωσφατιδυλινοσιτόλης
<b>piRNAs</b>	<i>Piwi Interacting RNAs</i>	Αλληλοεπιδρώντα με πρωτεΐνες Piwi μόρια RNA
<b>Piwi proteins</b>	<i>P-Element Induced Wimpy Proteins</i>	Επαγόμενες από P- γενετικό στοιχείο πρωτεΐνες Wimpy
<b>PKR</b>	<i>Protein Kinase R</i>	Πρωτεϊνική κινάση R
<b>PMSF</b>	<i>Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride</i>	Φθοριούχο φαινυλομεθανοσουλφονύλιο
<b>PRK2</b>	<i>Serine/Threonine-Protein Kinase 2</i>	Πρωτεϊνική κινάση 2 σερίνης/θρεονίνης
<b>PRMT</b>	<i>Protein Arginine Methyltransferase</i>	Ειδική για κατάλοιπα αργινίνης Μεθυλοτρανσφεράση
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase</i>	Τριφωσφορική 3-φωσφατάση της 3,4,5 φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης και φωσφατάση διπλής ειδικεύσης
<b>PTGS</b>	<i>Post Translational Gene Silencing</i>	Μετα-μεταφραστική σίγαση γονιδίου

<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>RB1</b>	<i>Retinoblastoma Protein 1</i>	Πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος 1
<b>RdRp</b>	<i>RNA-Dependent RNA Polymerase</i>	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
<b>Real-time PCR</b>	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene 1</i>	Επαγόμενο από ρετινοϊκό οξύ Γονίδιο 1
<b>RISC</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>	RNA επαγόμενο σύμπλοκο αποσιώπησης
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>RNAi</b>	<i>RNA Interference</i>	RNA παρεμβολή
<b>RNAsin</b>	<i>RNase Inhibitor</i>	Αναστολέας RNAsών
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Ενεργές ρίζες οξυγόνου
<b>rRNA</b>	<i>Ribosome Ribonucleic Acid</i>	Ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>RT</b>	<i>Reverse Transcription</i>	Αντίστροφη μεταγραφή
<b>RTK</b>	<i>Receptor Tyrosine Kinases</i>	Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης
<b>Rtl1</b>	<i>Retrotransposon Like Gene 1</i>	Ομοιάζον με ρετροτρανσποζόνιο γονίδιο 1
<b>RUVBL2</b>	<i>Ruvb Like AAA ATPase 2</i>	ΑΤΡαση 2
<b>SAM</b>	<i>S-Adenosyl Methionine</i>	S αδενουσυλμεθειονίνη
<b>SANT2</b>	<i>Swi3, Ada2, N-Cor, And TFIIIB – 2 (Protein Domain)</i>	Επικράτειες πρωτεΐνης
<b>SCARB1</b>	<i>Scavenger Receptor Class B Member 1</i>	Υποδοχέας εκκαθαριστής τάξης B μέλος 1
<b>SDMA</b>	<i>Symmetric Dimethylarginine</i>	Συμμετρική διμεθυλο αργινίνη
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
<b>SET</b>	<i>Su (Var), E(Z), And Trithorax</i>	Καταλυτική επικράτεια SET
<b>SET7/9</b>	<i>SET Domain-Containing Protein 7/9</i>	Πρωτεΐνη 7/9 με επικράτεια SET

<b>SFPR1</b>	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 1</i>	Εκκρινόμενη συσχετιζόμενη με την <i>frizzled</i> πρωτεΐνη 1
<b>siRNA</b>	<i>Small Interfering RNA</i>	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA
<b>SIRT1</b>	<i>NAD-Dependent Deacetylase Sirtuin-1</i>	NAD-εξαρτώμενη αποακετυλάση σιρτουΐνη 1
<b>SL1/2/3</b>	<i>Stem-Loop Domain</i>	Επικράτεια στελέχους-βρόχου
<b>SMARCA4</b>	<i>SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily A, Member 4</i>	Ακτινο-εξαρτώμενος ρυθμιστής χρωματίνης, υποοικογένειας A, μέλος 4, SWI/SNF συσχετιζόμενος και συνδεδεμένος με τη μήτρα-
<b>SNAG</b>	<i>Snail/Gfi1 Domain of Transcription Factors</i>	Επικράτεια <i>Snail/Gfi1</i> μεταγραφικών παραγόντων
<b>SOCS-1</b>	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>	Καταστολέας 1 σηματοδότησης κυτταροκίνης
<b>Sp1</b>	<i>Specificity protein 1</i>	Πρωτεΐνη εξειδίκευσης 1
<b>SREBP</b>	<i>Sterol Regulatory Element- Binding Protein</i>	Πρωτεΐνη πρόσδεσης ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3 protein</i>	Πρωτεΐνη 3 επαγωγέας σηματος και ενεργοποιητής μεταγραφής
<b>SVR</b>	<i>Sustained Virological Response</i>	Παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση
<b>SUV39H1</b>	<i>Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1 (Histone-lysine N-methyltransferase)</i>	Καταστολέας της ποικιλίας 3-9 ομόλογου 1
<b>SWI/SNF</b>	<i>SWItch/Sucrose Non-Fermentable (Chromatin remodeling SWI/SNF complex)</i>	Σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF
<b>TBE</b>	<i>Tris, boric acid and EDTA</i>	Ρυθμιστικό διάλυμα με <i>Tris</i> , βορικό οξύ και EDTA
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>	Ρυθμιστικό διάλυμα <i>Tris</i>
<b>TBST</b>	<i>TBS with Tween20</i>	Ρυθμιστικό διάλυμα <i>Tris</i> με προσθήκη <i>Tween20</i>



<b>TE buffer</b>	<i>Tris-EDTA buffer</i>	Ρυθμιστικό διάλυμα με <i>Tris</i> και <i>EDTA</i>
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethyl ethylenediamine</i>	<i>N, N, N, N</i> -τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη
<b>TET OFF system</b>	<i>Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation (in Absence of Tetracycline)</i>	Τετρακυκλινο-ελεγχόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση (απουσία τετρακυκλίνης)
<b>TET ON system</b>	<i>Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation (requires Tetracycline)</i>	Τετρακυκλινο-ελεγχόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση (παρουσία τετρακυκλίνης)
<b>TGF-B</b>	<i>Transforming growth factor - B</i>	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού <i>B</i>
<b>Tm</b>	<i>Melting temperature</i>	Θερμοκρασία τήξης
<b>TNF</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	Παράγοντας νέκρωσης όγκου
<b>TP53BP1</b>	<i>Tumor Suppressor p53-Binding Protein 1</i>	Πρωτεΐνη 1 πρόσδεσης στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο <i>p53</i>
<b>UV</b>	<i>Ultra-violet</i>	Υπεριώδης ακτινοβολία
<b>VLDL</b>	<i>Very low-density Lipoprotein</i>	Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
<b>WFI</b>	<i>Water for injection</i>	Νερό κατάλληλο για ένεση

<b>Πίνακας διαλυμάτων</b>	
<b>Διάλυμα</b>	<b>Σύσταση</b>
<b>LB Luria-Bertani Broth ή Miller Broth</b>	10 g βακτο-τρυπτόνη, 5 g εκχύλισμα ζύμης, 5 g χλωριούχο νάτριο. pH:7.0 ± 0.2
<b>M-MLV 5X reaction buffer</b>	250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT
<b>Ponceau S</b>	0.2% (κ.ό.) Ponceau S - 3% (κ.ό.) τριχλωροξικό οξύ
<b>Sample buffer 2x</b>	4% (κ.ό.) SDS – 0.2% (κ.ό.) κυανούν της βρωμοφαινόλης – (10% (κ.ό.) Tris- HCl 1M pH=8 – 20% (κ.ό.) γλυκερόλη
<b>SDS 10%</b>	10 g SDS – dH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο 100 mL
<b>TBS 10x</b>	60.6 g Tris base – 87.6 g NaCl σε 1000 mL dH <sub>2</sub> O pH 7.6
<b>TBST 1x</b>	50 mL TBS 10x – dH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο 500 mL - 0.05% ή 0.1% Tween-20
<b>TEMED</b>	N,N,N,N-τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη
<b>Tris 1.0 M pH=6.8</b>	90.83g βάση Trizma σε dH <sub>2</sub> O – ρύθμιση pH με πυκνό HCl – dH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο 500 mL
<b>Tris 1.5 M pH=8.8</b>	90.83g βάση Trizma σε dH <sub>2</sub> O – ρύθμιση pH με NaOH – dH <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο 500 mL
<b>Ακρυλαμίδιο 29:1</b>	29% (κ.ό.) ακρυλαμίδη – 1% (κ.ό.) base ακρυλαμίδη σε dH <sub>2</sub> O
<b>Βρωμιούχο αιθίδιο, 10 mg/mL</b>	0.025 g βρωμιούχο αιθίδιο-d H <sub>2</sub> O μέχρι τελικό όγκο 25 mL
<b>Διάλυμα Solution I (P1)</b>	50 μM γλυκόζη – 25 μM Tris pH=8 – 50 μM EDTA pH=8
<b>Διάλυμα Solution II (P2)</b>	4 mM NaOH – 1 mM θειικό δωδεκυλικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS 1%)
<b>Διάλυμα Solution III (P3)</b>	60% (κ.ό.) οξικό κάλιο 5 M – 11.5% (κ.ό.) οξικό οξύ
<b>Διάλυμα έκπλυσης (TBST)</b>	TBST 1x ή 1% (κ.ό.) χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε TBST 1x ή 0.3% BSA σε TBST 1x
<b>Διάλυμα εμφάνισης φιλμ Development</b>	Kodak (50 mL υγρού εμφάνισης αραιώνονται με νερό σε συνολικό όγκο 200 mL) Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο φιαλίδιο
<b>Διάλυμα κορεσμού, blocking solution</b>	5% (κ.ό.) χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε TBST 1x ή 3% ή 5% BSA σε TBST 1x

<b>Διάλυμα TE</b>	10 $\mu$ M Tris pH=8 – 1 $\mu$ M EDTA pH=8
<b>Διάλυμα χρωστικής Dye 2x για πρωτεΐνες</b>	Sample buffer – 5% (κ.ό.) $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλη (βλέπε Sample buffer 2x)
<b>Διάλυμα χρωστικής Dye 6x για DNA</b>	0.25% (κ.ό.) κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.25% (κ.ό.) κυανούν του ξυλενίου-30% (κ.ό.) γλυκερόλης
<b>Ειδικό διάλυμα SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate</b>	Ειδικό διάλυμα δυο συστατικών υποστρώματος χημειοφωταύγειας, Thermo Scientific
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10X</b>	108 g Tris, 55 g βορικό οξύ, 40 mL EDTA 0.5M, pH=8 Συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-γλυκίνης</b>	25 mM Tris – 250 mM γλυκίνη – 0,1% (κ.ό.) SDS
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, Transfer Buffer pH=8.3</b>	39 mM γλυκίνης - 48 mM Tris - 0,037% (κ.ό.) SDS - 20% (κ.ό.) μεθανόλη
<b>Ammonium persulfate, APS</b>	Υπερθεικό αμμώνιο

### A.1.1 ΠΕΡΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Οι γενετικές πληροφορίες αποθηκεύονται στο DNA και μεταφέρονται πιστά από ένα μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά, καθώς και στην επόμενη γενεά μέσω των γενετικών κυττάρων. Οι γενετικές αλλαγές είναι μη αναστρέψιμες μεταβολές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA και είναι κληρονομήσιμες. Περιλαμβάνουν σημειακές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις, διαδοχικές επαναλήψεις (σύντομες επαναλαμβανόμενες διαδοχικές αλληλουχίες ή μεταβλητό αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών), ένθεση ή διαγραφή βραχέων αλληλουχιών DNA, μεγάλες διαγραφές ή διπλασιασμούς που αλλοιώνουν τον αριθμό αντιγράφων τμημάτων του DNA και τέλος, ανακατανομή χρωμοσωμάτων μέσω αναστροφών και μετατοπίσεων. Η πλειονότητα των γενετικών παραλλαγών που παρατηρούνται στον ανθρώπινο πληθυσμό είναι καλά ανεκτές και δεν επηρεάζουν αρνητικά τον φαινότυπο ή τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες [1].

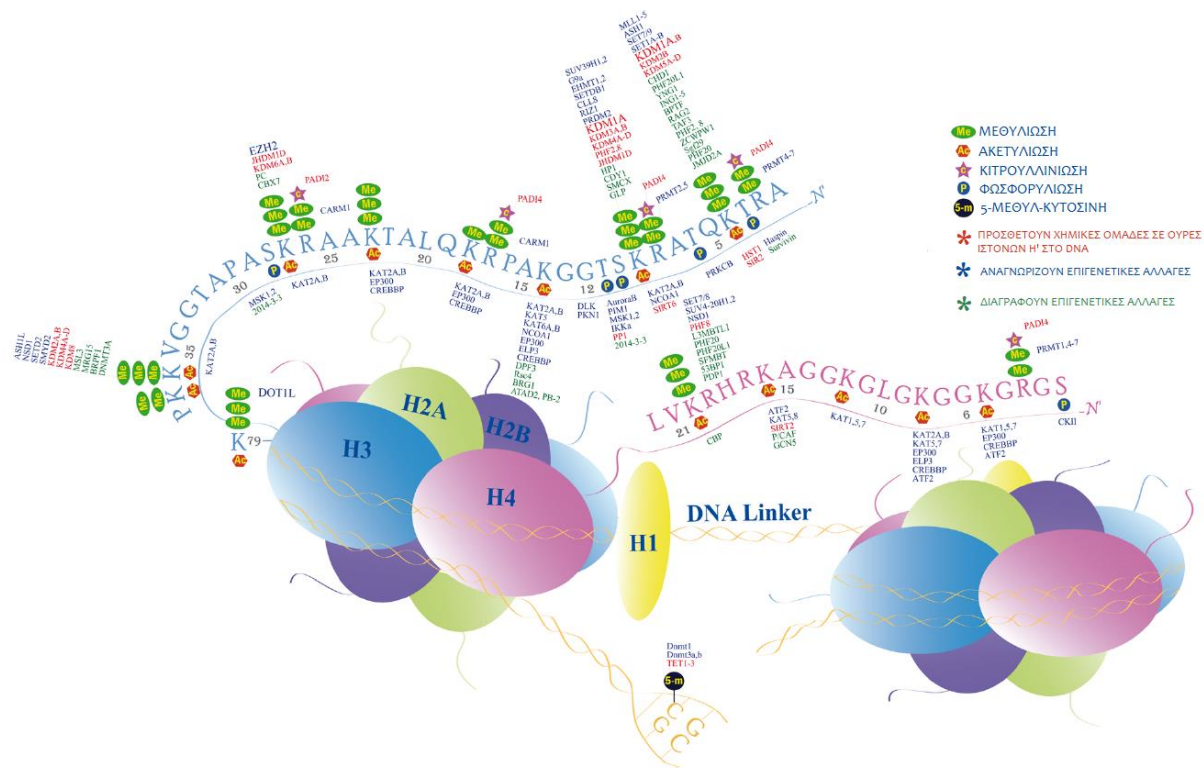
Μετάφραση της ίδιας γενετικής πληροφορίας (γονότυπος) για την παραγωγή κυτταρο-ειδικού φαινοτύπου επιτυγχάνεται με επιγενετικούς μηχανισμούς, οι οποίοι ρυθμίζουν και διατηρούν πρότυπα διαφορικής γονιδιακής έκφρασης χωρίς να μεταβάλλεται η υποκείμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA. Το 1942, ο αναπτυξιακός βιολόγος *Conrad Waddington* χρησιμοποίησε τον όρο «επιγενετικό ανάγλυφο» για να περιγράψει τις φαινοτυπικές μεταβολές οι οποίες παρατηρούνται από κύτταρο σε κύτταρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης σε πολυκύτταρους οργανισμούς [2]. Από βιοχημικές μελέτες και πειράματα που διεξάγονται σε οργανισμούς-μοντέλα και σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινης προέλευσης, γνωρίζουμε ότι ο επιγενετικός έλεγχος επιτυγχάνεται με μεταβολές α. στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Post-translational Modifications; PTMs) των ιστονών, β. στη δομή της χρωματίνης (Chromatin Remodeling), γ. στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA (DNA Methylation), και δ. στις αλληλεπιδράσεις μη κωδικών μορίων RNA (Non-coding RNAs) [Εικόνα 1-1] [3].

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA βρίσκεται οργανωμένο σε μορφή χρωματίνης. Τα νουκλεοσώματα είναι οι βασικές μονάδες της χρωματίνης. Κάθε νουκλεόσωμα αποτελείται από 147 ζεύγη βάσεων (bp) DNA που περιελίσσονται σχεδόν δύο φορές γύρω από ένα οκταμερές ιστόνης, το οποίο περιέχει δύο αντίγραφα καθεμίας από τις τέσσερις πρωτεΐνες ιστόνης H2A, H2B, H3 και H4 [4-6]. Επιπλέον, οι ιστόνες-σύνδεσμοι (μέλη της οικογένειας ιστόνης H1) ενσωματώνονται στα σημεία όπου το DNA εισέρχεται και εξέρχεται από τη δομή του νουκλεοσώματος.

Η επακόλουθη συμπύκνωση του DNA που περιβάλλεται από ιστόνες, καθώς και η αναδίπλωση του νουκλεοσωμικών συστοιχιών λειτουργούν ως φραγμός σε ένζυμα και σε άλλους παράγοντες που

απαιτούν πρόσβαση στη νουκλεοτιδική του αλληλουχία, για να επηρεάσουν τη γονιδιακή μεταγραφή, την αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA. Διάφοροι μηχανισμοί επιγενετικού ελέγχου συνεργάζονται για να ρυθμίζουν την κατάσταση των γονιδίων σε «ΕΝΕΡΓΟ» και «ΜΗ-ΕΝΕΡΓΟ», επηρεάζοντας την πρόσβαση στο DNA μεταγραφικών παραγόντων, του γενικότερου μηχανισμού μεταγραφής καθώς και τη μετά-μεταγραφική ρύθμιση του RNA, και να συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος.

## A.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ



Εικόνα 1-1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του νουκλεοσώματος και των διαφόρων κατηγοριών επιγενετικών τροποποιήσεων στα μόρια ιστονών H3, H4 καθώς και στη διπλή έλικα του DNA. (Ludovica Morera et al., 2016)

### A.1.2.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Ένας από τους πιο κοινούς επιγενετικούς μηχανισμούς ελέγχου που σχετίζεται με τη γονιδιακή καταστολή/σίγαση είναι η μεθυλίωση του DNA σε κατάλοιπα κυτοσίνης [7,8]. Περιλαμβάνει την εισαγωγή επιγενετικών σημάτων μέσω της μεθυλίωσης εξειδικευμένων θέσεων κυτοσίνης στο DNA [προστίθεται μία μεθυλομάδα από την S-αδενοσυλο-μεθειονίνη στη θέση 5 του πυριμιδινικού δακτυλίου της βάσης δεοξυκυτοσίνης (dC) η οποία μετατρέπεται σε δεοξυμεθυλοκυτοσίνη (dmC)]. Οι CpG νησίδες είναι περιοχές DNA με μήκος μέχρι και αρκετές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων, είναι πλούσιες σε δινουκλεοτίδια

CG και περιέχουν πολλές CpG θέσεις. Οι CpG νησίδες εμφανίζονται συχνά σε περιοχές υποκινητών και η μεθυλίωσή τους συνήθως αποτρέπει τη γονιδιακή έκφραση. Νέες επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι η μεθυλίωση του DNA μπορεί επίσης να εμφανίζεται σε μη CpG θέσεις (CpA, CpT και CpC) και να εξακολουθεί να ελέγξει τη γονιδιακή έκφραση [9].

Η αντίδραση της μεθυλίωσης του DNA καταλύεται από τα ένζυμα της οικογένειας των μεθυλοτρανσφερασών (DNA Methyltransferases; DNMTs), βασικά μέλη των οποίων είναι οι DNMT1, DNMT3a, DNMT3b και DNMT3L. Η DNMT1 συμβάλλει στη διατήρηση της μεθυλίωσης κατά το διπλασιασμό του DNA, ενώ οι DNMT3a και DNMT3b μπορούν και δρουν χωρίς να υπάρχει προγενέστερη μεθυλίωση, οπότε και φέρουν εις πέρας την *de novo* μεθυλίωση του DNA. Τέλος η DNMT3L επάγει τη δράση των DNMT3a και DNMT3b [10-12]. Η μεθυλίωση του DNA είναι αντιστρεπτή διαδικασία και πραγματοποιείται με δύο τρόπους, παθητικά και ενεργητικά. Ο παθητικός τρόπος απομεθυλίωσης λαμβάνει χώρα κατά το διπλασιασμό του DNA, όταν η DNMT1 αδυνατεί να δράσει [13]. Ο ενεργητικός τρόπος απομεθυλίωσης απαιτεί τη δράση ειδικών ενζύμων, των DNA απομεθυλασών.

#### A.1.2.2. ΜΗ-ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

Τα μη-κωδικά RNAs (Non-coding RNAs; ncRNAs) τα οποία δε μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, μπορούν να διαχωριστούν σε βιοσυνθετικά/καταβολικά μη-κωδικά RNAs (Housekeeping ncRNAs) και σε ρυθμιστικά μη-κωδικά RNAs (Regulatory ncRNAs). Τα RNAs τα οποία έχουν ρυθμιστικό ρόλο, χωρίζονται κυρίως σε δύο κατηγορίες με βάση το μέγεθος τους: σε βραχείας αλυσίδας μη-κωδικά RNAs (συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, siRNAs και piRNAs) και μακράς αλυσίδας μη-κωδικά RNAs (lncRNAs) [14-16]. Ορισμένα από αυτά τα RNAs έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν σίγαση της γονιδιακής έκφρασης είτε μέσω του σχηματισμού τριπλής έλικας με το DNA είτε μέσω πρόσδεσης σε περιοχές στόχου σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα βάσεων. Δρουν σαν ικρίωμα για την τροποποίηση της χρωματίνης, την αναδιαμόρφωση πρωτεϊνικών συμπλοκών, καθώς επίσης και για τη στρατολόγηση παραγόντων [14].

#### A.1.2.3. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ

Πρόκειται για υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες, περιέχουν μια σφαιρική επικράτεια και μια ευέλικτη μη-δομημένη αμινοτελική ουρά (ουρά ιστόνης) που προεξέχει του νουκλεοσώματος. Οι ιστόνες μπορούν να υποβληθούν σε αρκετές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η ριβοζυλίωση, η ουβικιτιλίωση και η σουμοϋλίωση καταλοΐπων λυσίνης, η φωσφορυλίωση καταλοΐπων σερίνης και θρεονίνης, και η ακετυλίωση ή μεθυλίωση καταλοΐπων λυσίνης και αργινίνης. Κατάλοιπα λυσίνης σε ουρές ιστόνης έχουν θετικό φορτίο, το οποίο αλληλεπιδρά με τον αρνητικά φορτισμένο κορμό φωσφορικών του DNA.

Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις οδηγούν σε μεταβολές στη δομή της χρωματίνης και, συνεπώς, επηρεάζουν την προσβασιμότητα των παραγόντων μεταγραφής ώστε να μπορούν να «διαβάσουν» και/ή να αντιγράψουν τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδικών βάσεων. Επομένως, αυτές οι δομές είναι δυναμικές, γιατί διαθέτουν την ικανότητα ρύθμισης της αναδίπλωσης (ετεροχρωματίνη) και της έκτασης τους (ευχρωματίνη) [18].

Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (Histone Acetyl Transferases; HATs) ακετυλιώνουν ειδικά κατάλοιπα λυσίνης, επιγενετική τροποποίηση η οποία αναστρέφεται από τις αποακετυλάσες ιστόνης (Histone Acetyl Deacetylases; HDACs) [19]. Η ακετυλίωση συχνά συσχετίζεται με περιοχές ευχρωματίνης οι οποίες είναι προσβάσιμες στο μεταγραφικό μηχανισμό. Οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης ανήκουν σε πέντε διαφορετικές οικογένειες, εκ των οποίων μέλη των Gcn5-N-ακετυλοτρανσφερασών και MYST οικογενειών θεωρούνται τα περισσότερα άφθονα, ακολουθούμενα από τα μέλη της οικογένειας συν-ενεργοποιητών υποδοχέα στεροειδών και των οικογενειών παραγόντων ενεργοποίησης μεταγραφής ATF-2 και TAFII250. Η ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ των οικογενειών είναι χαμηλή. Ωστόσο, όλα τα μέλη δείχνουν δομική ομοιότητα στην κεντρική περιοχή ενζυμικής δραστηριότητας. Οι αποακετυλάσες ιστόνης έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις κύριες κατηγορίες, κατηγορία I: HDACs 1, 2, 3 και 8, κατηγορία-IIa: HDACs 4, 5, 7, και 9, κατηγορία-IIb: HDACs 6 και 10, κατηγορία-III: οι σιρτουΐνες (SirT1-7), και κατηγορία IV: HDAC11.

Τα ένζυμα της οικογένειας κινασών ιστόνης φωσφορυλιώνουν ειδικά κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης και η φωσφορυλίωση μπορεί να αντιστραφεί με τη δράση των φωσφατασών [20]. Φωσφορυλίωση αμινοξικών καταλοίπων ιστονών έχει παρατηρηθεί σε περιοχές συμπυκνωμένης χρωματίνης (ετεροχρωματίνη) και έχει συσχετιστεί με μεταγραφική σίγαση.

Οι ειδικές για κατάλοιπα λυσίνης μεθυλοτρανσφεράσες ιστόνης (Histone Lysine Methyltransferases; KMTs) διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: σε αυτές που περιέχουν επικράτεια SET και σε αυτές που δεν περιέχουν αυτήν την επικράτεια, και οι οποίες μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης, και των οποίων η πρόσθετη μεθυλομάδα απομακρύνεται από τις ειδικές για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάσες (Histone Lysine Demethylases; KDMs) [21]. Οι ειδικές για κατάλοιπα αργινίνης μεθυλοτρανσφεράσες μεθυλιώνουν κατάλοιπα αργινίνης και των οποίων η μεθυλομάδα μπορεί να αφαιρεθεί έμμεσα από τις αποϊμινάσες αργινίνης που μετατρέπουν τη μεθυλ-αργινίνη σε κατάλοιπο κιτρουλίνης [21,22]. Η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης έχει παρατηρηθεί σε τρεις καταστάσεις μόνο-, δι- ή τριμεθυλιωμένη. Για παράδειγμα, η δι- ή τριμεθυλίωση στη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (H3K4me2 και H3K4me3) και μονομεθυλίωση της λυσίνης 9 (H3K9me1) είναι σημάδια μεταγραφικής ενεργοποίησης. Ωστόσο, η δι- και τριμεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης 9 (H3K9me2 και H3K9me3) και λυσίνης 27 της ιστόνης H3 (H3K27me2 και H3K27me3) θεωρούνται σημάδια καταστολής που αποκλείουν τη γονιδιακή έκφραση.

Η ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση ιστόνης 1 (Histone Lysine Demethylase 1; LSD1 ή KDM1A) και η ειδική για κατάλοιπα λυσίνης απομεθυλάση ιστόνης 2 (Histone Lysine Demethylase 2; LSD2 ή KDM1B) απομακρύνουν τη μόνο- και διμεθυλίωση από τα κατάλοιπα λυσίνης H3K4 και H3K9 αντίστοιχα. Τέλος, τα μέλη μια δεύτερης οικογένειας απομεθυλασών ειδικών για κατάλοιπα λυσίνης (KDMs) περιέχουν μια χαρακτηριστική επικράτεια ονομαζόμενη Jumonji C (Jumonji C Domain-containing Proteins; JMJs) (JMJD1, JMJD3 και JMJD2D) και μεσολαβούν στην απομεθυλίωση, καθένα από τα οποία στοχεύει σε συγκεκριμένη ομάδα μεθυλιωμένης λυσίνης.

#### A.1.2.3.1. ΑΠΟΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η μεθυλίωση των ιστονών παρατηρείται σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης που βρίσκονται στις προεξέχουσες από τη δομή του νουκλεοσώματος, ουρές τους. Τα κατάλοιπα αργινίνης είναι μόνο ή διμεθυλιωμένα στις ομάδες γουανιδίνης που φέρουν και η μεθυλίωση σε αυτές τις θέσεις στις ουρές της ιστόνης H3 συνδέεται με ενεργή μεταγραφή [23,24]. Η απομεθυλίωση του κατάλοιπου αργινίνης πραγματοποιείται μέσω της πεπτιδυλ-αργινίνης αποϊμινάσης 4 (Peptidyl Arginine Deiminase 4; PADI4) η οποία αντιτίθεται στη μεθυλίωση με μετατροπή της αργινίνης σε κιτρουλίνη [24]. Αυτή η τροποποίηση, ωστόσο, δε θεωρείται απομεθυλίωση, καθώς η μετατροπή από αργινίνη σε κιτρουλίνη έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια μίας ομάδας μεθυλίου χωρίς να αφήνει ελεύθερη αργινίνη.

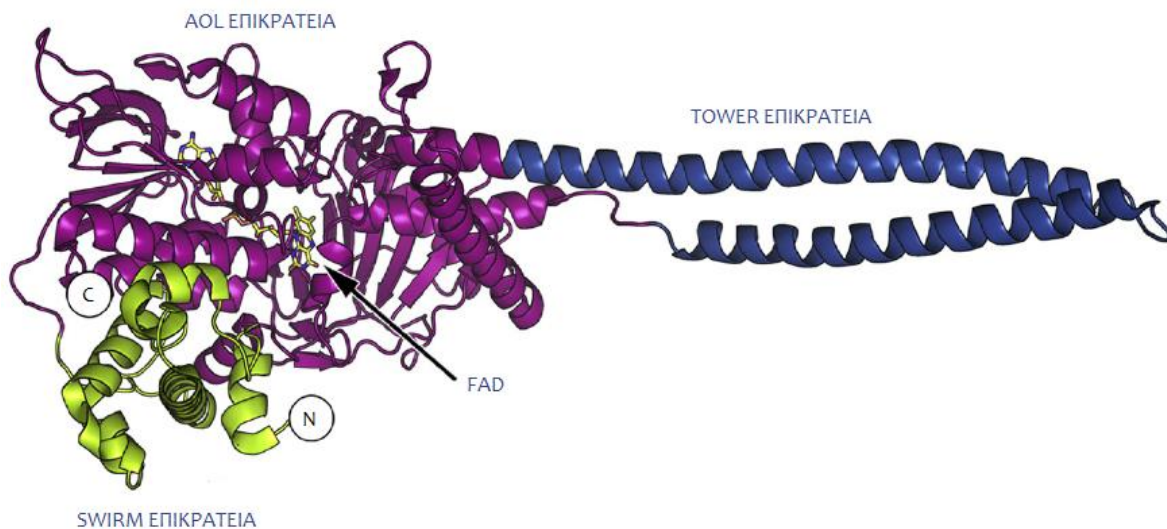
Τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να είναι μόνο-, δι- ή τριμεθυλιωμένα στο ε-άζωτο με μεθυλίωση που συνδέεται είτε με μεταγραφική ενεργοποίηση είτε με καταστολή, ανάλογα με τη θέση της λυσίνης και το επίπεδο μεθυλίωσης [25]. Η δι- και τριμεθυλίωση στην H3K4 σχετίζεται με αυξημένη γονιδιακή έκφραση ενώ η μεθυλίωση στις H3K9, H3K27 και H4K20 συνδέεται με καταστολή. Αυτές οι ομάδες μεθυλίου είναι ικανές να απομακρυνθούν με απομεθυλάσες ιστόνης οι οποίες ταξινομούνται σε δύο οικογένειες: στις ομόλογες αμινο-οξειδάσες απομεθυλάσες λυσίνης 1 (Histone Lysine Demethylases; KDM1) και στις απομεθυλάσες ιστόνης οι οποίες περιλαμβάνουν μια JmjC περιοχή (Jumonji C Domain-containing Proteins; JMJs) [26].



### A.1.3. Η ΑΠΟΜΕΘΥΛΑΣΗ LSD-1 (KDM1A)

#### A.1.3.1. Η ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1

Η LSD-1 είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 92903 Da και συνολικού μήκους 852 αμινοξέων. Το γονίδιο το οποίο την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 στη θέση p36.12 (1p36.12). Αποτελείται από 21 εξόνια και έχει συνολικό μήκος 3107 ζεύγη βάσεων. Η πρωτεΐνη LSD-1 εμφανίζει μεγάλο βαθμό συντηρητικότητας στους οργανισμούς, από τον *Schizosaccharomyces pombe* ως τον άνθρωπο. Δομικά αποτελείται από τρεις κύριες επικράτειες: την αμινοτελική επικράτεια SWIRM, την καρβοξυτελική επικράτεια AOL (Amine Oxidase-like) και την κεντρική προεξέχουσα επικράτεια TOWER [Εικόνα 1-2]. Οι επικράτειες SWIRM και AOL αλληλεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους σχηματίζοντας μια συνολικά σφαιρική δομή, ενώ η επικράτεια TOWER αποτελείται από ένα ζευγάρι ελίκων υιοθετεί στερεοδιάταξη συσπειρωμένου ελατηρίου.



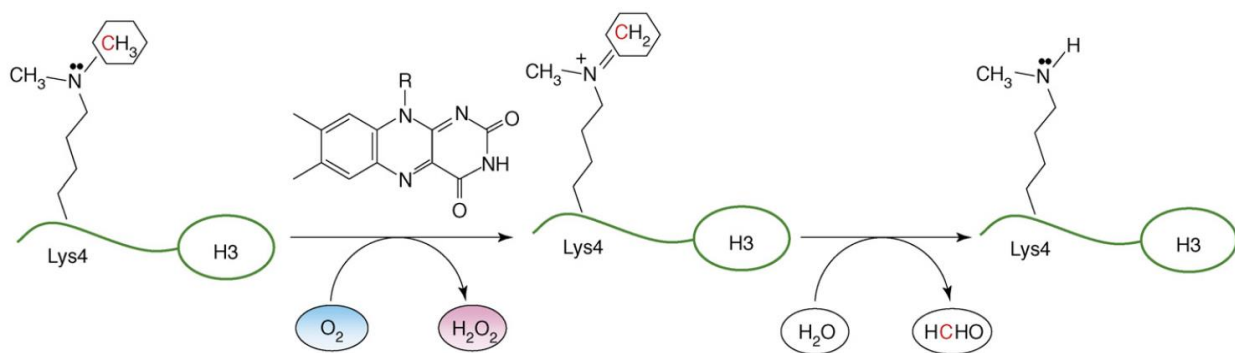
Εικόνα 1-2: Σχηματική απεικόνιση στερεοδιαταξικής διαμόρφωσης της LSD-1. (Jonathan M. Burg et al., 2015)

Η  $\alpha$ -ελικοειδής επικράτεια SWIRM είναι κοινή σε πολλές πρωτεΐνες οι οποίες συμπλέκονται με τη δομή της χρωματίνης. Η επικράτεια AOL αναδιπλώνεται σε μια συμπαγή δομή, η οποία εμφανίζει δομική ομολογία με άλλα ένζυμα αμινοοξειδασών που περιέχουν φλαβίνη. Η επικράτεια AOL της πρωτεΐνης LSD-1 είναι λειτουργικά χωρισμένη σε δύο υποπεριοχές, την περιοχή δέσμευσης FAD και την περιοχή δέσμευσης υποστρώματος. Ο χώρος μεταξύ αυτών των δύο υπομοντέλων ορίζει μια ανοικτή κοιλότητα όπου πραγματοποιείται η αντίδραση απομεθυλίωσης.

Η επικράτεια TOWER λειτουργεί ως κόμβος για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως η συν-κατασταλτική πρωτεΐνη (Corepressor for Element-1-silencing Transcription Factor; CoREST). Επίσης θεωρείται απαραίτητη για τη σταθερή αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο CoREST και για την εξασφάλιση της λειτουργικής δραστηριότητας του ενζύμου. Η πρωτεΐνη LSD-1 διαθέτει τέσσερις ισομορφές που προκύπτουν από συνδυαστική διατήρηση των εξονίων 2a και 8a [27].

#### A.1.3.2. Η ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1

Η ενζυμική δραστηριότητα της LSD-1 περιεγράφηκε για πρώτη φορά από τους *Shi et al.*, το 2004, όπου βρέθηκε ότι απομεθυλώνει τη μόνο- ή δι-μεθυλιωμένη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (H3K4me1/me2), αλλά όχι και την τριμεθυλιωμένη H3K4me3 ή τη μεθυλιωμένη H3K9. Η καταλυτική δραστηριότητα της LSD-1 βρίσκεται στην επικράτεια AOL και εξαρτάται από το συμπαραγόνα FAD.



Εικόνα 1-3: Μηχανισμός ενζυμικής δραστηριότητας της απομεθυλάσης LSD-1. (Federico Forneris et al., 2008)

Η αντίδραση περιλαμβάνει τη μετατροπή της μεθυλιωμένης λυσίνης σε ένα κατιόν ιμινίου μέσω αφαίρεσης ενός ανιόντος υδριδίου από το οξειδωμένο FAD. Το κατιόν υδρολύεται και προκύπτει μια καρβυνολαμίνη, η οποία στη συνέχεια διασπάται σε φορμαλδεΰδη και στο απομεθυλιωμένο κατάλοιπο. Το ανηγμένο FAD οξειδώνεται και πάλι ταχύτατα από το μοριακό οξυγόνο. Από την αντίδραση αυτή προκύπτει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και οξειδωμένο FAD [Εικόνα 1-3]. Ο μηχανισμός της απομεθυλίωσης βασίζεται σε ένα ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων που βρίσκεται στο πλευρικό άτομο αζώτου της λυσίνης. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί γιατί η πρωτεΐνη LSD-1 μπορεί να απομεθυλώνει μόνο- και δι-μεθυλιωμένη, αλλά όχι τριμεθυλιωμένη λυσίνη.

Η επικράτεια AOL περιέχει δύο λοβούς. Ο ένας σχηματίζει μια μη ομοιοπολική θέση δέσμευσης FAD και ο άλλος λοβός σχηματίζει μια θέση αναγνώρισης και δέσμευσης του υποστρώματος. Η υποεπικράτεια δέσμευσης του FAD παρουσιάζει εξαιρετική ομοιότητα με αυτές άλλων αμινοοξειδασών, αλλά η υποεπικράτεια δέσμευσης του υποστρώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή άλλων μελών και έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά όχι μόνο με το στόχο του αλλά και με τα γειτονικά κατάλοιπα.

Συγκεκριμένα, για να εξασφαλιστεί η ικανότητα απομεθυλάσης, απαιτούνται τουλάχιστον 16 αμινοξικά κατάλοιπα της ουράς της ιστόνης H3 [27]. Το άκρο της επικράτειας AOL αποτελείται από αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα, τα οποία πιθανώς εξασφαλίζουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της LSD-1 και του υποστρώματος της. Τέλος, ανάμεσα στις επικράτειες SWIRM και AOL υπάρχει μια μεγάλη επιφανειακή σχισμή, η οποία πιθανώς προσφέρει επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα υποστρώματα [28].

Η χαρακτηριστική επικράτεια της LSD-1, TOWER, προέρχεται από την καταλυτική περιοχή, επομένως πιστεύεται ότι η δέσμευση άλλων πρωτεϊνών προκαλεί αλλοστερική ρύθμιση στην κατάλυση ή στην αναγνώριση υποστρώματος. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση της επικράτειας TOWER με την SANT2, είναι απαραίτητη για την ικανότητα απομεθυλίωσης της LSD-1, πιθανότατα μέσω της αλληλεπίδρασης της τελευταίας με το νουκλεοσωμικό DNA.

Η επικράτεια SWIRM της LSD-1 δεν έχει τη δυνατότητα δέσμευσης στο DNA, όπως συμβαίνει με άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν τέτοιου τύπου επικράτεια. Αντιθέτως, συμβάλλει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, διατηρώντας τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης. Η επικράτεια αυτή είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της LSD-1 με τον υποδοχέα των ανδρογόνων. Η σύνδεση αυτή επάγει την αλλαγή της ειδικότητας υποστρώματος της LSD-1, από την H3K4 στην H3K9. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης έχουν δείξει ότι η ικανότητα απομεθυλίωσης της LSD-1 εξαρτάται από πολλά κατάλοιπα στην καταλυτική περιοχή και στη διεπαφή των SWIRM και AOL. Επίσης, υπάρχουν μεταλλάξεις στο υπόστρωμα που υποβαθμίζουν την ικανότητα της απομεθυλίωσης από την πρωτεΐνη. Επίσης, επιγενετικές τροποποιήσεις επίσης επηρεάζουν την ικανότητα μεθυλίωσης της H3K4. Για παράδειγμα, τα υπερακετυλιωμένα νουκλεοσώματα είναι λιγότερο επιρρεπή στην απομεθυλίωση από την LSD-1 σε σχέση με τα υποακετυλιωμένα νουκλεοσώματα.

Τέλος, πέρα από την ιστόνη H3, η LSD-1 έχει βρεθεί ότι απομεθυλώνει τις πρωτεΐνες TP53, E2F1 και DNMT ρυθμίζοντας τη σταθερότητα ή τη δραστικότητα τους. Παραδόξως, δεν υπάρχει ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ ιστονικών και μη ιστονικών υποστρωμάτων, πιθανώς λόγω του ρόλου των συνεργιστικών πρωτεϊνών στη διαδικασία της απομεθυλίωσης [27-29].

### A.1.3.3. Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1

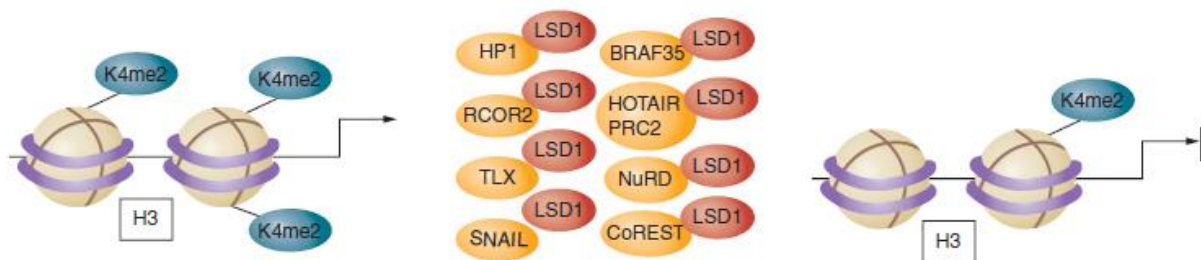
#### A.1.3.3.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ

Η πρωτεΐνη LSD-1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές διεργασίες τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα, όπως είναι ο έλεγχος της διαφοροποίησης, της κυτταρικής κινητικότητας, του μεταβολισμού καθώς και της μετάβασης από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση. Προκείμενου να συμβάλλει επιτυχώς στη ρύθμιση των παραπάνω πολλαπλών βιολογικών

λειτουργιών, εντοπίζεται σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και ανάλογα με τον τύπο των πρωτεϊνών με τις οποίες συμπλέκεται ενεργεί είτε ως συν-ενεργοποιητής είτε ως συν-καταστολέας.

#### A.1.3.3.1.1. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ

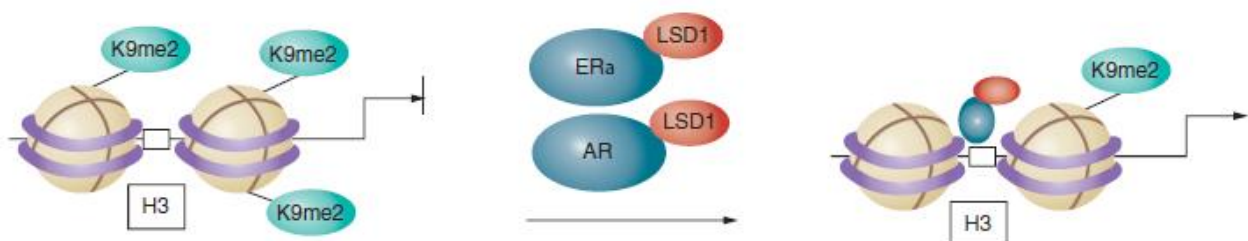
Αρχικά η LSD-1 αναγνωρίστηκε ως συστατικό κατασταλτικών μεταγραφικών συμπλεγμάτων όπως του CoREST και του HDAC1/2. Η συμπλοκοποίηση της LSD-1 με το CoREST έχει ως αποτέλεσμα τη μακροπρόθεσμη καταστολή των γονιδίων στόχων. Η στρατολόγηση της LSD-1 σε ειδικά γονίδια-στόχους επιτυγχάνεται χάρη στην ικανότητά της να δεσμεύεται στην επικράτεια SNAG διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων. Η αμινοξική αλληλουχία της επικράτειας SNAG μιμείται εκείνης του αμινοτελικού άκρου της ιστόνης H3 για να συνδεθεί στο καταλυτικό κέντρο της LSD-1 [Εικόνα 1-4].



Εικόνα 1-4: Μηχανισμός απομεθυλίωσης καταλοίπων λυσίνης στην ιστόνη H3 από την πρωτεΐνη LSD-1 ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής. (Amir Hosseini et al., 2017)

#### A.1.3.3.1.2. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ LSD-1 ΩΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΣΥΝ-ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ

Η LSD-1 γενικά απομεθυλώνει μονομεθυλωμένα- και διμεθυλωμένα κατάλοιπα της λυσίνης 4 στο μόριο της-ιστόνης H3 (H3K4me1/2), μεθυλίωση η οποία σχετίζεται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ωστόσο μπορεί επίσης να δράσει ως συν-ενεργοποιητής στην εξαρτώμενη από υποδοχείς ανδρογόνου (AR) και οιστρογόνου (ER) μεταγραφή, μέσω της απομεθυλίωσης μονομεθυλωμένων και



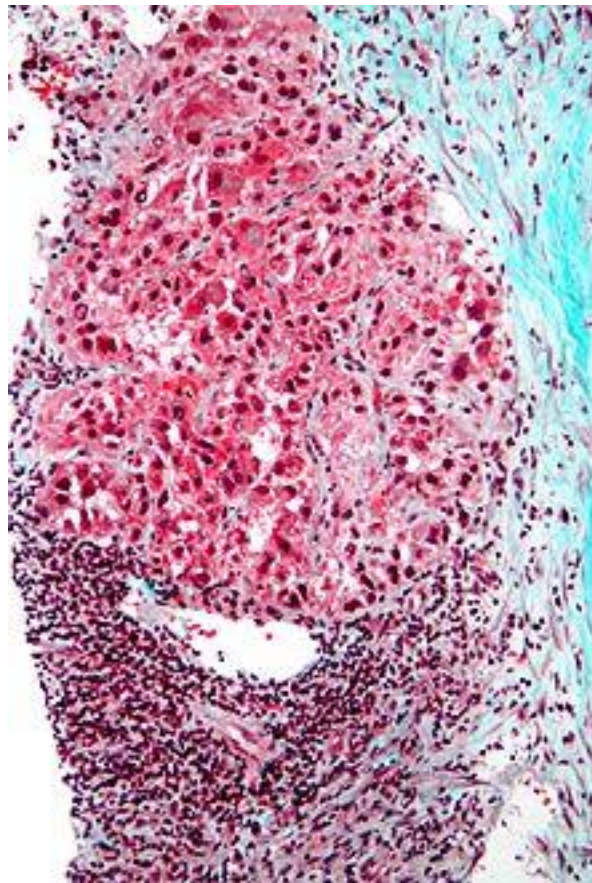
Εικόνα 1-5: Μηχανισμός απομεθυλίωσης καταλοίπων λυσίνης στην ιστόνη H3 από την πρωτεΐνη LSD-1 ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής. (Amir Hosseini et al., 2017)

διμεθυλιωμένων καταλοίπων της λυσίνης 9 στο μόριο ιστόνης H3 (H3K9me1/2), μεθυλίωση που είναι συνδεδεμένη με μεταγραφική καταστολή [Εικόνα 1-5] [27].

Η αλληλεπίδραση της LSD-1 με πυρηνικούς υποδοχείς ανδρογόνου ή οιστρογόνου έχει αναφερθεί ότι άμεσα ή έμμεσα διαφοροποιεί την εξειδίκευση του υποστρώματος από την H3K4me1/me2 στην H3K9me1/me2. Η πρωτεϊνική κινάση C η οποία προσδένεται στους υποκινητές-στόχους των υποδοχών οιστρογόνου φωσφορυλιώνει το κατάλοιπο θρεονίνης 6 της ιστόνης H3 (H3T6). Η τροποποίηση αυτή έχει προταθεί για την αλλαγή του υποστρώματος απομεθυλίωσης LSD-1 από την H3K4 σε H3K9. Τέλος, η στρατολόγηση της LSD-1 από τους υποδοχείς ανδρογόνου σε γονίδια-στόχους προκαλεί την οξειδωση του DNA και την προσέλκυση ενζύμων επιδιόρθωσης του, γεγονότα που υποκινούν αλλαγές στη διαμόρφωση της χρωματίνης που είναι απαραίτητες για την επαγόμενη από AR μεταγραφή [27].

#### A.1.4. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) θεωρείται ο πιο συνηθισμένος τύπος πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος καθώς και η ταχύτερα αναπτυσσόμενη αιτία θνησιμότητας σχετιζόμενης με τον καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο επιπολασμός του ΗΚΚ ποικίλλει σημαντικά σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Η άνιση κατανομή της συχνότητας εμφάνισης του μεταξύ διαφορετικών περιοχών, υποδηλώνει ότι πολλαπλοί γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να αλληλεπιδρούν στην εξέλιξη αυτής της νόσου. Σχεδόν το 70-90% των ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζουν κίρρωση του ήπατος, η οποία πιστεύεται ότι είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου [30]. Η παθογένεση του ΗΚΚ θεωρείται μια μακροπρόθεσμη διαδικασία η οποία αρχίζει από το προ-κακοήθες στάδιο, μεταπίπτει στο δυσπλαστικό και τελικά καταλήγει στο κακοήθες [31].



Εικόνα 1-6: Ιστοπαθολογική εικόνα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. (Michael Bonert, Copyright © 2011)

Όπως προαναφέρθηκε, ο καρκίνος εξελίσσεται προοδευτικά μέχρι τα φυσιολογικά κύτταρα να αποκτήσουν χαρακτηριστικά κακοήθειας. Κατά τη διάρκεια αυτής της πολυσταδιακής διαδικασίας, τα

καρκινικά κύτταρα έχουν αποκτήσει χαρακτηριστικά γνωρίσματα, τα οποία τους προσδίδουν ογκογονικότητα [32]. Όπως και άλλοι συμπαγείς όγκοι, το ΗΚΚ χαρακτηρίζεται από συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ικανότητα μετάστασης σε άλλους ιστούς, αγγειογένεση, ανθεκτικότητα στον κυτταρικό θάνατο, και απορρύθμιση ενεργειακού μεταβολισμού.

Η ποικιλομορφία των φαινοτύπων των καρκινικών κυττάρων συσχετίζεται συνήθως με διάφορες γενετικές ή επιγενετικές αλλοιώσεις σημαντικών ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έτσι, η σύνδεση των χαρακτηριστικών του ΗΚΚ με γενετικές ή επιγενετικές τροποποιήσεις θα συμβάλει στην αναγνώριση πιθανών μοριακών μηχανισμών και στην ανακάλυψη νέων στόχων για τη θεραπεία του [Εικόνα 1-6].

#### A.1.4.1. ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΟΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ένας εξαιρετικά ετερογενής όγκος. Η ηπατοκαρκινογένεση είναι μια σύνθετη πολυβαθμιδωτή διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά από γενετικές και επιγενετικές αλλοιώσεις, την ενεργοποίηση κυτταρικών ογκογονιδίων και/ή την αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και την απορρύθμιση πολλαπλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Μεταξύ αυτών των οδών σηματοδότησης περιλαμβάνονται τα μονοπάτια Wnt/ $\beta$ -κατενίνη, Ras/MEK/MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT, Hedgehog και αυξητικοί παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor; EGF) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ; TGF- $\beta$ ) [33].

#### A.1.4.2. ΙΝΩΣΗ, ΚΙΡΡΩΣΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Με βάση τα επιδημιολογικά στοιχεία, το 80-90% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος αναπτύσσεται σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από κίρρωση [34]. Μετά από 20-30 έτη χρόνιας ηπατικής λοίμωξης, το 20-30% των ασθενών αναπτύσσει κίρρωση. Το ΗΚΚ αναπτύσσεται σε ένα ετήσιο ποσοστό 1-7% σε κίρρωτικούς ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) και 3-8% σε κίρρωτικούς ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) [35].

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ηπατικής βλάβης, τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα (Hepatic Stellate Cells; HSCs) ενεργοποιούνται, και έχοντας απολέσει λιπιδικά σταγονίδια που περιέχουν ρετινοειδή, μετασχηματίζονται σε κύτταρα που μοιάζουν με μυοϊνοβλάστες, τα οποία παράγουν εξωκυτταρική μήτρα, το πρώτο στάδιο ηπατικής ίνωσης. Μη ελεγχόμενη εξέλιξη της ίνωσης οδηγεί σε μη αναστρέψιμη κίρρωση. Τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα ανταποκρίνονται σε σήματα κυτταροκινών, οι οποίες αυξορρυθμίζονται κατά την ίνωση και οι οποίες διαμεσολαβούν στη φλεγμονώδη σηματοδότηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που έχουν διεισδύσει στην περιοχή [36]. Ο αυξητικός παράγοντας (Platelet-derived Growth Factor; PDGF) μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση και των

δυο μονοπατιών σηματοδότησης MAPK και PI3K/AKT [36]. Το κίρρωτικό ήπαρ σχετίζεται επίσης με τη μείωση του μήκους των τελομερών, κατάσταση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωμική αστάθεια και απώλεια σημείων κυτταρικού ελέγχου [37]. Η μείωση των ηπατικών αποθεμάτων κατά την κίρρωση μπορεί να προκαλέσει αύξηση της συσσώρευσης τοξικών μεταβολιτών, η παρουσία των οποίων θα μπορούσε ενδεχομένως να αυξήσει τον κίνδυνο για εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Αυξημένα επίπεδα μη-αποπτωτικών παραγόντων, τα οποία αναστέλλουν το θάνατο των ηπατοκυττάρων που υπέστησαν βλάβη στο DNA (όπως ο Gas6<sup>215</sup>) και των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων, καθώς και μειωμένη ανοσολογική επιτήρηση όγκου λόγω χαμηλών επιπέδων απόκρισης NK κυττάρων (Natural Killer Cells), είναι όλοι, πιθανοί παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε κίρρωτικό ήπαρ [38].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα αστεροειδή κύτταρα εκφράζουν δείκτες βλαστοκυττάρων όπως το CD133 και τον p75 υποδοχέα νευροτροφίνης [39] και ότι τα ενεργοποιημένα αστεροειδή κύτταρα φαίνεται να συμβάλλουν στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων [40]. Τα μονοπάτια σηματοδότησης Hedgehog και Wnt τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων και στο σχηματισμό καρκίνου βρίσκονται και στα αστεροειδή κύτταρα [41,42]. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα μπορεί να διαθέτουν το δυναμικό διαφοροποίησης σε προγονικά κύτταρα και ενδεχομένως να συνδέονται με την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [38].

#### A.1.4.3. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

##### A.1.4.3.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

Στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υπερμεθυλίωση CpG νησίδας παρατηρείται συχνά στην περιοχή του υποκινητή σημαντικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Το προφίλ μεθυλίωσης πολυσταδιακών ηπατοκυτταρικών νεοπλασιών αποκάλυψε ότι ο αριθμός των γονιδίων τα οποία εμφανίζονται μεθυλιωμένα παρουσιάζει σταδιακή αύξηση με την εξέλιξη του καρκίνου. Η παρατήρηση της υπερμεθυλίωσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε κίρρωτικούς και σε παρακείμενους ηπατικούς ιστούς υποδεικνύει ότι η ανώμαλη μεθυλίωση γονιδιακών υποκινητών παρατηρείται στο αρχικό στάδιο της ηπατοκαρκινογένεσης και αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου [43]. Τέλος, ανάλυση DNA-μεθυλίωσης σε επίπεδο γονιδιώματος αποκάλυψε ότι η επιγενετική σίγαση πολλαπλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα θα μπορούσε να οδηγήσει στην ενεργοποίηση αρκετών ογκογόνων μονοπατιών σηματοδότησης συμπεριλαμβανομένων Ras, JAK/STAT και Wnt/β-κατενίνη [43].

#### A.1.4.3.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Η τροποποίηση ιστονών κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης. Ομοιοπολικές τροποποιήσεις αμινοξικών καταλοίπων στα μόρια ιστονών με μεθυλίωση ή ακετυλίωση έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στη δομική διαμόρφωση της χρωματίνης. Απορρύθμιση της έκφρασης των τροποποιητικών αυτών μορίων η οποία προκαλεί περαιτέρω επιγενετικές αλλοιώσεις παρατηρείται συχνά σε καρκινικά κύτταρα.

Ειδικότερα στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η υπερέκφραση του γονιδίου EZH2, το οποίο κωδικοποιεί για μια μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης, προσθέτει τρία μεθύλια στο κατάλοιπο λυσίνης 27 στην ιστόνη H3 (H3K27Me3), και έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στον κακοήθη μετασχηματισμό και αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης [44]. Ο παράγοντας PCAF, θεωρείται μια πολύ γνωστή ακετυλοτρανσφεράση ιστονών (HAT), εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ογκογένεση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Οι αναστολείς των αποακετυλασών ιστονών (HDACs) έχει προταθεί ότι προκαλούν απόπτωση σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα αλλά όχι σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα. Και αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν σε μεγάλο βαθμό την πιθανή χρησιμοποίηση τους στην κλινική θεραπεία ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο [45].

Εκτός από τα τροποποιητικά μόρια ιστονών, το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, το οποίο χρησιμοποιεί μόρια ATP για τη μετακίνηση των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA, συμμετέχει ενεργά στην ογκογένεση. Αλληλούχηση σε επίπεδο γονιδιώματος έχει εντοπίσει επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένων των ARID1A και ARID2 [46]. Οι συχνότερα παρατηρούμενες μεταλλάξεις αποσιώπησης κατέδειξαν σημαντικούς ρόλους του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η ATPάση καθώς και η ελικάση RUVb-τύπου 2 (RUVBL2) βρέθηκαν να υπερεκφράζονται στο ΗΚΚ [47]. Μειορρύθμιση των υπομονάδων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF και BRG1 παρατηρούνται επίσης συχνά σε ασθενείς με ΗΚΚ. Τέλος, η CHD1L ως μέλος της CHD (Chromodomain Helicase DNA Binding Proteins; CHDs) οικογένειας έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ογκογόνο ρόλο στην ηπατοκαρκινογένεση [48-50].

#### A.1.4.3.3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

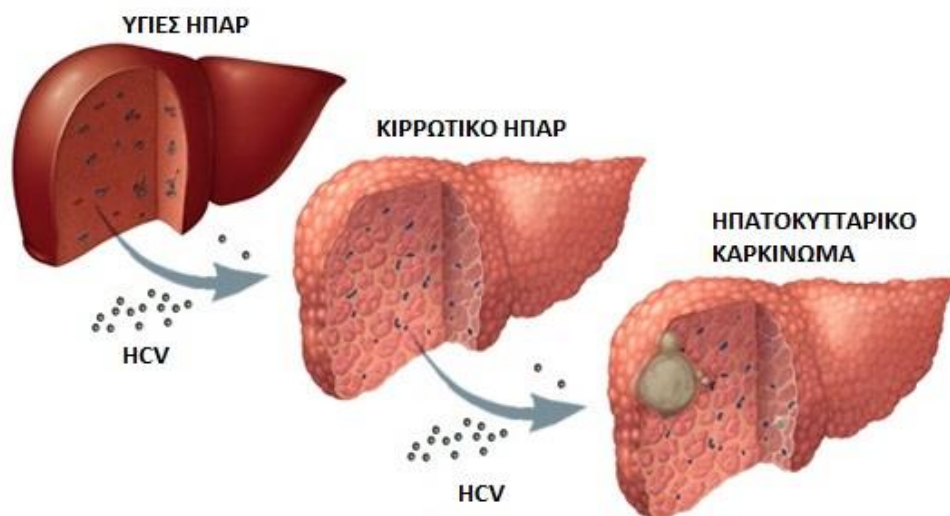
Τα lncRNAs μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή μεταγραφή είτε μέσω απευθείας σύνδεσης στην RNA πολυμεράση II, είτε μέσω τροποποίησης της δραστηριότητας μεταγραφικών συν-ρυθμιστών [51]. Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των lncRNAs έχουν παρατηρηθεί σε όγκους συμπεριλαμβανομένου του ΗΚΚ, και γι 'αυτό πιστεύεται ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης. Αυξημένη έκφραση του lncRNA-HEIH σχετίζεται σημαντικά με υποτροπή του ΗΚΚ και κακή πρόγνωση. In



in vitro και in vivo λειτουργικές μελέτες αποκάλυψαν ότι η υπερέκφραση του lncRNA-HEIH μπορεί να προάγει την ογκογένεση και να οδηγήσει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μέσω της μεθυλοτρανσφεράσης ιστονών EZH2. Επιπλέον, υπερέκφραση των lncRNAs HOTAIR και MALAT-1 θα μπορούσε να βοηθήσει στην πρόβλεψη της υποτροπής και της πρόγνωσης του όγκου των ασθενών με ΗΚΚ. Όλα αυτά τα στοιχεία συνηγορούν ότι τα lncRNAs μπορεί να είναι σημαντικά στην έναρξη και εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [52].

#### A.1.4.4. HCV ΕΠΑΓΟΜΕΝΟ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Η παρατεταμένη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Ωστόσο, δεν υπάρχει πλήρης αποσαφήνιση αν στην παθογένεση του ΗΚΚ που σχετίζεται με HCV λοίμωξη, ο ιός παίζει άμεσο ή έμμεσο ρόλο. Η παρατήρηση ότι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C, με παρατεταμένα υψηλά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης στον ορό είναι επιρρεπείς να εμφανίσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υποδηλώνει τη σημασία της φλεγμονής στην ηπατοκαρκινογένεση. Ωστόσο, η σπάνια ανάπτυξη ΗΚΚ σε ασθενείς με αυτοάνοση ηπατίτιδα, η οποία συνοδεύεται από ισχυρή φλεγμονή, ακόμη και μετά την εξέλιξη σε κίρρωση, συνεπάγεται την πιθανότητα άμεσης εμπλοκής του ιού HCV στην ανάπτυξη του ΗΚΚ.



Εικόνα 1-7: HCV επαγόμενο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. (Mayo Clinic)

Ποιός ενδέχεται να είναι ο ρόλος του ιού HCV, ενός απλού μονόκλωνου ιού RNA θετικής πολικότητας, του οποίου το γονιδίωμα δεν ενσωματώνεται ποτέ στο γονιδίωμα του ξενιστή, στην ηπατοκαρκινογένεση;

Οι μελέτες που χρησιμοποιούν διαγονιδιακά μοντέλα ποντικού και *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες, στα οποία εκφράζονται οι HCV ιικές πρωτεΐνες, υποδηλώνουν την άμεση παθογονικότητα του HCV,

συμπεριλαμβανομένων και των ογκογόνων δραστηριοτήτων. Ενδεικτικά αναφέρεται, η πρωτεΐνη *Core* του HCV επάγει το οξειδωτικό στρες μέσω της απορρύθμισης του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, μέσω της προσβολής της λειτουργίας των μοριακών συνοδών. Επιπλέον, ο ιός HCV επάγει διαταραχές στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης, επιταχύνοντας έτσι την εξέλιξη της ίνωσης του ήπατος και της ανάπτυξης ΗΚΚ. Αυτά τα δεδομένα και πληθώρα άλλων που θα αναφερθούν διεξοδικότερα παρακάτω παρέχουν ενδείξεις για την περαιτέρω κατανόηση του ρόλου του HCV στην ηπατοκαρκινογένεση [Εικόνα 1-7] [53].

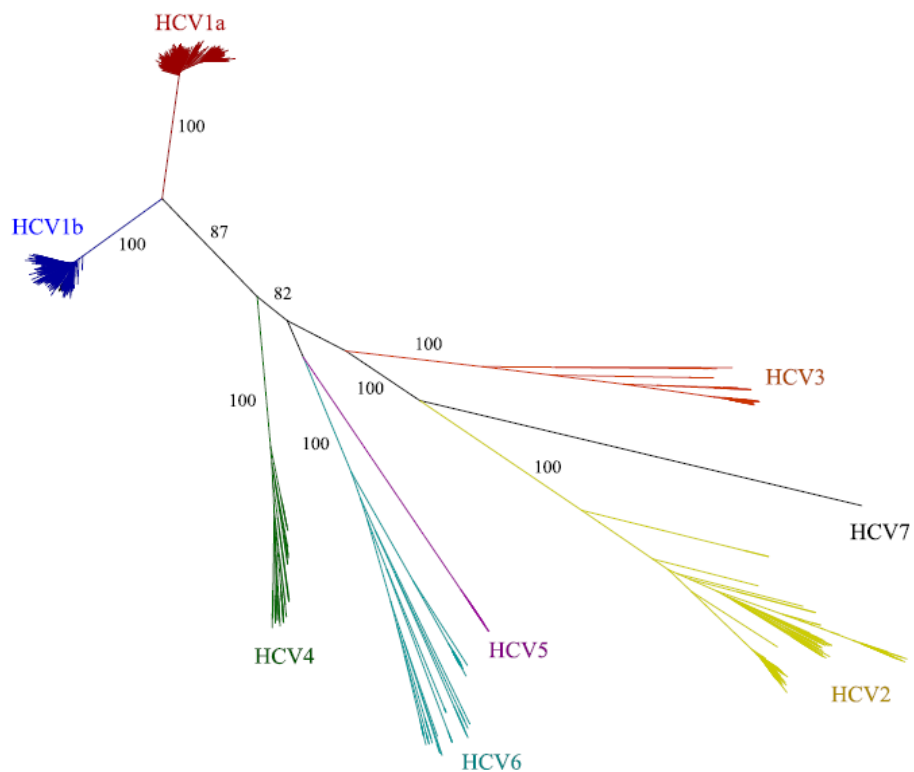
#### A.1.5. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

##### A.1.5.1. Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

###### A.1.5.1.1. Η ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του HCV είναι εκτεταμένη γενετική του ετερογένεια, η οποία υπάρχει σε διάφορα επίπεδα μεταξύ ιικών πληθυσμών σε μεμονωμένα μολυσμένους ασθενείς σε οποιαδήποτε στιγμή και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου, και παγκοσμίως σε απομονωμένα ιικά στελέχη από διαφορετικούς ασθενείς. Σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση μεμονωμένων αλληλουχιών του HCV που πραγματοποιήθηκε το 1993, και βασίστηκε σε δείγματα από μεγάλο αριθμό ασθενών από όλο τον κόσμο, ο ιός μπορεί να ταξινομηθεί σε 6 κύριους γονότυπους με σημαντικούς υποτύπους. Αυτή η ταξινόμηση επιβεβαιώθηκε αργότερα, βάσει ανάλυσης πλήρους μήκους ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης αλληλουχιών (Open Reading Frame Sequences; ORFS).

Ωστόσο, σύντομα αναφέρθηκε ένας 7<sup>ος</sup> σημαντικός γονότυπος, ο οποίος έχει βρεθεί σε λίγα μόνο άτομα. Χάρη στην τεράστια πρόοδο σε τεχνικές ανάλυσης αλληλουχιών υπήρξε μια δραματική αύξηση του αριθμού των δημοσιευμένων ORF ακολουθιών του HCV που αλληλουχήθηκαν, ώστε η φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Smith et al., το 2014 να επιβεβαιώσει την ύπαρξη 7 μεγάλων γονότυπων και 67 υποτύπων. Οι υπότυποι 1α, 1β, 2α, 2β, 2γ, 3α, 4α, 4δ, 5α και 6α είναι επαρκώς καθορισμένοι σε όλο τον κόσμο ή σε ειδικές πληθυσμιακές ομάδες. Τα γονιδιώματα του HCV από απομονωμένα στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικούς μείζονες γονότυπους διαφέρουν κατά 30% περίπου σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Οι υπότυποι συνήθως διαφέρουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 15%.

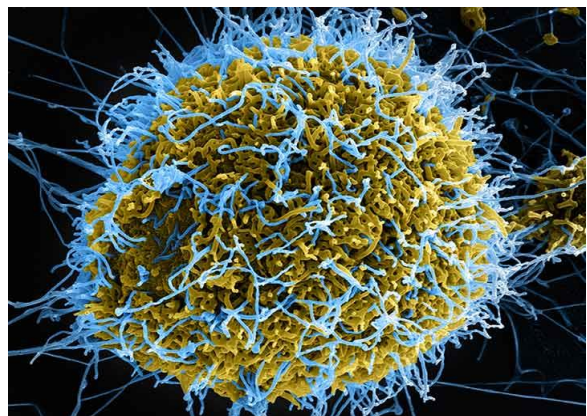


Εικόνα 1-8: Φυλογενετικό δέντρο αλληλουχιών πλήρους γονιδιώματος των 7 HCV γονοτύπων. (Lize Cuypers et al., 2016)

Συνεπώς ο ιός HCV έχει υψηλό επίπεδο γενετικής ετερογένειας με σημαντικές επιπτώσεις στη διάγνωση και τη θεραπεία, καθώς και στη δυνατότητα ανάπτυξης ενός αποτελεσματικού εμβολίου [Εικόνα 1-8] [54].

#### A.1.5.1.2. ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από περίπου 9.600 νουκλεοτίδια. Διαθέτει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), από περίπου 9.000 νουκλεοτίδια σε μήκος, το οποίο πλαισιώνεται στα άκρα από τις 5' και 3' μη μεταφραστικές περιοχές (UTR). Περιοχές οι οποίες θεωρούνται καθοριστικής σημασίας για την ιική αντιγραφή και μετάφραση. Προϊόν της μετάφρασης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του ιού αποτελεί μία πολυπρωτεΐνη



Εικόνα 1-9: Μοντέλο ικού λιποσωματιδίου ιού ηπατίτιδας C. (Lilo H. Stainton, 2018)

περίπου 3.000 αμινοξέων. Η πολυπρωτεΐνη αυτή διασπάται από ένα συνδυασμό των πρωτεασών τόσο του ξενιστή όσο και του ιού, σε τρεις δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παραγωγή ικών σωματιδίων (καψιδιακή πρωτεΐνη και γλυκοπρωτεΐνες ελύτρου E1 και E2) και σε επτά μη δομικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την επεξεργασία, αντιγραφή καθώς και τη συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B) [Εικόνα 1-9].

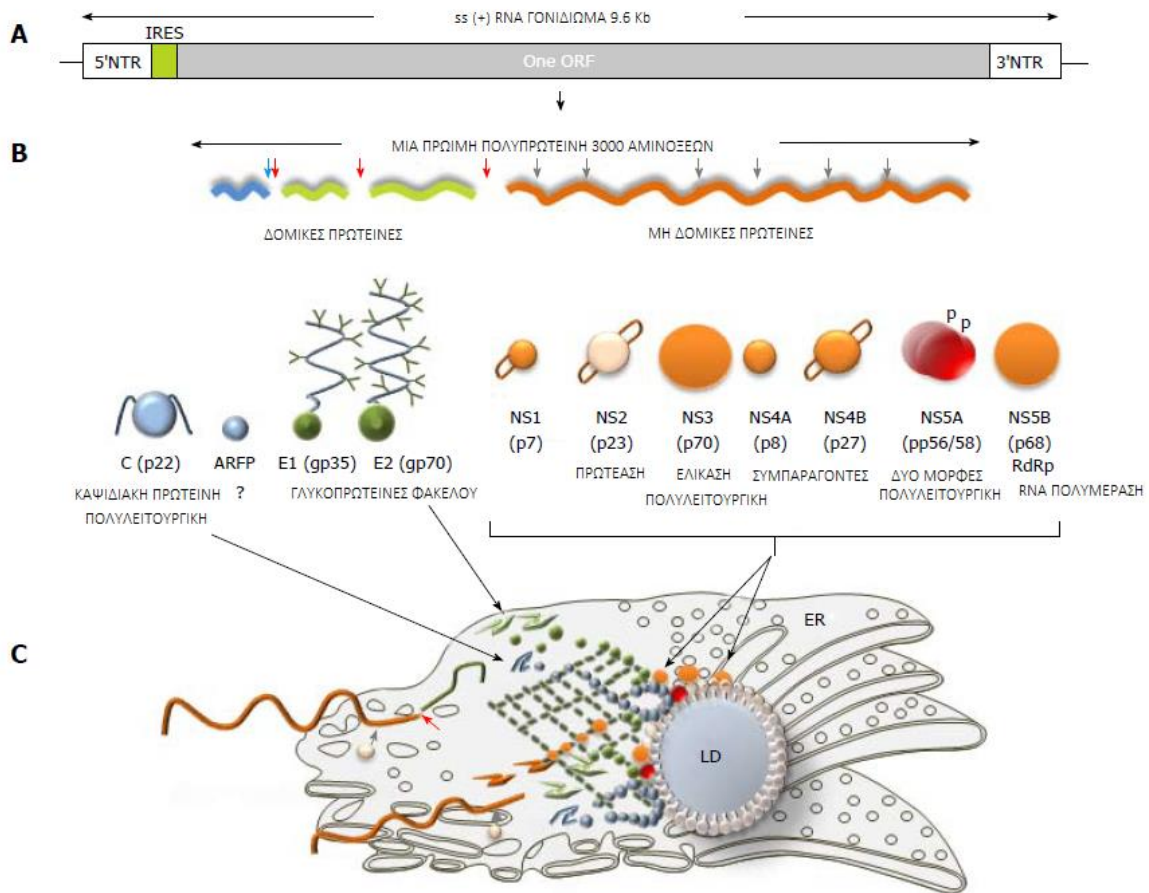
Ο ιός HCV ταξινομήθηκε ως το πρωτότυπο μέλος του γένους *Hepacivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Οι ιοί που ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια διαθέτουν γονιδίωμα το οποίο αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας με παρόμοια οργάνωση. Στο κύτταρο ξενιστή τα γονιδιώματα τους εξυπηρετούν άμεσα ως αγγελιαφόρο RNA. Ο ιός HCV αναπαράγεται κυρίως, αν όχι αποκλειστικά, στα ηπατοκύτταρα των μολυσμένων ασθενών, και η αντιγραφή του βρέθηκε να είναι εξαρτώμενη από το ηπατο-ειδικό *micro*-RNA-122 (miR-122). Το ικό γονιδιωματικό RNA συσχετίζεται με την πρωτεΐνη καψιδίου (Core) για να σχηματιστεί το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο είναι σφαιρικό και περίπου 30 nm σε διάμετρο. Το μολυσματικό ικό σωματίδιο αποτελείται από το νουκλεοκαψίδιο, και περιβάλλεται από ένα φάκελο λιπιδικής σύστασης που προέρχεται από τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δίκτυο (Endoplasmic Reticulum; ER) του ξενιστή. Ο ικός φάκελος περιέχει και τις δύο ικές γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 που εμπλέκονται στην είσοδο του HCV σε ηπατοκύτταρα μέσω ενός αριθμού υποδοχέων των κυττάρων του ξενιστή [54].

#### A.1.5.1.2.1. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

##### A.1.5.1.2.1.1. ΟΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Η HCV πολυπρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το μοναδικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του ικού γονιδιώματος αποτελείται από περίπου 3000 αμινοξέα και υπόκειται συν-μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά σε επεξεργασία από κυτταρικές και ικές πρωτεάσες, προκειμένου να σχηματιστούν οι τρεις δομικές πρωτεΐνες (οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 και η πρωτεΐνη Core), μία πρωτεΐνη διαύλου ιόντων (p7) και έξι μη δομικές πρωτεΐνες (NS2, NS3A, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B) [Εικόνα 1-10,1-11].

Οι δομικές πρωτεΐνες βρίσκονται στο αμινοτελικό-άκρο, ενώ οι μη δομικές πρωτεΐνες βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι δομικές πρωτεΐνες απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με τη δράση κυτταρικών πεπτιδασών, οι οποίες διασπούν αλληλουχίες σήματος που βρίσκονται ανάμεσα στις πρωτεΐνες Core/E1, E1/E2, E2/p7 και p7/NS2.



Εικόνα 1-10: Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C. Μέσω της IRES-διαμεσολαβούμενης μετάφρασης και επεξεργασίας του γονιδιώματος προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη ~3000 αμινοξέων. Στη συνέχεια μέσω πρωτεολύσεων της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι ικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν διάφορους ρόλους στην αναπαραγωγή του ιού. (Vladimir Alexei Morozov et al., 2018)

#### A.1.5.1.2.1.1.1. ΟΙ ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ E1 ΚΑΙ E2

Ο ιός της ηπατίτιδας C εμφανίζεται στην επιφάνεια του δύο γλυκοπρωτεΐνες περιβλήματος, E1 (191-383 α.κ. πολυπρωτεΐνης) και E2 (384-746 α.κ. πολυπρωτεΐνης). Αυτές οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I, περιέχουν βαριά γλυκοζυλιωμένες εξω-περιοχές στο αμινοτελικό άκρο και διαμεμβρανικές περιοχές στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 περιέχουν 8 και 18 κατάλοιπα κυστεΐνης, αντίστοιχα, και έχουν ανιχνευθεί στην επιφάνεια ικών σωματιδίων τόσο ως ομοιοπολικά όσο και ως μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα ετεροδιμερή (E1E2). Η λειτουργία της γλυκοπρωτεΐνης E1 κατά την είσοδο του ιού δεν είναι ακριβώς γνωστή, ενώ ο ρόλος της γλυκοπρωτεΐνης E2 συνίσταται στην προσκόλληση σε υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας. Έχουν ταυτοποιηθεί μεμβρανικές αλληλουχίες των γλυκοπρωτεϊνών E1 και E2 οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ωστόσο, η ακριβής θέση του πεπτιδίου σύντηξης παραμένει ασαφής [55].

#### A.1.5.1.2.1.1.2. Η ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CORE

Η πρωτεΐνη Core θεωρείται μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη, αλλά σε σχέση με τον ιό, η κύρια λειτουργία της είναι η διαμόρφωση του ιικού καψιδίου, το οποίο περιβάλλει και προστατεύει το γονιδιωματικό RNA καθώς ο ιός περνά από το ένα κύτταρο στο άλλο. Η μονομερής, ώριμη μορφή της πρωτεΐνης Core είναι ένα πεπτίδιο μεγέθους 21 kDa, το οποίο διαθέτει δραστικότητα δέσμησης λιπιδίων και RNA. Επειδή η τρισδιάστατη της δομή παραμένει άγνωστη. Πληροφορίες όσον αφορά στη συνολική της διαμόρφωση σχετικά με τις βιοχημικές και βιοφυσικές της ιδιότητες, παρέχονται ως επί το πλείστον από μελέτες που χρησιμοποιούν κυκλικό διχρωισμό, αναλυτική φυγοκέντρηση, και μετρήσεις εγγενούς φθορισμού [56].

Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη Core υιοθετεί μία ελικοειδή διαμόρφωση για σχεδόν το 50% του μεγέθους της και ουσιαστικά συναρμολογείται ως διμερές, παρουσία ήπιων απορρυπαντικών, ενώ αν δεν υπάρχει απορρυπαντικό, σχηματίζει διαλυτά αδρανή συσσωματώματα.

Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Core του HCV είναι αρκετά μεγαλύτερη και περιέχει μια επιπλέον καρβοξυτελική υδρόφοβη περιοχή την καθιστά μοναδική μεταξύ των πρωτεϊνών Core της οικογένειας *Flaviviridae* [57]. Η ώριμη πρωτεΐνη Core του ιού HCV αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές D1 και D2 που διακρίνονται μεταξύ τους λόγω διαφορετικής σύστασης αμινοξικών κατάλοιπων και διαφορετικού προφίλ υδροφοβικότητας. Η περιοχή D1 είναι υδρόφιλη, πλούσια σε βασικά αμινοξέα και καταλαμβάνει τα  $\frac{2}{3}$  του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (117 α.κ.), ενώ η περιοχή D2 περιλαμβάνει το καρβοξυτελικό άκρο και είναι πιο υδρόφοβη. Βάση της κατανομής του φορτίου των αμινοξέων, η περιοχή D1 μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρεις βασικούς τομείς: το βασικό τομέα 1 (BD1, 2-23 α.κ.), το βασικό τομέα 2 (BD2, 38-74 α.κ.) και το βασικό τομέα 3 (BD3, 101-121 α.κ.). Η περιοχή D1 εμπλέκεται κυρίως στη δέσμηση και στον ολιγομερισμό του RNA, διαδικασίες απαραίτητες για το σχηματισμό των ιικών σωματιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία του αμινοτελικού τμήματος της πρωτεΐνης Core (1-82 α.κ.) είναι αρκετή ώστε να ενεργοποιήσει το σχηματισμό σωματιδίων τύπου νουκλεοκαψιδίου *in vitro*, όταν δομημένο RNA προστεθεί σε πρωτεΐνη υψηλής καθαρότητας [57].

Αν και η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης Core είναι ο εγκλεισμός του ιικού γονιδιώματος, έχει επίσης αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με μια ποικιλία κυτταρικών πρωτεϊνών και έχει την ικανότητα να επηρεάσει πολλές λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή όπως τη μεταγραφή γονιδίων, το λιπιδικό μεταβολισμό, την κυτταρική σηματοδότηση και την απόπτωση. Έχει αποδειχθεί ότι η περιοχή D1 περιέχει επίσης ανοσοεπικρατή αντιγονική θέση, η οποία έχει μοτίβο έλικα-βρόχος-έλικα που καλύπτει τα αμινοξέα 2-45. Η περιοχή D2 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης Core με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και με τις μεμβράνες των λιπιδικών σταγονιδίων (Lipid droplets; LDs). Περιέχει δύο αμφίφιλες α-έλικες, α-έλικα I (119-136 α.κ.) και α-έλικα II (148-164 α.κ.), που διαχωρίζονται από έναν υδρόφοβο

βρόχο (HL). Το μοτίβο έλικά-στροφή-έλικά στην περιοχή D2 είναι απαραίτητο για τον αποτελεσματικό εντοπισμό των λιπιδικών σταγονιδίων (LDs). Πρωτεΐνες Core οι οποίες φέρουν μεταλλαγές, και δε μπορούν να έρθουν σε επαφή με λιπιδικά σταγονίδια (LDs) αποικοδομούνται ταχέως από το πρωτεάσωμα, υποδεικνύοντας ότι η περιοχή D2 είναι απαραίτητη για την αναδίπλωση και τη σταθερότητα της ώριμης μορφής της πρωτεΐνης Core.

Επιπλέον, η δέσμευση της πρωτεΐνης Core σε μεμβράνες καθώς και η στερεοδιαμόρφωσή της, μπορεί να ρυθμίζεται με παλμιτοϋλίωση ενός συντηρημένου κατάλοιπου κυστεΐνης (Cys-172) που φαίνεται ότι απαιτείται για το σωστό εντοπισμό της και την παραγωγή μολυσματικών σωματιδίων. Η πρωτεΐνη Core απελευθερώνεται από την πρόδρομη μορφή της πολυπρωτεΐνης του HCV με τη συνδρομή δύο κυτταρικών πρωτεασών. Σε ένα πρώτο στάδιο πραγματοποιείται διάσπαση από μια πεπτιδάση σήματος στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, διαχωρίζοντας την πρωτεΐνη Core από τη γλυκοπρωτεΐνη E1. Στη συνέχεια, η πρόδρομος μορφή της Core των 191 αμινοξέων, υφίστανται επεξεργασία εντός της διαμεμβρανικής περιοχής από μια πεπτιδάση πεπτιδίου σήματος, δίνοντας μια ώριμη πρωτεΐνη 177 αμινοξικών καταλοίπων που μετακινείται προς τα λιπιδικά σταγονίδια (LDs).

Έχουν προταθεί συστήματα υπερέκφρασης όπου παρατηρείται στόχευση της πρωτεΐνης Core σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, μελέτες με το σύστημα κυτταροκαλλιέργειας ηπατίτιδας C (Hepatitis C Cell Culture System, HCVcc) έδειξαν ότι είναι αποκλειστικά εντοπισμένη στην επιφάνεια των LDs και στα μεμβρανώδη διαμερίσματα που σχετίζεται με αυτά [58,59].

#### A.1.5.1.2.1.2. ΤΟ ΚΑΝΑΛΙ ΙΟΝΤΩΝ P7

Η πρωτεΐνη p7 βρίσκεται μεταξύ των πρωτεϊνών E2 και NS2 της ιικής πολυπρωτεΐνης, δηλαδή στο όριο μεταξύ των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, και η ώριμη μορφή της έχει μήκος 63 α.κ.. Σε τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες, η πρωτεΐνη p7 εμφανίζει δραστικότητα διαύλου ιόντων, ρυθμίζοντας τη μεμβρανική διαπερατότητα για την υποστήριξη της εισόδου, της συναρμολόγησης ή και της απελευθέρωσης του ιού. Ανάλογα με τον ικό γονότυπο, η δραστικότητα της p7 μπορεί να παρεμποδιστεί από πολλαπλούς αναστολείς ιοντικών διαύλων.

Έχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές που συνδέονται με μία μικρή κυτταροπλασματική θηλιά, ενώ τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο είναι προσανατολισμένα προς τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Τέλος, η p7 δεν είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού RNA, αλλά είναι σημαντική για την *in vivo* μολυσματικότητα του ιού στο μοντέλο του χιμπαντζή, και για την παραγωγή μολυσματικών HCVcc [60-62].

#### A.1.5.1.2.1.3. ΟΙ ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

##### A.1.5.1.2.1.3.1. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ NS2

Η διάσπαση της πρόδρομου ικής πολυπρωτεΐνης στο σημείο συνδέσεως των NS2/NS3 επιτυγχάνεται με μια πρωτεάση κυστεΐνης που κωδικοποιείται από την NS2 και της οποίας η λειτουργία ενισχύεται σημαντικά από ένα τμήμα του αμινοτελικού άκρου της NS3. Η NS2 πρωτεάση είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 21-23 kDa, η οποία δεν είναι απαραίτητη για τον αναδυπλασιασμό του ικού RNA, αλλά η διάσπαση στο σημείο συνδέσεως των NS2/NS3 θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την απελευθέρωση της πλήρως λειτουργικής NS3 πρωτεΐνης και, κατά συνέπεια, για την προώθηση της αντιγραφής του ικού γονιδιώματος [63]. Η NS2 πρωτεΐνη διαδραματίζει κεντρικό οργανωτικό ρόλο στη συναρμολόγηση του μολυσματικού ιού HCV, διαδικασία που είναι ανεξάρτητη από τη δράση της πρωτεάσης, αλλά μπορεί να περιλαμβάνει ένα σύνθετο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με δομικές και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού.

##### A.1.5.1.2.1.3.2. Η ΠΡΩΤΕΙΝΗ NS3

Η πρωτεΐνη NS3 μεγέθους 69 kDa περιέχει δύο διακριτές ενζυμικές ενεργότητες. Το  $\frac{1}{3}$  του αμινοτελικού της άκρου είναι μία πρωτεάση σερίνης, η οποία διασπά όλες τις υπόλοιπες συνδέσεις μεταξύ των μη δομικών ικών πρωτεϊνών (NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A και NS5A/NS5B) με τη βοήθεια ενός μη ομοιοπολικά συνδεδεμένου συμπαραγόντα, την πρωτεΐνη NS4A [64-67]. Τα  $\frac{2}{3}$  του καρβοξυτελικού της άκρου σχηματίζουν μια RNA ελικάση/NTPράση. Η δράση τόσο της πρωτεάσης όσο και της ελικάσης είναι σημαντικές για την αντιγραφή του HCV.

##### A.1.5.1.2.1.3.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ NS4A ΚΑΙ NS4B

Η πρωτεΐνη NS4A είναι ένα πολυπεπίδιο 54 αμινοξέων που χρησιμεύει ως βασικός συμπαραγόντας για την NS3 πρωτεάση. Στο υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο υπάρχει μια διαμεμβρανική έλικα, η οποία συμβάλλει στην αγκυροβόληση του συμπλέγματος NS3-NS4A σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, θέση όπου λαμβάνουν χώρα η πρωτεολυτική επεξεργασία και η αντιγραφή του ικού RNA. Η κεντρική περιοχή της NS4A είναι υδρόφοβη και απαιτείται για την ενεργοποίηση της NS3. Το όξινο καρβοξυτελικό της-άκρο κατέχει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του HCV μέσω της ρύθμισης της φωσφορυλίωσης της NS5A πρωτεΐνης.

Η πρωτεΐνη NS4B είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 27 kDa, η οποία περιέχει τόσο υδρόφοβες διαμεμβρανικές όσο και αμφίφιλες έλικες. Η πιο γνωστή της λειτουργία είναι η επαγωγή σχηματισμού ενός εξειδικευμένου μεμβρανικού διαμερίσματος που ονομάζεται «μεμβρανώδες



δίκτυο», και που θεωρείται ο χώρος όπου πραγματοποιείται η αναπαραγωγή του ιικού γονιδιώματος. Πρόσφατα, η NS4B πρωτεΐνη έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με το RNA του HCV [66-68].

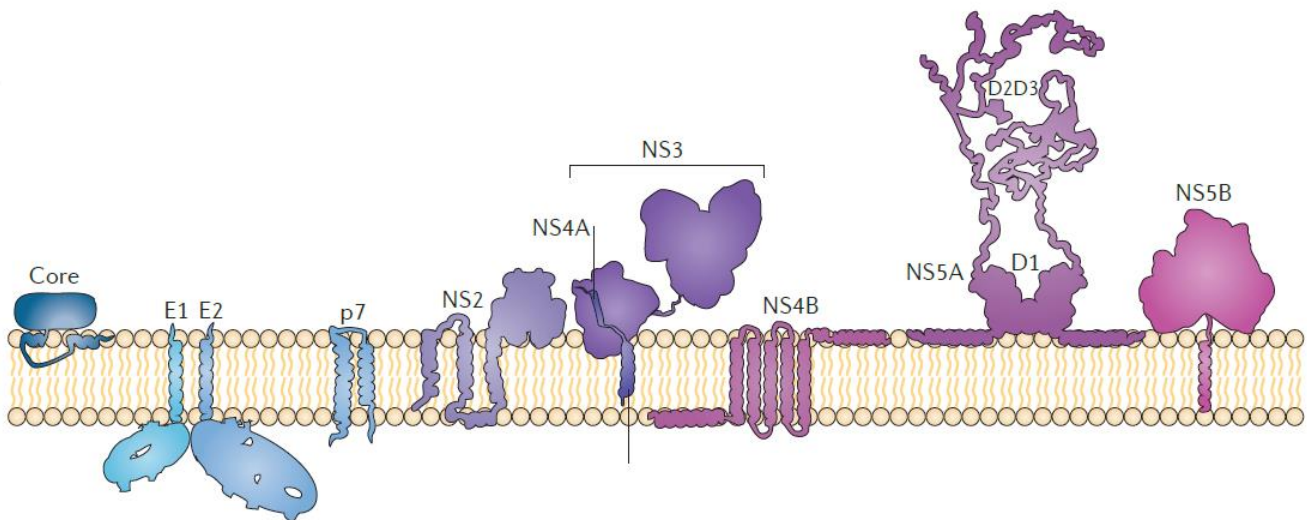
#### A.1.5.1.2.1.3.4. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ NS5A ΚΑΙ NS5B

Η πρωτεΐνη NS5A δεν περιέχει διαμεμβρανικές περιοχές. αντί αυτού, συνδέεται με τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες με μια αμινοτελική  $\alpha$  έλικα που εισέρχεται οριζόντια μέσα στη λιπιδική διπλοστιβάδα. Σε αυτή τη διαμόρφωση, το μήκος της έλικας εκτείνεται κάθετα στις ουρές των φωσφολιπιδίων και η  $\alpha$ -έλικα βρίσκεται σε επαφή μόνο με την κυτοσολική πλευρά της μεμβράνης. Η αμφίφιλη της φύση και ο τρόπος σύνδεσης της αμινοτελικής έλικας με την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι συντηρημένα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών NS5A που κωδικοποιούνται από διάφορα μέλη της οικογένειας των *Flaviviridae*.

Η NS5A αποτελείται από τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές (I, II, III). Στην περιοχή I (1-213 α.κ.), που αποτελεί το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, βρίσκεται όπως προαναφέρθηκε μια αμφιπαθητική  $\alpha$ -έλικα μέσω της οποίας η πρωτεΐνη αγκυροβολεί στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και πιθανά συμμετέχει σε ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του λειτουργικού συμπλέγματος αντιγραφής του ιού [69,70]. Δομικές αναλύσεις της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής I, αποκαλύπτουν ότι η συγκεκριμένη περιοχή διμερίζεται και δημιουργεί δακτύλιο ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα να καθιστά την NS5A μια μεταλλοπρωτεΐνη [71]. Μια σημαντική λειτουργία στην οποία συμμετέχει η NS5A είναι η ανθεκτικότητα του ιού στην ιντερφερόνη μέσω της παρέμβασης της στα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγουν οι ιντερφερόνες και καταστέλλουν τη σύνθεση ιικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, έχει εντοπιστεί περιοχή της πρωτεΐνης (εντός της περιοχής II) που ονομάζεται περιοχή ευαισθησίας-ανθεκτικότητας του ιού στην ιντερφερόνη (Interferon Sensitivity Determining Region; ISDR), η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση R (Protein Kinase R; PKR) και την καταστέλλει. Το μονοπάτι ενεργοποίησης της PKR αποτελεί κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης των ιντερφερονών. Μεταλλάξεις στην περιοχή ISDR συνδέονται με επιτυχή ανοσολογική απόκριση στη θεραπεία με ιντερφερόνη λόγω ενεργοποίησης του μονοπατιού της [72].

Η NS5A φωσφορυλιώνεται και βρίσκεται σε δύο μορφές: μια βασικά φωσφορυλιωμένη μορφή 56 kDa και μια υπερφωσφορυλιωμένη μορφή 58 kDa. Πολλαπλές ενδείξεις καταδεικνύουν έναν σημαντικό ρόλο της φωσφορυλίωσης στην ιική αντιγραφή. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη NS5A, οι οποίες ενισχύουν την ιική αναπαραγωγή, φαίνεται να καταστέλλουν την υπερφωσφορυλίωση της, ενώ και επιλεκτικοί αναστολείς της φωσφορυλίωσης NS5A επάγουν την αντιγραφή του αγρίου τύπου HCV RNA. Η πρωτεΐνη NS5A είναι σημαντική για τη συναρμολόγηση μολυσματικών ιικών σωματιδίων στις κυτταροκαλλιέργειες, και αλληλεπιδρά με αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή του HCV όπως η καρυοφερίνη  $\beta 3$  και η απολιποπρωτεΐνη A1.

Τέλος, η πρωτεΐνη NS5B έχει μέγεθος 68 kDa, και ως μια RNA-εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA Polymerase; RdRp) αποτελεί το καταλυτικό συστατικό του μηχανισμού αντιγραφής του ιικού RNA. Η αντιγραφή του ιού της ηπατίτιδας C περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού RNA αρνητικής πολικότητας, χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα ως μήτρα, και την επακόλουθη σύνθεση των γονιδιωματικών μορίων RNA, θετικής πολικότητας, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα μόρια αρνητικής πολικότητας [73]. Εκτός από την ουσιαστική ενζυμική της δραστικότητα ως RdRp, η πρωτεΐνη NS5B συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας διαμεμβρανικής καρβοξυτελικής περιοχής, σύνδεση που αποδεικνύεται κρίσιμη για την αντιγραφή του HCV. Τέλος, έχει αναφερθεί μια λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της NS5A και της NS5B, και η προτεινόμενη λειτουργία της NS5A είναι, ότι αποτελεί συμπαραγόνα για τη δράση της NS5B. Η NS5B δεσμεύεται επίσης σε αρκετές κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ιική αναπαραγωγή όπως είναι η PRK2 (Protein Kinase C-related Kinase 2) η οποία μπορεί να ρυθμίσει τη φωσφορυλίωση της [74-76].

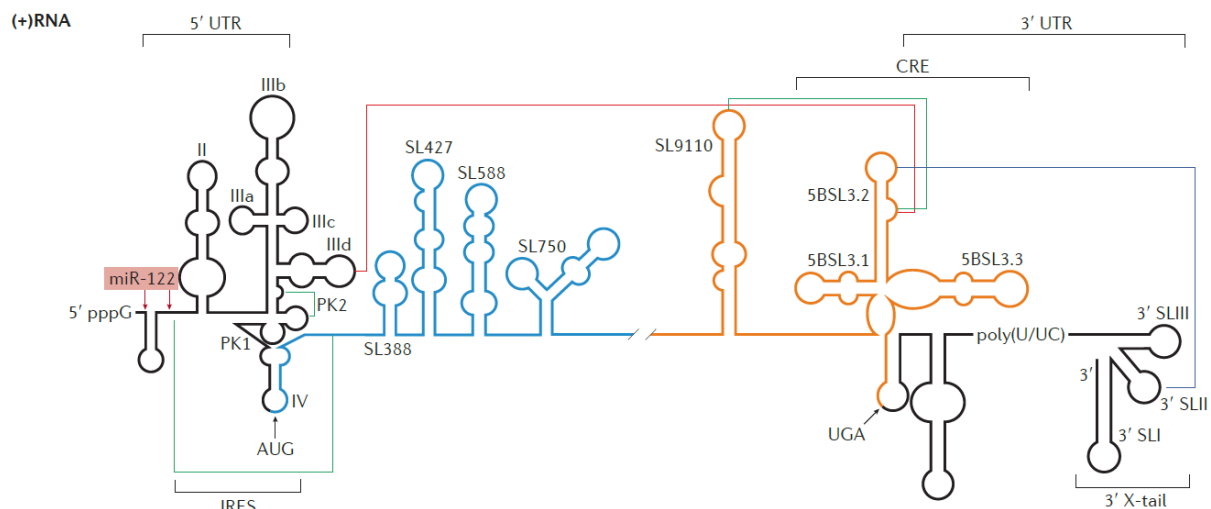


Εικόνα 1-11: Σχηματική απεικόνιση της στερεοδιαμόρφωσης των ιικών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας C. (Bartenschlager & Lohmann et al., 2013)

#### A.1.5.1.2.2. ΟΙ 5' ΚΑΙ 3' ΜΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Όπως έχει προαναφερθεί, το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA μήκους περίπου 9600 νουκλεοτιδίων. Κωδικοποιεί ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο πλαισιώνεται από τις 5' και 3' μη μεταφραστικές περιοχές (UTR).

Η 5' μη μεταφραστική περιοχή (UTR) περιέχει έξι τομείς δευτεροταγούς δομής που ονομάζονται βρόχοι στελέχους I-VI (Stem Loops; SLs). Οι βρόχοι SL-II, III και IV σχηματίζουν μια περιοχή εσωτερικής πρόσδεσης ριβοσωμάτων (Internal Ribosome Entry Site; IRES) που διευκολύνει τη μετάφραση του μη καλυμμένου HCV RNA. Η 5' UTR περιέχει επίσης σημαντικά σήματα αντιγραφής για το RNA αρνητικής πολικότητας. Ένα ηπάτο-ειδικό miRNA (microRNA), miR-122, αναγνωρίστηκε ότι δεσμεύεται σε δύο παράλληλες θέσεις ακριβώς καταρροϊκά του βρόχου SL-I. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του miR-122 και της 5' UTR του HCV ρυθμίζει τον ιική αντιγραφή και μετάφραση. Εκτοπική έκφραση του miR-122 αυξάνει την αντιγραφή του HCV σε μη ηπατικά κύτταρα [77].



Εικόνα 1-12: Δευτεροταγής δομή RNA εντός του μονόκλωνου εντός του μονόκλωνου γονιδιώματος ιού ηπατίτιδας C (HCV) θετικού κλώνου RNA (+) RNA, όπου απεικονίζονται οι μικρές, αλλά με υψηλή δόμηση 5' και 3' μη μεταφραστικές περιοχές (UTRs, μαύρες) οι οποίες πλευρίζουν τα άκρα του εσωτερικού μακρού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί την ιική πολυπρωτεΐνη. (You Li et al., 2015)

Η 3'-UTR έχει τριμερή δομή και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του HCV. Αρχίζει με μια μικρή μεταβλητή περιοχή, ακολουθούμενη από μια polyU/UC ακολουθία πλούσια σε πυριμιδίνες και τέλος καταλήγει σε μια συντηρημένη ουρά μήκους 98 νουκλεοτιδίων (98X). Διαφορετικοί γονότυποι διαφέρουν στην αλληλουχία της μεταβλητής περιοχής, αλλά γενικά, στελέχη του ίδιου γονότυπου είναι αρκετά καλά συντηρημένα. Το μήκος της οδού polyU/UC ακολουθίας ποικίλλει σημαντικά και σε αυτή οφείλεται η

διαφορά μήκους που παρατηρείται στην 3'-UTR. Η polyU/UC ακολουθία μαζί με το 5' τριφωσφορικό του γονιδιωματικού RNA, αποτελεί το σημαντικότερο σχετιζόμενο με τον HCV μοριακό πρότυπο που αναγνωρίζεται από τον έμφυτο υποδοχέα ανοσίας RIG-I (Retinoic-Acid-inducible Gene-1; RIG-I) [78]. Η 98X ουρά διαθέτει τρεις εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές, τις SL1, SL2 και SL3, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του RNA. Σχετικά πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι πρωτεΐνες οι οποίες διμερίζονται, αλληλεπιδρούν τόσο με την 98X ουρά όσο και με την περιοχή IRES, φέρνοντάς τες κοντά, ώστε η 98X ουρά να συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής, μιας και αποτελεί τη θέση εισόδου της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του RNA του ιού. Τέλος, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Core, συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης, αυξάνοντας τα επίπεδά της 3-5 φορές [Εικόνα 1-12] [77].

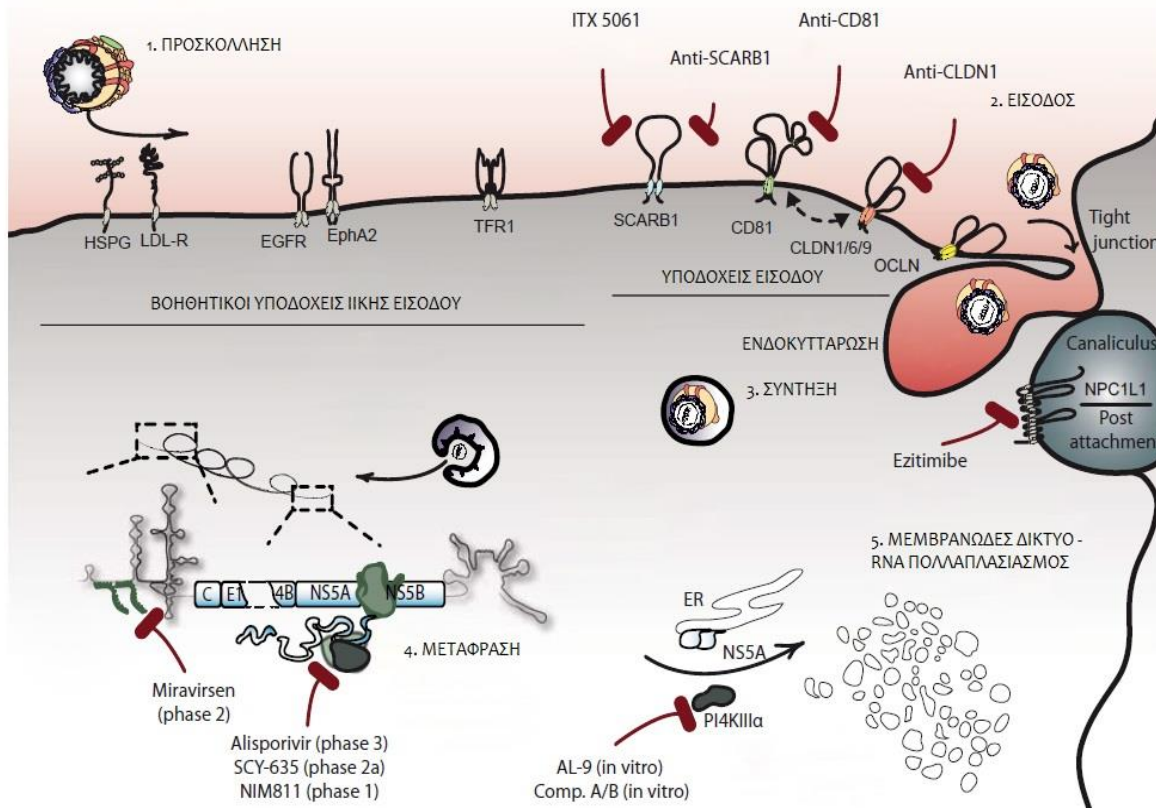
#### A.1.5.1.3. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Ο HCV είναι ένας μη-λυτικός ιός, ο οποίος μολύνει κύτταρα, στο εσωτερικό των οποίων πολλαπλασιάζεται και στη συνέχεια απελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό χώρο χωρίς να διαταραχθεί η ακεραιότητα των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής το, ο ιός HCV οικειοποιείται διάφορους κυτταρικούς βιολογικούς μηχανισμούς, οι οποίοι σχετίζονται με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης μέχρι τα εκκριτικά μονοπάτια απελευθέρωσης.

Ο κύκλος ζωής του HCV μπορεί να διαχωριστεί σε τέσσερα στάδια: (1) είσοδος του ιού στο κύτταρο, (2) μετάφραση ιικού γονιδιώματος και επεξεργασία ιικής πολυπρωτεΐνης, (3) αντιγραφή γονιδιώματος, και (4) συναρμολόγηση και απελευθέρωση ιοσωματιδίων από το κύτταρο ξενιστή [Εικόνα 1-13]. Η είσοδος του HCV στο κύτταρο είναι μια σύνθετη πολυσταδιακή διαδικασία που απαιτεί αρκετές πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται τέσσερις κυτταρικοί υποδοχείς οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την επιτυχή πρόσδεση του ιού στην κυτταρική μεμβράνη: ενός υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας που δεσμεύεται με υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (HDL-C), του SCARB1 (Scavenger Receptor Class B type I), τους υποδοχείς CD81, Claudin-1 (CLDN1) και Occludin (OCLN) [79-83].

Μελέτες κινητικής και απεικόνισης υποδεικνύουν ότι η είσοδος του HCV είναι ένας χρονικά και χωρικά στενά ελεγχόμενος μηχανισμός, δηλαδή οι παράγοντες εισόδου πιθανόν να χρησιμοποιούνται με συγκεκριμένη ιεραρχία [81,84-86], και σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά μεμβρανικά διαμερίσματα. Εκτός από τους προαναφερόμενους κυτταρικούς υποδοχείς οι οποίοι διαμεσολαβούν στην είσοδο του HCV, υπάρχουν και άλλα κυτταρικά μόρια που υποστηρίζουν την ιική εισβολή. Αυτά περιλαμβάνουν παράγοντες προσκόλλησης όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες, υποδοχείς πρόσδεσης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL-Rs), υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και τον υποδοχέα τρανσφερίνης 1. Μετά τη δέσμευση του στην επιφάνεια των κυττάρων και μετά από συντονισμένη αλληλεπίδραση με τους

παράγοντες εισόδου, ο HCV απορροφάται μέσω κλαθρινο-διαμεσολαβούμενη ενδοκυττάρωσης. Μέσα στο περιβάλλον χαμηλού pH των πρώιμων ενδοσωμάτων, ο φάκελος του HCV συντήκεται με τη μεμβράνη τους [87-90].



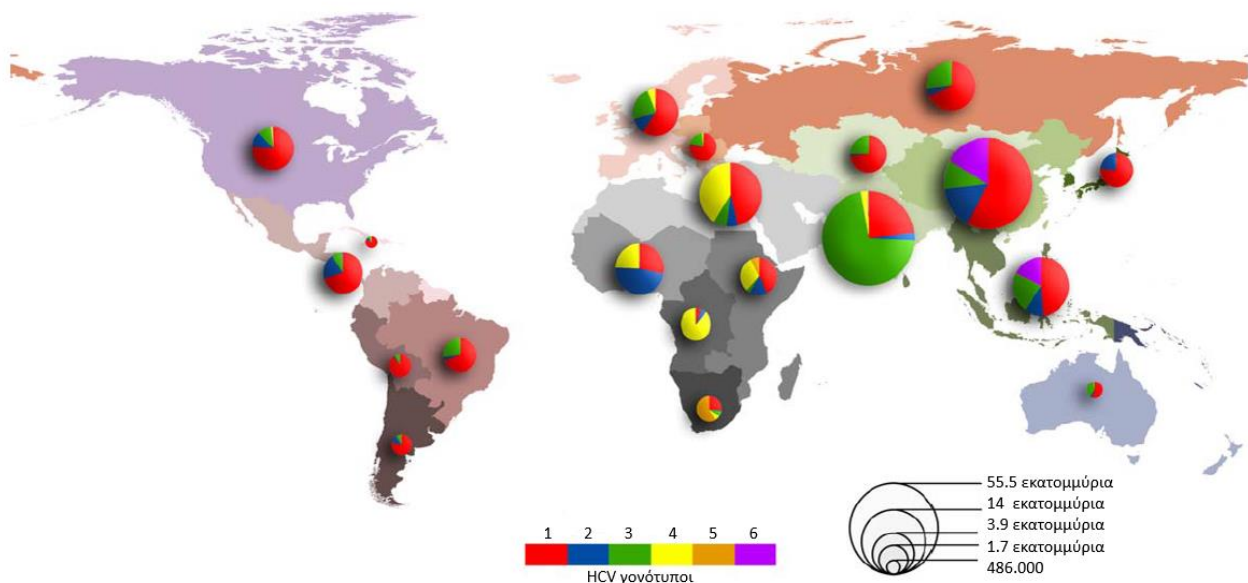
Εικόνα 1-13: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C. Ο κύκλος ζωής του HCV είναι όμοιος με αυτό όλων των μελών της οικογένειας *Flaviviridae*. Αρχικά το ιικό σωματίδιο αλληλεπιδρά με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου (1) και υπόκειται σε ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Μετά από σύντηξη των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου με τη μεμβράνη, το ιικό γονιδίωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται στα ριβοσώματα, παράγοντας μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη (2). Η πολυπρωτεΐνη έπειτα πρωτεολύεται σε 10 ώριμες πρωτεΐνες (3) που συνδέονται σε μια μεμβρανική δομή η οποία μοιάζει με το ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά παράγεται από τον ιό και ονομάζεται μεμβρανώδες δίκτυο (4). Οι ώριμες πρωτεΐνες του HCV αντιγράφουν το γονιδιωματικό RNA μέσω ενός αντιγραφικού ενδιάμεσου μορίου αρνητικής πολικότητας για την παραγωγή απογόνων-θυγατρικών μορίων RNA (5). Ένα μέρος από αυτά τα παραχθέντα μόρια πακετάρεται σε καψίδια και συνδέονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του HCV, σχηματίζοντας νέα ιικά σωματίδια που εκβλαστάνουν στο κυτταρόπλασμα (6). Τα ιικά σωματίδια τέλος, ακολουθούν το κυτταρικό εκκριτικό μονοπάτι και απελευθερώνονται στον εξωκυτταρικό χώρο. (Gisa Gerold & Thomas Pietschmann, 2015)

Στο κυτοσόλιο το καψίδιο του HCV που αποτελείται από την πρωτεΐνη Core, αποσυντίθεται και απελευθερώνει το γονιδίωμα του ολοκληρώνοντας έτσι τη διαδικασία εισόδου. Το δεύτερο βήμα του κύκλου ζωής του HCV λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, όπου το γονιδίωμα RNA συν-κλώνου μεταφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω ριβοσωμάτων του ξενιστή σε μια

πολυπρωτεΐνη. Η πολυπρωτεΐνη υποβάλλεται σε επεξεργασία από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες σε δομικές (E1, E2, Core) και μη δομικές πρωτεΐνες (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Η RNA πολυμεράση NS5B στη συνέχεια ενισχύει το ιικό γονιδίωμα μέσω ενός ενδιάμεσου αρνητικής πολικότητας κλώνου RNA. Ο ιικός πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα σε ειδικό διαμέρισμα στο κυτοσόλιο, που ονομάζεται μεμβρανώδες δίκτυο, του οποίου ο σχηματισμός επάγεται από τον ιό. Αρχικά, το RNA πακετάρεται σε καψίδια σε στενή γειτνίαση με λιπιδικά σταγονίδια (LDs), που είναι οργανίδια αποθήκευσης κυτοσολικών λιπιδίων. Στη συνέχεια, τα ιικά καψίδια εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αποκτώντας έτσι ένα φάκελο με διμερή E1E2 ικών γλυκοπρωτεϊνών και στη συνέχεια ενσωματώνονται στην κυτταρική λιπιδική διπλοστιβάδα. Ο ιός HCV εξέρχεται από το ηπατικό κύτταρο χρησιμοποιώντας το εκκριτικό μονοπάτι των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDLs) [90-92].

#### A.1.5.1.4. Η ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C αποτελεί ένα κλιμακούμενο παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Ο ιός HCV είναι ενδημικός σε πολλές χώρες και αναμφισβήτητα θεωρείται ένας απειλητικός παράγοντας για την κοινωνία και επιζήμιος για τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της νόσου, η χρονιότητα, την καθιστά σημαντικό πρόβλημα, καθότι είναι υψηλά τα ποσοστά εξέλιξης της σε ηπατική κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ). Η κατανομή της μόλυνσης από HCV είναι εξαιρετικά μεταβλητή [Εικόνα 1-14], με επιπολασμό σε μεμονωμένες χώρες που κυμαίνεται από <1% έως >10%. Υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης έχουν αναφερθεί στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή, και



Εικόνα 1-14: Παγκόσμια πληθυσμιακή κατανομή γονοτύπων ιού ηπατίτιδας C.

χαμηλότερα στην Αμερική, Αυστραλία και Βόρεια και Δυτική Ευρώπη. Στην Αφρική, η υψηλότερη συχνότητα της μόλυνσης από HCV έχει αναφερθεί στην Αίγυπτο και στο Καμερούν (>10%) [93].

Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός της νόσου στο γενικό πληθυσμό είναι 1.9%, δηλαδή περίπου 200.000 άτομα έχουν μολυνθεί από τον ιό, ενώ τα ποσοστά κυμαίνονται μεταξύ 0.6% και 7.5% ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Αναφορικά με τη γεωγραφική κατανομή των κρουσμάτων ηπατίτιδας στον ελλαδικό χώρο, τα υψηλότερα ποσοστά καταγράφονται στη Βόρεια Ελλάδα και κυρίως στη Μακεδονία, τη Θράκη και τη Θεσσαλία, λόγω της αυξημένης παρουσίας στις παραπάνω περιοχές ειδικών πληθυσμών (αθίγγανοι, μουσουλμάνοι, οικονομικοί μετανάστες). Η αύξηση της μέσης ετήσιας επίπτωσης στο νομό της Αττικής συνδέεται: α) με τον αυξημένο αριθμό εξειδικευμένων ηπατολογικών μονάδων, β) με την εξειδικευμένη πείρα των επαγγελματιών υγείας στις λοιμώξεις, και γ) με την αυξημένη μετακίνηση λαθρομεταναστών τα τελευταία χρόνια στην Αθήνα [94].

#### A.1.5.1.5. Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ Η ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

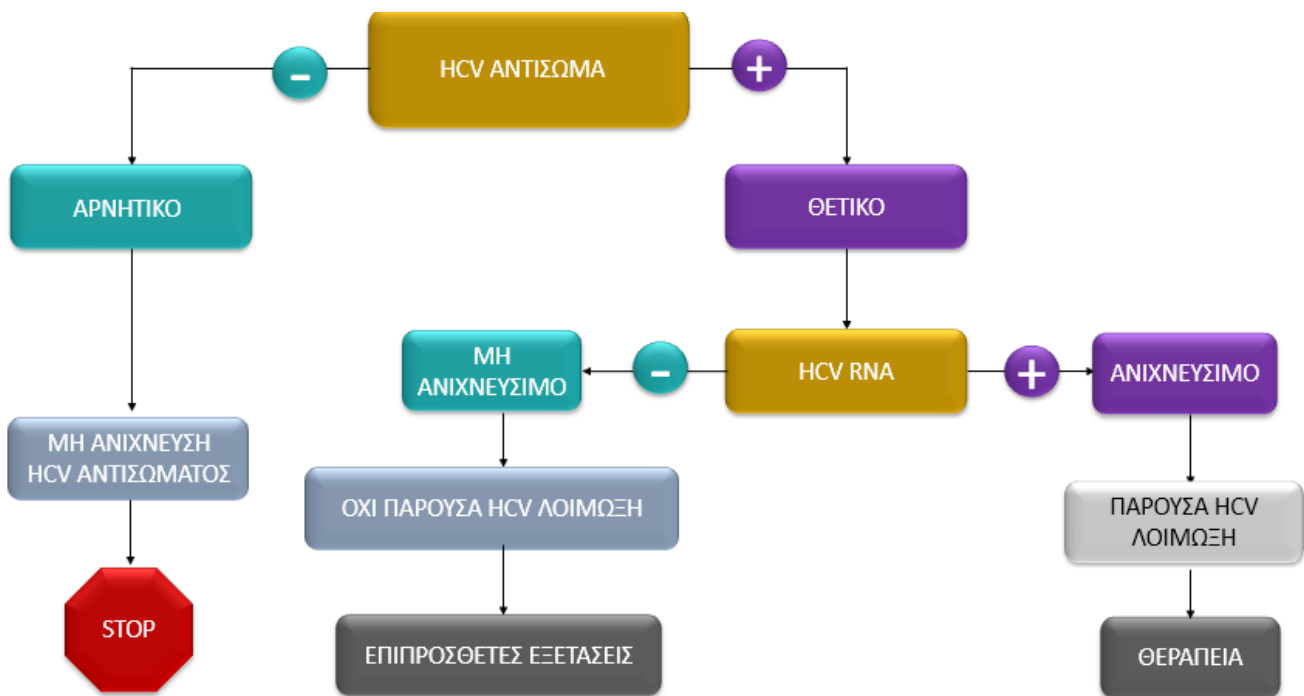
Η μόλυνση με HCV προκαλεί αρχικά οξεία ηπατίτιδα. Ο χρόνος επώασης της οξείας ηπατίτιδας C είναι 30 μέχρι 90 ημέρες. Η πλειοψηφία (75-80%) όμως των ασθενών με οξεία HCV λοίμωξη δεν έχουν κανένα σύμπτωμα και συνεπώς η οξεία ηπατίτιδα C δε διαγιγνώσκεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Κατά την οξεία ηπατίτιδα C, το RNA του ιού ανιχνεύεται στο αίμα εντός 1-3 εβδομάδων μετά την έκθεση, ενώ διαπιστώνεται και αύξηση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων, της αμινοτρανσφοράς του ασπαρτικού οξέος (AST) και της αμινοτρανσφοράς της αλανίνης (ALT) στο αίμα.



Εικόνα 1-15: Φυσική εξέλιξη λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας C. ΗΚΚ: ηπατοκυτταρικός καρκίνος, OLT: ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος.

Αντισώματα έναντι του HCV (αντι-HCV) ανιχνεύονται σε 50-70% των περιπτώσεων κατά την έναρξη των συμπτωμάτων και σε 90% των περιπτώσεων μετά από 3 μήνες [95]. Αναπόφευκτη συνέπεια της αδυναμίας έγκαιρης διάγνωσης της νόσου λόγω έλλειψης συμπτωμάτων, αποτελεί η ανάπτυξη χρόνιας HCV λοίμωξης. Ο συνδυασμός της απουσίας ισχυρής ανοσολογικής απάντησης (κυρίως μέσω των T-λεμφοκυττάρων) και της μεγάλης συχνότητας εμφάνισης μεταλλαγών του HCV ευνοούν την υψηλή συχνότητα μετάπτωσης της οξείας σε χρόνια λοίμωξη [Εικόνα 1-15].

Η διάγνωση της οξείας και της χρόνιας HCV λοίμωξης βασίζεται στον προσδιορισμό των αντισωμάτων έναντι δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του ιού (ορολογική διάγνωση) και στην απομόνωση των νουκλεϊνικών οξέων του (HCV RNA ιαμιάς) με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) στον ορό (ιολογική διάγνωση) [Εικόνα 1-16]. Ο μέσος χρόνος επώασης της οξείας ηπατίτιδας C είναι 6-12 εβδομάδες. Το κλινικό της φάσμα είναι ευρύ και συχνά ακολουθεί υποκλινική πορεία [96].



Εικόνα 1-16: Αλγόριθμος διάγνωσης της HCV λοίμωξης. (Fouzia Naseer et al., 2016)

Η διάγνωση της οξείας ηπατίτιδας C βασίζεται στην οροαναστροφή [97,98], δηλαδή στην ανίχνευση αντισωμάτων (αντι-HCV) σε άτομα όπου δεν προϋπήρχαν. Όταν αυτό δεν είναι σαφές, η διάγνωση βασίζεται στη συνυπάρχουσα μεγάλη αύξηση των αμινοτρανσφερασών (>10πλάσιο της ανώτερης φυσιολογικής τιμής) και στην ιαμιά. Άτομα με θετικά αντι-HCV πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία HCV RNA ιαμιάς. Η παρουσία της ιαμιάς είναι το μοναδικό στοιχείο που διαφοροποιεί την παλαιά ιαθείσα λοίμωξη C από την ενεργό [99].



#### A.1.5.1.6. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

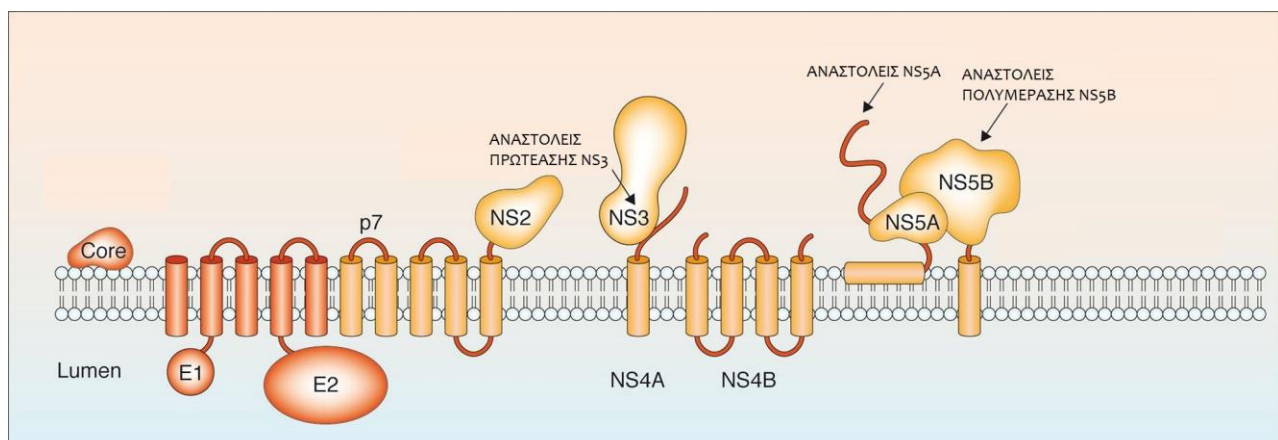
Η θεραπεία για την ηπατίτιδα C περιλαμβάνει συνδυασμό φαρμάκων και εξαρτάται από πολλούς ατομικούς παράγοντες του ασθενή, όπως: από τον γονότυπο της ηπατίτιδας C (παγκοσμίως υπάρχουν 7 γονότυποι – στην Ελλάδα επικρατούν οι γονότυποι 1-4), το ιικό φορτίο, το στάδιο της λοίμωξης (οξεία HCV λοίμωξη και χρόνια HCV λοίμωξη), τις προηγούμενες θεραπείες που έχει κάνει ο ασθενής για την ηπατίτιδα C, την κατάσταση του ήπατος και το βαθμό ηπατικής βλάβης, την ανοχή στα φάρμακα και στις παρενέργειές τους, τις άλλες πιθανές ασθένειες που έχει, και εάν ο ασθενής είναι σε αναμονή για μεταμόσχευση ή έχει ήδη προβεί σε μεταμόσχευση ήπατος. Ακολουθώντας τις ιατρικές οδηγίες σχετικά με την κατάλληλη θεραπευτική αγωγή ο ιός μπορεί να εκριζωθεί και ο ασθενής θεραπεύεται πλήρως σε διάστημα λίγων μηνών.

Αυτή τη στιγμή στην Ελλάδα υπάρχουν διαθέσιμες δύο κατηγορίες θεραπειών:

I. Αντικα Άμεσης Δράσης φάρμακα (Direct-acting Antivirals; DAAs) τα οποία είναι διαθέσιμα από το 2014 [Εικόνα 1-17].

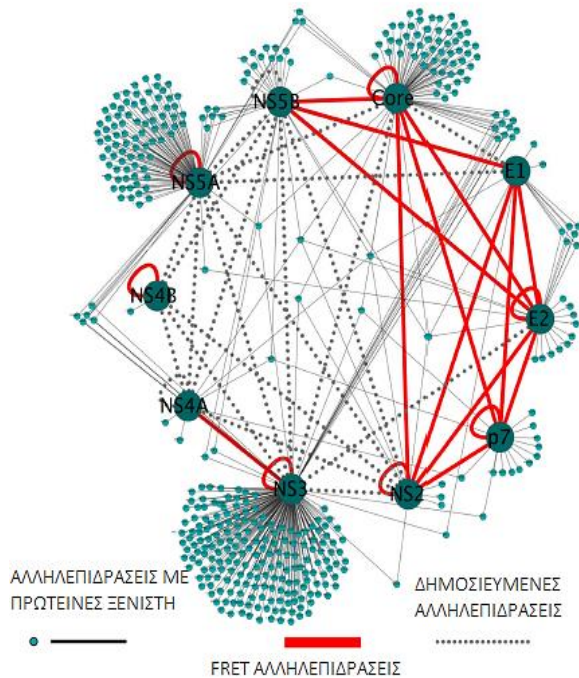
II. Οι παλιές θεραπείες (πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη και ριμπαβιρίνη).

Οι σύγχρονες θεραπείες έχουν ελάχιστες έως και καθόλου παρενέργειες και η διάρκεια της θεραπείας ποικίλλει από 8, 12 ή 24 εβδομάδες ανάλογα με τα ατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Τα νέα φάρμακα έχουν χαρακτηριστεί επαναστατικά, και αλλάζουν ριζικά τον τρόπο αντιμετώπισης της Ηπατίτιδας C καθώς εκριζώνουν τον ιό σε ποσοστό που αγγίζει το 100%. Μάλιστα, τα νέα φάρμακα μπορούν να δοθούν και σε ασθενείς που μέχρι τώρα δε μπορούσαν να λάβουν καμία άλλη θεραπεία, και κυρίως στους πολύ βαριά ασθενείς, ασθενείς με προχωρημένη κίρρωση, στους οποίους η μόνη ελπίδα ήταν η μεταμόσχευση [100].



Εικόνα 1-17: Κατηγορίες σύγχρονων αντιικών φαρμάκων κατά της ηπατίτιδας C. (Thomas McQuaid et al., 2015)

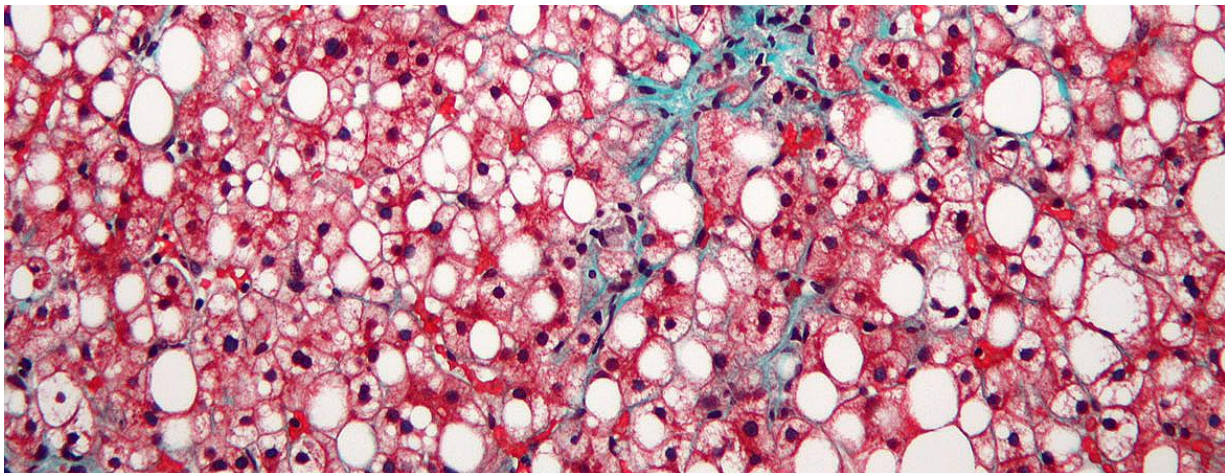
#### A.1.5.1.7. ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΣΤΟ ΛΙΠΙΔΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ



Εικόνα 1-18: Πολυπλοκότητα δικτύου αλληλεπιδράσεων ικών HCV πρωτεϊνών και πρωτεϊνών ξενιστή. (Nicole Hagen et al., 2014)

Η μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C έχει συσχετιστεί άμεσα με διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων. Το ηπατικό αλλά και γενικότερα το συστηματικό οξειδωτικό στρες διαδραματίζουν ρόλο-κλειδί στην ανάπτυξη ηπατικής βλάβης και μεταβολικών διαταραχών. Εκτός από τη χρόνια φλεγμονή, ο ιός ειδικά επάγει τη δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) μέσω πολλαπλών μηχανισμών που εμπλέκουν τη δομική πρωτεΐνη Core και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες [Εικόνα 1-18]. Το αποτέλεσμα είναι η απώλεια ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, η οποία προκαλεί οξειδωτική βλάβη στα ηπατικά κύτταρα και παρεμβολή στους μηχανισμούς επισκευής DNA. Τα ηπατοκύτταρα καθίστανται

πιο ευαίσθητα σε μεταλλάξεις, ενώ ευνοείται η ίνωση διαμέσου του αυξημένου πολλαπλασιασμού των αστεροειδών ηπατικών κύτταρων. Η παραγωγή ROS μπορεί επίσης να εμπλέκεται στην οξείδωση μεμβρανικών λιπιδίων και δομικών πρωτεϊνών, όπως εκείνων που εμπλέκονται στη διακίνηση λιπιδίων, εμποδίζοντας την έκκριση πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (VLDLs) με αποτέλεσμα την εμφάνιση στεάτωσης [101].



Εικόνα 1-19: Ιστοπαθολογική εικόνα στεάτωσης λόγω ηπατίτιδας C. (Baumeler Stephan et al., 2019)

Η στεάτωση είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό της χρόνιας ηπατίτιδας C, με αναφερόμενο επιπολασμό 40-80% [Εικόνα 1-19]. Οι ακριβείς μηχανισμοί της επαγόμενης από HCV στεάτωσης δεν είναι απολύτως κατανοητοί. Η πρωτεΐνη Core έχει την ικανότητα να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων σύνθεσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων, και παράλληλα ευνοεί την ενδοκυτταροπλασματική συσσώρευση λιπιδίων, καταστέλλοντας τους μηχανισμούς έκκρισης και αποδόμησης τους. Ολόκληρος ο κύκλος ζωής του HCV βρίσκεται σε στενή επαφή με το μεταβολισμό των λιπιδίων. Η είσοδος του HCV μπορεί να διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL-R). Η πρωτεΐνη Core τροποποιεί την έκκριση των VLDLs. Ο ιός εκτρέπει τις οδούς συναρμολόγησης και έκκρισης των VLDLs του ξενιστή για να εξασφαλίσει την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ικών του σωματιδίων. Κυκλοφορούν συνδεδεμένα με χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες σχηματίζοντας λιποϊσσωματίδια, τα οποία διευκολύνουν την επαναπρόσληψη τους από ηπατοκύτταρα μέσω της πρόσδεσης στον υποδοχέα LDL-R.

Επιπλέον, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η επαγόμενη από τον HCV υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης, της Seirin, η οποία εμπλέκεται στην ωρίμανση των λιπιδικών σταγονιδίων (LDs) -η επιφάνεια των οποίων είναι η βάση της έναρξης της ικής συναρμολόγησης- μειώνει την απελευθέρωση των ικών σωματιδίων και προκαλεί στεάτωση. Εάν επιβεβαιωθούν οι ενδείξεις αυτές, «ιολογική στεάτωση» θα θεωρηθεί ένας αμυντικός μηχανισμός. Η συσσώρευση λιπαρών οξέων με τη μορφή τριγλυκεριδίων μπορεί στην πραγματικότητα να αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό διαμέσου του οποίου καθίστανται μη διαθέσιμα για τη δημιουργία συμπλόκων αντιγραφής με τον ιό HCV. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την απόδειξη ότι, όταν ο βαθμός στεατώσεως συσχετίζεται με τα επίπεδα αναπαραγωγής του ιού, η αντιγραφή του ιού προηγείται της συσσώρευσης λίπους και όχι αντιστρόφως. Αντίθετα, σε ασθενείς με μεταβολικά σύνδρομα, των οποίων η στεάτωση προηγείται της ικής μόλυνσης, το επίπεδο της αντιγραφής του ιού δε συσχετίζεται με τη σοβαρότητα της στεάτωσης του ήπατος.

Η συσσώρευση τριγλυκεριδίων και η ασύμμετρη έκκριση λιπιδίων από τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα έχουν σαν αποτέλεσμα ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C να εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και φαινοτυπικές ομοιότητες με γνωστή υπο-β-λιποπρωτεΐναιμία. Συμπερασματικά, ο ιός HCV μπορεί να επάγει δύο τύπους στεάτωσης, το μεταβολικό και τον ικό, με διαφορετικούς παθογενετικούς μηχανισμούς, που συχνά επικαλύπτονται [101].

## ΣΤΟΧΟΣ

Ο επιγενετικός παράγοντας LSD-1 περιεγράφηκε από τους *Shi et al.*, το 2004 ως η πρώτη απομεθυλάση ιστόνης, επιβεβαιώνοντας ότι η μεθυλίωση ιστόνης είναι μια αναστρέψιμη επιγενετική τροποποίηση. Διάφορες επιστημονικές μελέτες δείχνουν ότι η LSD-1 κατέχει ενεργό ρόλο σε πολλές κικές διεργασίες.

Η πρωτεΐνη LSD-1 (Lysine-specific Demethylase 1), είναι ένα ένζυμο με πυρηνική εντόπιση, το οποίο καταλύει την απομάκρυνση μεθυλομάδων από ιστονικά και μη ιστονικά κατάλοιπα λυσίνης, επηρεάζοντας έτσι την έκφραση μορίων που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Έχει σπουδαίο βιολογικό ρόλο, καθώς συμμετέχει στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού, καθώς και στην απόκριση σε βλάβες του DNA.

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ένας μικρός, με περίβλημα, μονόκλωνος, θετικός ιός RNA. Ανήκει στο γένος *hepacivirus* στην οικογένεια *Flaviviridae*, και μπορεί να προκαλέσει οξεία ή χρόνια αιματογενή λοίμωξη. Καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του βρισκόμενος σε εξάρτηση από τα επίπεδα συγκέντρωσης των λιπιδίων στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων, έχει αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να χρησιμοποιεί τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό.

Με βάση τα παραπάνω η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως στόχο να μελετήσει τα ακόλουθα ερωτήματα και την ύπαρξη ενδιαφερουσών επιστημονικών συσχετίσεων:

- Ο ιός της ηπατίτιδας C στα πλαίσια «εκμετάλλευσής» του λιπιδικού μεταβολισμού για να εξασφαλίσει ικανοποιητικά τον αναδιπλασιασμό του, επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της LSD-1 που επίσης εμπλέκεται σε αυτόν; Συμπεριλαμβάνεται δηλαδή στα βιολογικά μόρια-στόχους του; και αν ναι, με ποιο μηχανισμό;
- Αντίστροφα η πρωτεΐνη LSD-1 έχει την ικανότητα να διαμεσολαβεί στη ρύθμιση του αναδιπλασιασμού του ιού HCV, και αν ναι, με ποιό τρόπο; Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος αντικής θεραπείας;
- Σε συνθήκες υπερέκφρασης της LSD-1 διαταράσσονται οι «ισορροπίες» οι οποίες υπάρχουν μεταξύ του ιού HCV και της LSD-1, με ποιό τρόπο και γιατί;

## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### B. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

#### B.1. ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑΣ

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση των κυτταρικών καλλιιεργειών αλλά και για την αξιοπιστία των πειραματικών αποτελεσμάτων, θεωρείται η διατήρηση στείρων συνθηκών. Οι κυτταροκαλλιέργειες διεξάγονται σε ειδικό χώρο, που ονομάζεται θάλαμος νηματώδους ροής. Εντός του θαλάμου βρίσκεται λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας η οποία τίθεται σε λειτουργία πριν και μετά την εργασία για κάποιες ώρες, ενώ πριν από κάθε χειρισμό πραγματοποιείται τοπική αποστείρωση των επιφανειών με διάλυμα αιθανόλης 70%. Η διαχείριση των φιαλών και των τρυβλίων λαμβάνει χώρα εντός αυτού του κλειστού συστήματος φιλτραρισμένου αέρα που εμποδίζει την είσοδο μικροοργανισμών στον θάλαμο αλλά και την έξοδο από αυτόν. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται η προστασία τόσο των καλλιιεργειών από πιθανή μόλυνση (πχ. μυκόπλασμα) όσο και της υγείας του χειριστή. Η αποστείρωση των υλικών επιτυγχάνεται με αποστείρωση σε υγρό κλίβανο για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 121°C και υπό πίεση 15 atm. Υγρά υλικά τα οποία καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες αποστειρώνονται με κατάλληλα φίλτρα (Millipore 0.22mm).

#### B.2. ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (ΚΛΙΒΑΝΟΣ)

Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub> και υγρασίας. Ο καθαρισμός και η διατήρηση της στείροτητας του θαλάμου επιτυγχάνεται με την ακόλουθη διαδικασία: παραμονή διαλύματος φορμόλης στα τοιχώματα του θαλάμου για 24ώρες, ακολουθεί 24ώρη παραμονή διαλύματος χλωρίνης ενώ τελικά τα τοιχώματα ξεπλένονται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Για λίγες ώρες πριν από τη λειτουργία εφαρμόζεται υπεριώδης ακτινοβολία από την εσωτερική λάμπα του θαλάμου. Μετά το πέρας των αποστειρωτικών διαδικασιών φροντίζουμε να αποκαταστήσουμε τις κατάλληλες συνθήκες [ισορροπία-24 ωρών-θερμοκρασίας (37°C), αερίων (5% CO<sub>2</sub>) και υγρασίας], προκειμένου να επιάσουμε τις καλλιιεργειες στο θάλαμο.

### B.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

#### B.3.1. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κατά το σχεδιασμό ενός θρεπτικού υλικού μέσου, ο απώτερος στόχος είναι η προσομοίωση του φυσικού περιβάλλοντος ανάπτυξης των κυττάρων. Οι φαρμακευτικές εταιρίες έχουν παρασκευάσει ποικιλία θρεπτικών μέσων ανάλογα με το είδος των κυττάρων που καλλιεργούνται. Για την προστασία των καλλιεργειών από την ανάπτυξη βακτηρίων, προστίθενται στο θρεπτικό μέσο κατά κανόνα ένα αντιβιοτικό κατά των *Gram* θετικών βακτηρίων όπως είναι η πενικιλίνη, και ένα αντιβιοτικό κατά των *Gram* αρνητικών βακτηρίων όπως είναι η στρεπτομυκίνη. Το μέσο εμπλουτίζεται απαραίτητως με ορό, ο οποίος έχει τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο στους 56°C για 20 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η απενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Τα θρεπτικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών είναι το *DMEM Media-High Glucose* και *DMEM Media-Low Glucose Gibco* της *Thermofisher Scientific*.

Το *DMEM (DuLBecco's Modified Eagle Medium)* θεωρείται ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βασικό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών κυττάρων θηλαστικών. Κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν επιτυχώς σε *DMEM* περιλαμβάνουν πρωτογενείς ινοβλάστες, νευρώνες, κύτταρα γλοίας, κύτταρα λείου μυός, καθώς επίσης κυτταρικές σειρές όπως HeLa, HEK 293, Cos-7 και PC-12.

Το *DMEM* αρχικά παρασκευάστηκε με χαμηλή γλυκόζη (1 g/L) και πυροσταφυλικό νάτριο, αλλά συχνά χρησιμοποιείται με υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης, με ή χωρίς πυροσταφυλικό νάτριο. Το *DMEM* δεν περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια ή αυξητικούς παράγοντες. Συνεπώς, απαιτεί συμπλήρωση, συνήθως με 10% ορό από έμβρυο μόσχου (*Fetal Calf Serum; FCS*). Το *DMEM* περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού νατρίου (3.7 g/L) και ως εκ τούτου απαιτεί ένα περιβάλλον με 5-10% CO<sub>2</sub> για τη διατήρηση του φυσιολογικού pH [102].

## B.3.2. ANTIBIOTIKA

### B.3.2.1. ΓΕΝΕΤΙΣΙΝΗ

Κοινώς γνωστό ως *G418* ή *G-418*, το αντιδραστήριο *Geneticin* είναι ένα αμινογλυκοσίδιο σχετικό με τη γενταμικίνη και χρησιμοποιείται συνήθως ως εκλεκτικός παράγοντας για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ως ανάλογο της θειικής νεομικίνης, παρεμποδίζει τη λειτουργία των 80S ριβοσωμάτων και της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα γονίδια αντοχής (*neor*) τα οποία χρησιμοποιούνται σε κοινούς φορείς έκφρασης για θηλαστικά περιέχουν στοιχεία που προέρχονται είτε από τα τρανσποζόνια *Tn601* είτε από τα τρανσποζόνια *Tn5*. Κύτταρα θηλαστικών τα οποία εκφράζουν αυτούς τους δείκτες αντοχής, όταν αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής γενετισίνης μπορούν να παράγουν σταθερές αποικίες σε διάστημα από 10 έως 14 ημέρες. Η εταιρεία προμήθευσης του αντιβιοτικού της γενετισίνης είναι η *ThermoFisher Scientific* και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται είναι 400 µg/mL.

### B.3.2.2. ΥΓΡΟΜΥΚΙΝΗ Β

Η υγρομυκίνη Β είναι ένα αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό που αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών παρεμβαίνοντας στη μετατόπιση του ριβοσώματος 80S και προάγοντας παρεκκλίνουσα μετάφραση. Επειδή χρησιμοποιεί διαφορετικό τρόπο δράσης από τα αντιβιοτικά γενετισίνη, βλαστισιδίνη S ή ζεοκίνη, είναι ιδανικό για πειράματα διπλής επιλογής όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν άλλον παράγοντα επιλογής. Η αντοχή στην υγρομυκίνη Β προσδίδεται από το γονίδιο αντοχής στην υγρομυκίνη του βακτηρίου *Escherichia coli* (*hyg* ή *hph*). Η συγκέντρωση για επιλογή κυμαίνεται από 100-1000 µg/mL, εν προκειμένω χρησιμοποιήθηκε 100 µg/mL.

### B.3.2.3. ΔΟΞΥΚΥΚΛΙΝΗ

Η δοξυκυκλίνη είναι ένα συνθετικό παράγωγο οξυτετρακυκλίνης. Θεωρείται ένας αναστολέας ευρέος φάσματος που χρησιμοποιείται για την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνικών μήτρας (MMP).

Το αντιβιοτικό της γενετισίνης χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη τριών από τις σταθερές κυτταροκαλλιέργειες (LSD-1, CORE, NS5A) οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα διπλωματική εργασία και θα αναλυθούν εκτενώς, ενώ τα αντιβιοτικά της υγρομυκίνης και δοξυκυκλίνης στις σταθερές κυτταρικές σειρές, των οποίων η παρασκευή έχει βασιστεί στο *Tet on/Tet off* σύστημα.

### B.3.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

#### ΟΡΟΣ

Το θρεπτικό μέσο εμπλουτίζεται με 10% ορό από έμβρυο μόσχου (*Fetal Calf Serum; FCS*). Περιέχει συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως αυξητικούς παράγοντες, ιχνοστοιχεία, ορμόνες και πρωτεΐνες.

#### ΜΗ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ (NON-ESSENTIAL AMINO ACIDS)

Τα μη βασικά αμινοξέα *Gibco* χρησιμοποιούνται ως συμπλήρωμα στο θρεπτικό μέσο κυτταρικής καλλιέργειας, για να αυξήσουν την κυτταρική βιωσιμότητα και ανάπτυξη. Τα μη βασικά αμινοξέα *Gibco* περιέχουν τα ίδια μη απαραίτητα αμινοξέα που βρίσκονται στο πρότυπο ελάχιστο βασικό μέσο (*MEM*) αλλά σε συγκέντρωση 100x.

#### PBS

Το διάλυμα PBS χρησιμοποιείται κυρίως για την έκπλυση των κυττάρων. Παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 10x και διατηρείται εντός ψυγείου. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται σε χειρισμούς καλλιέργειών το διάλυμα 1x αποστειρώνεται σε υγρό κλίβανο. Πρόκειται για ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων που περιέχει  $K_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaCl$  και  $KCl$  (10x).

#### ΤΡΥΨΙΝΗ

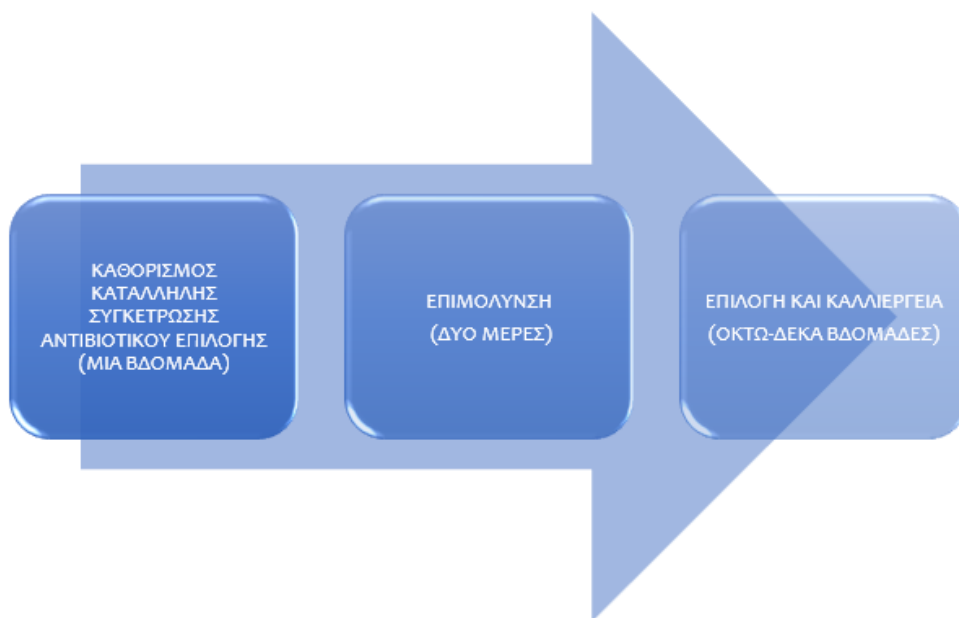
Πρόκειται για ένα ένζυμο, το οποίο προέρχεται από το πάγκρεας χοίρου και χρησιμοποιείται συνήθως για τη διάσπαση και την αποσυσσωμάτωση των προσκολλημένων κυττάρων και ιστών θηλαστικών. Η συγκέντρωση της τρυψίνης η οποία είναι απαραίτητη για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα τους εξαρτάται από το βαθμό ευαισθησία τους. Τα πλεονεκτήματα εναλλακτικών μεθόδων έναντι της παραδοσιακής διαχείρισης με τρυψίνη/EDTA είναι ότι είναι λιγότερο επιβλαβή για τα κύτταρα, γεγονός που εξασφαλίζει αυξημένη βιωσιμότητα και συνεπάγεται μικρότερο κίνδυνο εισαγωγής τυχαίων παραγόντων σε κυτταρικές καλλιέργειες, καθώς δεν περιέχει πρωτεΐνες που προέρχονται από θηλαστικά ή από βακτήρια. Η τρυψίνη η οποία χρησιμοποιείται στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προέρχεται από την εταιρεία *Gibco*.



## DMSO

Το *DMSO* (διμεθυλοσουλφοξείδιο) είναι ένας πολικός, απρωτικός οργανικός διαλύτης με πολλές εφαρμογές στην οργανική χημεία και τη μοριακή βιολογία. Ψύχεται εύκολα και τήκεται αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεοποιημένο προϊόν μπορεί να επαναυγροποιηθεί με θέρμανση σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς να επηρεαστούν οι ιδιότητές του. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψυκτικού μέσου για τα κύτταρα και τη φύλαξή τους σε κρυοφιαλίδια, με αραιώση 1:10 σε ορό (FCS).

## B.4. ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ



Εικόνα 2-1: Ακολουθία σταδίων παρασκευής σταθερής κυτταρικής σειράς.

## B.4.1. HUH7 ΗΠΑΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

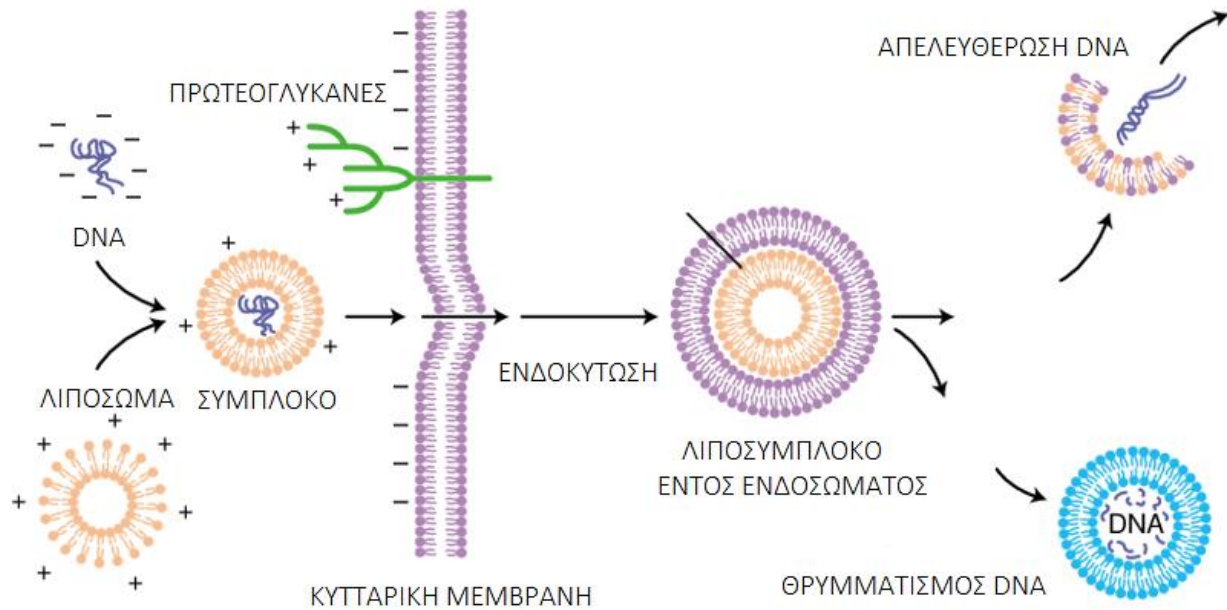
Η *Huh7* είναι μια καλά διαφοροποιημένη σειρά κυτταρικού καρκινώματος η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα, και αρχικά ελήφθη από τον όγκο ήπατος Ιάπωνα, ηλικίας 57 ετών το 1982. Καθιερώθηκε από τους *Nakabayshi* και *Sato*. Πρόκειται για μια κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων τα οποία μοιάζουν μορφολογικά με επιθηλιακά κύτταρα. Είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια των φιαλών ή πλακών καλλιέργειας και τυπικά αναπτύσσονται ως δισδιάστατες μονοστοιβάδες. Αν και περιέχουν πολλές μεταλλάξεις, αξίζει να σημειωθεί ότι τα *Huh7* κύτταρα έχουν μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *p53* [103]. Η *Huh7* κυτταροσειρά αποκτήθηκε από το Παγκόσμιο κέντρο Βιοποικιλότητας (*American Tissue Culture Collection; ATCC*) και διατηρείται στο κατάλληλο υλικό καλλιέργειας παρουσία 10% ορού.

## ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΕΛΛΗΝΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ ΠΑΣΤΕΡ

## B.4.2. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1

Για την παρασκευή *Huh7.5* σταθερής ηπατοκυτταρική σειράς, η οποία υπερεκφράζει τον επιγενετικό παράγοντα LSD-1 παρελήφθη η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της LSD-1 ενσωματωμένη στον ρετροϊκό φορέα κλωνοποίησης *pOZ-N-Flag-HA-N*, και με δυο διαδοχικές αντιδράσεις πέψης ενσωματώθηκε στις θέσεις *XhoI* και *NotI* στο πλασμίδιο *pcDNA3.1mycHis(-)C*.

Η διαμόλυνση των ηπατικών κυττάρων *Huh7.5* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου *jetPEI* [Εικόνα 2-2]. Το *jetPEI* συμπυκνώνει τα μόρια του DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια, τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τις ανιονικές πρωτεογλυκάνες της επιφάνειας των ηπατοκυττάρων. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή, τα σύμπλοκα εισέρχονται εντός του ηπατικού κυττάρου με ενδοκυττάρωση. Μόλις ενταχθεί στο ενδοσωμικό διαμέρισμα, το DNA προστατεύεται από αποικοδόμηση λόγω της ύπαρξης του *jetPEI*. Αυτό οφείλεται εν μέρει στη μοναδική ιδιότητα αυτού του πολυμερούς να ενεργεί ως μαγνήτης πρωτονίων, ιδιότητα που του επιτρέπει να ρυθμίζει το pH εντός του ενδοσώματος. Ο μηχανισμός αυτός τελικά οδηγεί σε ρήξη του ενδοσώματος και



Εικόνα 2-2: Μηχανισμός δράσης αντιδραστηρίου διαμόλυνσης jetPEI. Το jetPEI συμπυκνώνει τα μόρια του DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια, που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεογλυκάνες της κυτταρικής λιπιδικής διπλοστοιβάδας και εισέρχονται στο ηπατικό κύτταρο μέσω ενδοκυττάρωση. (Alan L. Parker et al., 2005)

την απελευθέρωση του DNA και των συμπλεγμάτων στο κυτταρόπλασμα, επιτρέποντας τη μεταφορά τους στον πυρήνα για μεταγραφή. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται με την προσθήκη 700 µg/mL γενετισίνης (G418) μετά το πέρασμα 48 ωρών από τη διαμόλυνση και κλώνοι κυττάρων που υπερεκφράζουν το γονίδιο της LSD-1 απομονώνονται με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και τελικά μέσω ανάπτυξης ενισχύονται ποσοτικά [Εικόνα 2-1] [104].

#### B.4.3. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΔΟΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ HCV CORE

Η πειραματική διαδικασία παρασκευής της σταθερής ηπατικής κυτταρικής σειράς *HepG2 Tet-on* (*Clontech*) η οποία υπερέκφράζει την πρωτεΐνη Core, περιλαμβάνει την κλωνοποίηση της κωδικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης Core HCV-1a (α.κ.: 1-191) από το πλασμίδιο *pHPI 1327* στη θέση *EcoRI* του *pTRE* φορέα έκφρασης (*Clontech*), δημιουργώντας το πλασμίδιο *pHPI 1489*. Με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης το πλασμίδιο *pHPI 1489* εισέρχεται σε κύτταρα *HepG2 Tet-on*, τα οποία αναπτύσσονται παρουσία γενετισίνης συγκέντρωσης 100 µg/mL. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται με την προσθήκη 200 µg/mL υδρομυκίνης και μεμονωμένοι κλώνοι έχουν απομονωθεί πάλι με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Επαγωγή σε *HepG2 Tet-on* κυτταροσειρά υπερέκφρασης πρωτεΐνης Core πραγματοποιείται με προσθήκη 10 µg/mL δοξυκυκλίνης για 24-48 ώρες [105].

#### B.4.4. ΣΤΑΘΕΡΗ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΗ ΔΟΜΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ HCV NS5A

Η πειραματική διαδικασία παρασκευής της *Huh7 Tet-off* σταθερής ηπατικής κυτταρικής σειράς (*Clontech*) η οποία υπερέκφράζει την πρωτεΐνη NS5A, περιλαμβάνει την κλωνοποίηση ολόκληρης της κωδικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης NS5A του γονοτύπου HCV-1a (α.κ.: 1-447) από το πλασμίδιο *pHPI 691* στην θέση *XbaI* του *pTRE* φορέα έκφρασης (*Clontech*), δημιουργώντας το πλασμίδιο *pHPI 735*. Με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης το πλασμίδιο *pHPI 691* εισέρχεται σε κύτταρα *Huh7 Tet-off*. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε παρουσία αντιβιοτικού γενετισίνης συγκέντρωσης 200 µg/mL. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται επίσης με την προσθήκη 40 µg/mL υδρομυκίνης και 10 µg/mL δοξυκυκλίνης. Επαγωγή σε *Huh7 Tet-off* κυτταροσειράς υπερέκφρασης πρωτεΐνης NS5A πραγματοποιείται απουσία χορήγησης δοξυκυκλίνης για τουλάχιστον 96-120 ώρες [106].

#### B.4.4.1. TET ON ΚΑΙ TET OFF ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

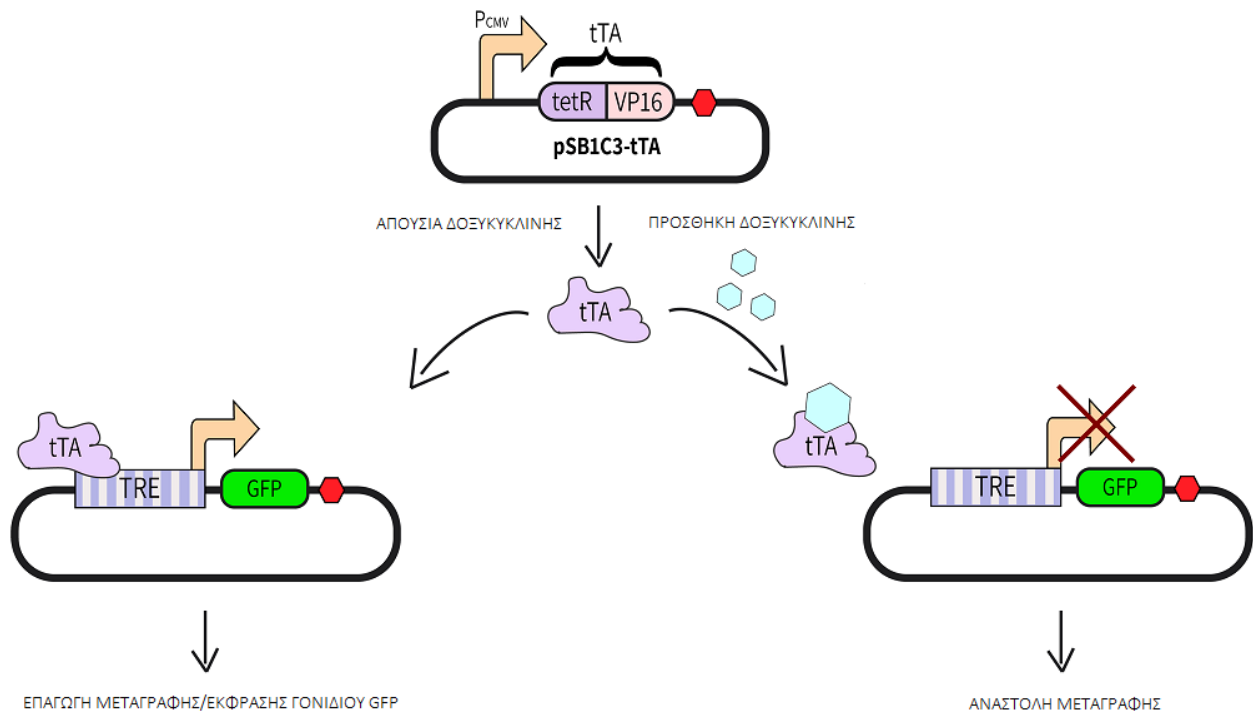
Τα συστήματα έκφρασης γονιδίων *Tet-Off* και *Tet-On* και οι προπαρασκευασμένες *Tet-Off* και *Tet-On* κυτταρικές σειρές προσφέρουν στους ερευνητές εύκολη πρόσβαση στα ρυθμισμένα συστήματα γονιδιακής έκφρασης υψηλού επιπέδου που περιγράφονται από τους *Gossen & Bujard* (1992, *Tet-Off*) και *Gossen et al.*, (1995, *Tet-On*). Στο σύστημα *Tet-Off*, η γονιδιακή έκφραση ενεργοποιείται όταν η τετρακυκλίνη (*Tc*) ή η δοξυκυκλίνη (*Dox*, παράγωγο τετρακυκλίνης) απομακρύνεται από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Αντίθετα, η έκφραση ενεργοποιείται στο σύστημα *Tet-On* με την προσθήκη δοξυκυκλίνης (*Dox*). Το σύστημα *Tet-On* ανταποκρίνεται μόνο στη δοξυκυκλίνη, όχι στην τετρακυκλίνη. Και τα δύο συστήματα επιτρέπουν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε απόκριση σε μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις *Tc* ή *Dox* [Εικόνα 2-3].

Τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης σε συστήματα *Tet* είναι πολύ υψηλά και συγκρίσιμα με τα μέγιστα επίπεδα που λαμβάνονται από ισχυρούς, ιδιοσυστατικούς υποκινητές γονιδίων θηλαστικών όπως ο CMV [107]. Σε αντίθεση με άλλα επαγωγικά συστήματα έκφρασης θηλαστικών, η ρύθμιση γονιδίων στα *Tet Systems* είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη, επομένως η ερμηνεία των αποτελεσμάτων δεν επηρεάζεται από πλειοτροπικά αποτελέσματα ή μη ειδική γονιδιακή επαγωγή.

Στο βακτήριο *Escherichia coli*, η πρωτεΐνη καταστολέας *Tet* (*TetR*) ρυθμίζει αρνητικά τα γονίδια του οπερονίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη στο τρανσποζόνιο *Tn10*. Η πρωτεΐνη *TetR* μπλοκάρει τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων μέσω δέσμευσης στις αλληλουχίες του *tet* υποκινητή (*tetO*) απουσία τετρακυκλίνης. Η πρωτεΐνη καταστολέας *TetR* και ο υποκινητής *tetO*, παρέχουν τη βάση της γονιδιακής ρύθμισης για χρήση σε πειραματικά συστήματα θηλαστικών.

Το πρώτο κύριο συστατικό ενός *Tet* συστήματος (*Tet System*) είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, βασισμένη στην πρωτεΐνη *TetR* βακτηριακής προέλευσης. Στο σύστημα *Tet-Off*, αυτή η 37 kDa πρωτεΐνη είναι μια σύντηξη των αμινοξέων 1 έως 207 της πρωτεΐνης *TetR* και του καρβοξυτελικού άκρου (127 αμινοξικών κατάλοιπων) της περιοχής ενεργοποίησης VP16 του ιού απλού έρπητα. Η προσθήκη της περιοχής VP16 μετατρέπει την πρωτεΐνη *TetR* από ένα μεταγραφικό καταστολέα σε ένα μεταγραφικό επαγωγέα και η προκύπτουσα υβριδική πρωτεΐνη είναι γνωστή ως *trans*-επαγωγέας ο οποίος βρίσκεται υπό τον έλεγχο της τετρακυκλίνης (*tTA*). Ο *trans*-επαγωγέας (*tTA*) κωδικοποιείται από το *pTet-Off* ρυθμιστικό πλασμιδίο, το οποίο επίσης περιλαμβάνει γονίδιο αντοχής στη νεομυκίνη για να επιτραπεί η επιλογή σταθερώς διαμολυσμένων κυττάρων.

Το σύστημα *Tet-On* είναι παρόμοιο με το σύστημα *Tet-Off*, αλλά η ρυθμιστική πρωτεΐνη βασίζεται σε έναν αντίστροφο καταστολέα Tet (rtTA) ο οποίος δημιουργήθηκε με τέσσερις αλλαγές αμινοξέων στην πρωτεΐνη TetR. Η προκύπτουσα πρωτεΐνη (rtTA) κωδικοποιείται από το ρυθμιστικό *pTet-On* πλασμίδιο, το οποίο επίσης περιέχει ένα γονίδιο αντοχής στη νεομυκίνη. Το δεύτερο βασικό συστατικό είναι το πλασμίδιο απόκρισης το οποίο εκφράζει ένα γονίδιο ενδιαφέροντος (*Gene X*) υπό τον έλεγχο του στοιχείου απόκρισης σε τετρακυκλίνη (Tetracycline Responsive Element; TRE).



Εικόνα 2-3: Αντιπροσωπευτικό σύστημα *Tet off* βακτηριακής προέλευσης για την έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης GFP. (iGEM Israel, 2017)

Ο απώτερος στόχος της δημιουργίας ενός λειτουργικού συστήματος γονιδιακής έκφρασης *Tet* είναι η παρασκευή μια διπλά σταθερής κυτταροσειράς *Tet* η οποία περιέχει τόσο ρυθμιστικά όσο και πλασμίδια απόκρισης. Όταν τα κύτταρα περιέχουν τόσο τους ρυθμιστικούς φορείς (*pTet-Off* ή *pTet-On*) όσο και τους φορείς (π.χ. *pTRE-Gene X*), το γονίδιο X εκφράζεται μόνο κατά τη σύνδεση της πρωτεΐνης tTA ή rtTA με το TRE. Στο σύστημα *Tet-Off*, η πρωτεΐνη επαγωγέας tTA δεσμεύει το TRE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή απουσία τετρακυκλίνης ή δοξυκυκλίνης. Στο σύστημα *Tet-On*, η πρωτεΐνη rtTA δεσμεύει το TRE και ενεργοποιεί τη μεταγραφή παρουσία δοξυκυκλίνης. Σε αμφότερα τα συστήματα *Tet-On* και *Tet-*

*Off*, η μεταγραφή ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται σε απόκριση στη δοξυκυκλίνη με τρόπο ακριβή και εξαρτώμενο από τη συγκέντρωσή της [107,108].

## B.5. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

### B.5.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ PFKWT

Η κατασκευή πραγματοποιήθηκε με βάση τον πλασμιδιακό φορέα *pFK-i389-Luc-NS3-3'-JFH1-dg*. Είναι δισιστρονικό, φέρει τον υποκινητή HCMV (Human Cytomegalovirus; HCMV) RNA πολυμεράσης II για την παραγωγή RNA *in vitro*. Το πρώτο σιστρόνιο αποτελείται από την 5' μη μεταφραστική περιοχή και την εσωτερική θέση πρόσδεσης ριβοσώματος του στελέχους *JFH1* (IRES) καθώς και από μία συγκεκριμένη για το πλασμίδιο αλληλουχία. Το δεύτερο σιστρόνιο αποτελείται από την εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (Encephalomyocarditis Virus; EMCV), την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες του στελέχους *JFH1* και την 3' μη μεταφραστική περιοχή του στελέχους *JFH1* [109].

### B.5.2. ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ JCR2A

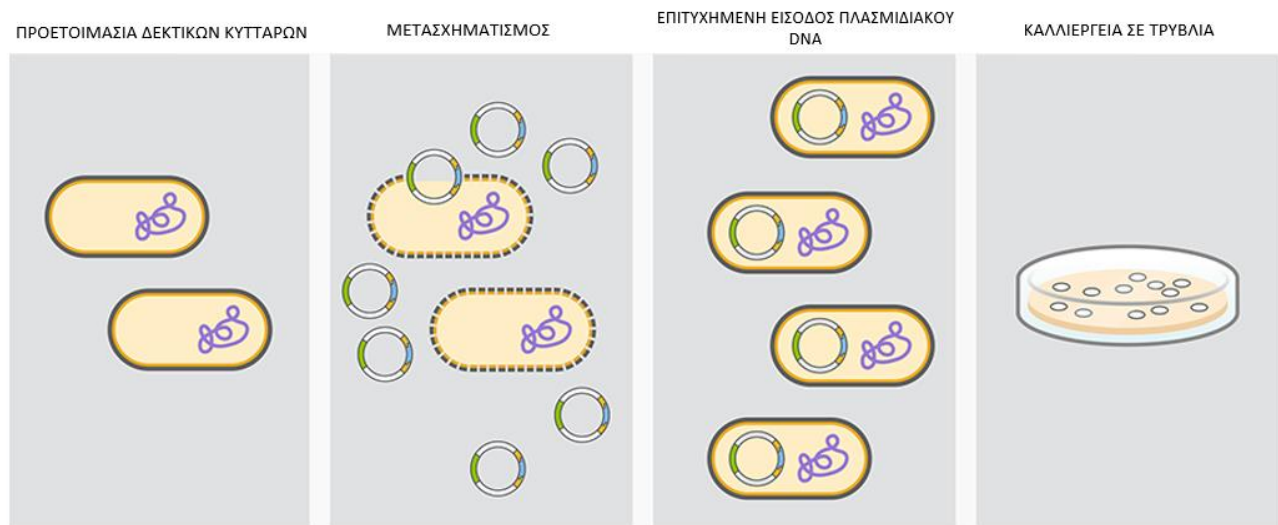
Η κατασκευή πραγματοποιήθηκε με βάση τον πλασμιδιακό φορέα *pFK\_i389-JcR2a\_dg\_JC1*. Πρόκειται για μονοσιτρονικό πλασμίδιο, το οποίο συχνά χρησιμοποιείται ως τυπικό ρεπλικόνιο για αναλύσεις παροδικού αναδιπλασιασμού. Φέρει τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης, ακολουθούμενο από το γονίδιο της *Renilla* λουσιφεράσης και στη συνέχεια όλες τις ακολουθίες του στελέχους *JFH1* από την 5' μέχρι την 3' μη μεταφραστική περιοχή. Η 3' μη μεταφραστική περιοχή βρίσκεται σε σύντηξη με το γονιδιωματικό ριβοένζυμο προερχόμενο από τον ιό ηπατίτιδας D (HDV) και ακολουθεί ο T7 τερματιστής ο οποίος κατασκευάστηκε από τον *Lohmann V*.

### Β.5.3. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *E. coli* K12 JM109 ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA

Ο μετασχηματισμός είναι η διαδικασία με την οποία ένας οργανισμός αποκτά εξωγενές DNA. Ο μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμίδια είναι σημαντικός όχι μόνο για μελέτες σε βακτήρια αλλά, και γιατί τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ως μέσο για την αποθήκευση και την αντιγραφή πλασμιδίων. Γι' αυτό το λόγο, σχεδόν όλα τα πλασμίδια (ακόμη και αυτά που έχουν σχεδιαστεί για έκφραση κυττάρων θηλαστικών) φέρουν αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής (Origin of Replication; ORF) βακτηριακής προέλευσης αλλά και ένα γονίδιο αντοχής στα αντιβιοτικά για χρήση ως δείκτη επιλογής [Εικόνα 2-4].

Η δημιουργία βακτηριακών στελεχών που μπορούν να μετασχηματιστούν ευκολότερα και ευνοούν τη διατήρηση του εισερχόμενου πλασμιδίου χωρίς αναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, στηρίζεται στην πραγματοποίηση γενετικών τροποποιήσεων. Επιπλέον, έχουν ανακαλυφθεί ειδικές κατεργασίες, οι οποίες αυξάνουν την απόδοση μετασχηματισμού και καθιστούν τα βακτήρια πιο ευαίσθητα σε μετασχηματισμό είτε χημικά είτε ηλεκτρικά, τα αποκαλούμενα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα [110].

#### ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Εικόνα 2-4: Συνοπτική απεικόνιση διαδικασίας μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων. (NEB)



Κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας για την πειραματική διαδικασία του μετασχηματισμού έχει επιλεγεί το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* K12 JM109 για την πρόσληψη του πλασμιδίου *PFKWT*.

- Χρησιμοποιούνται δεκτικά κύτταρα *E. coli* του στελέχους K12 JM109 από στοκ γλυκερόλης (-70°C), τα οποία τοποθετούνται σε πάγο, για να ξεπαγώσουν ομαλά χωρίς να ξεπεράσουν τους 0°C.
- Μεταφέρουμε 200 μL κυττάρων σε σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL) και προσθέτουμε 2 μL πλασμιδιακού DNA. Ο όγκος του DNA ο οποίος προστίθεται, δε θα πρέπει να ξεπερνάει το 5% του όγκου των δεκτικών κυττάρων.
- Πραγματοποιείται ήπια ανάμιξη του περιεχόμενου του σωληνάριου και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηριακών κυττάρων σε υδατόλουτρο 37°C για 2 λεπτά ακριβώς. Εξαιρετικής σημασίας είναι η αποφυγή ανακίνησης του σωλήνα προπυλενίου γιατί αυτό είναι το κρίσιμο στάδιο εισόδου του πλασμιδίου στα κύτταρα.
- Προσθέτουμε 1 mL φρέσκου θρεπτικού διαλύματος LB και τοποθετούμε το σωλήνα σε παγόλουτρο για 2-3 λεπτά.
- Ακολουθεί επώαση σε αναδευόμενο επωαστήρα στους 37°C για μια ώρα περίπου ή για 2 ώρες στους 37°C χωρίς ανάδευση.
- Πραγματοποιείται επίστρωση ~100 μL σε τρυβλία *petri* με LB (*Luria-Bertani Broth* ή *Miller Broth*) και με το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη, αραιώση 1:1000), και αναμονή για λίγα λεπτά ώστε να απορροφηθεί το υγρό.
- Ακολουθεί επώαση του τρυβλίου ανεστραμμένου στους 37°C για 16 περίπου ώρες.
- Ολοκληρώνεται η πειραματική διαδικασία με την επιλογή τριών μεμονωμένων αποικιών, προκειμένου να υπάρξει επιβεβαίωση επιτυχημένου μετασχηματισμού των βακτηρίων.
- Πραγματοποιείται εμβολιασμός με την άκρη πλαστικού ρύγχους για πιπέτα σε σωλήνα προπυλενίου που περιέχει 2 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB (μικρής κλίμακας καλλιέργεια) και προσθήκη 2 μL αμπικιλίνης.
- Επώαση στους 37°C για 16 περίπου ώρες.

## B.5.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

### B.5.4.1. ΜΙΚΡΗΣ ΚΑΙ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής και μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιούνται τα πρωτόκολλα τα οποία συνοδεύουν τα *Plasmid or Cosmid DNA Purification QIAGEN Plasmid Mini and Maxi Kits*. Η μόνη διαφορά μεταξύ τους έγκειται καταρχάς στο μέγεθος της αρχικής βακτηριακής υγρής καλλιέργειας η οποία τοποθετήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB -2 mL για το *Mini kit* και 500 mL για το *Maxi kit*- και τέλος στις ποσότητες των διαλυμάτων που προστίθενται σε κάθε βήμα της πειραματικής διαδικασίας. Οι ποσότητες για το πρωτόκολλο μεγάλης κλίμακας σε σχέση με εκείνο της μικρής κλίμακας θα απεικονίζονται με *πλάγια γραμματοσειρά (italics)* για να διαχωρίζονται ευκολότερα.

- Μεταφορά υγρής καλλιέργειας μικρής κλίμακας (2 mL) και *μεγάλης κλίμακας (500 mL)* σε κατάλληλο πλαστικό δοχείο.
- Ακολουθεί συλλογή των βακτηριακών κύτταρων με φυγοκέντρηση στα 6000 g για 15 λεπτά στους 4°C.
- Επαναδιάλυση του βακτηριακού ιζήματος σε 0.3 mL ή *10 mL* ρυθμιστικού διαλύματος *P1*. Η RNάση Α είναι σημαντικό να έχει προστεθεί στο *P1*. Τα βακτήρια επαναιωρούνται πλήρως με περιδίνηση ή με πιπέτα πάνω και κάτω, έως ότου δεν παρατηρούνται συσσωματώματα κυττάρων.
- Προσθέτουμε 0.3 mL ή *10 mL* ρυθμιστικού διαλύματος *P2*, πραγματοποιούμε καλή ανάδευση αναστρέφοντας έντονα το σφραγισμένο δοχείο 4-6 φορές και επώαζουμε σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) για 5 λεπτά ακριβώς. Το προϊόν λύσης πρέπει να εμφανίζεται με υψηλό ιξώδες.
- Προσθέτουμε 0.3 mL ή *10 mL* ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος *P3*, άμεση ανάμιξη αναστρέφοντας 4-6 φορές προσεκτικά και επώαση επί πάγου για 5 ή *20* λεπτά. Μετά την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος *P3* σχηματίζεται ένα χνουδωτό λευκό υλικό και το προϊόν λύσεως καθίσταται λιγότερο ιξώδες.
- Το κατακρημνίζον υλικό εμπεριέχει γονιδιωματικό *DNA*, πρωτεΐνες και κυτταρικά υπολείμματα.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα σε μικροφυγόκεντρο για 10 ή *30* λεπτά στους 4°C. (*Για την απομόνωση μεγάλης κλίμακας επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση του υπερκείμενου σε >20000g για 15 λεπτά στους 4°C.*)
- Αφαιρούμε αμέσως το υπερκείμενο υγρό, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA. (*Μόνο για το πρωτόκολλο του Maxi prep ακολουθεί φιλτράρισμα του υπερκείμενου διαλύματος σε στήλη*

*Qiagen-tip 20, και αφήνεται να περάσει διαμέσου της ρητίνης χωρίς παρεμβολή, μόνο με τη ροή βαρύτητας.)*

- Πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης *Qiagen 20* με 2 mL ή 30 mL ρυθμιστικού διαλύματος *QC (Buffer QC)* δυο φορές. Το ρυθμιστικό διάλυμα *QC* αφήνεται να μετακινηθεί μέσω της ροής βαρύτητας διαμέσου της στήλης της *QIAGEN*.
- Ακολουθεί έκλυση του πλασμιδιακού DNA με 0.8 mL ή 15 mL ρυθμιστικού διαλύματος *QF*.
- Με την προσθήκη 0.7 όγκους ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου κατακρημνίζεται το DNA.
- Προσεκτική ανάμιξη και φυγοκέντρηση αμέσως σε  $\geq 15000$  g στροφές για 30 λεπτά. Αφαιρούμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
- Πραγματοποιείται πλύση καθαρισμού του DNA με 1 mL ή 5 mL αιθανόλης 70% και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 10 λεπτά. Απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο, προσέχοντας να μην ανασηκωθεί το ίζημα. Η αιθανόλη 70% απομακρύνει το κατακρημνισμένο άλας καθιστώντας ευκολότερη την επαναδιάλυση του DNA.
- Ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος για 5-10 λεπτά σε συσκευή συμπυκνωτή κενού (*SpeedVac*) και επαναδιάλυση του DNA σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος *TE* (10 mM Tris-Cl, pH 8.5).
- Μέτρηση της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA σε ng/mL με τη βοήθεια του φωτόμετρου *Thermal Scientific NanoDrop 2000*. (Η απόδοση της μεθόδου είναι περίπου 500 ng πλασμιδίου/mL καλλιέργειας).
- Ακολουθεί πέψη του πλασμιδιακού DNA (2  $\mu$ g) με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% για τον έλεγχο ακεραιότητας του πλασμιδίου [111].

#### B.5.5. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΣΩ ΠΕΨΗΣ

Η πέψη νουκλεϊνικών οξέων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενζύμων γνωστών ως περιοριστικές ενδονουκλεάσες και συνεπάγεται τη θραύση μορίων DNA σε μικρότερα τμήματα. Τα ένζυμα περιορισμού ονομάζονται με βάση το κυτταρικό στέλεχος από το οποίο απομονώνονται, αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο μόριο του δίκλωνου DNA (για παράδειγμα GATATC) και στη συνέχεια κόβουν την αλληλουχία του DNA για να παράγουν μικρότερα θραύσματα, που ονομάζονται θραύσματα περιορισμού.

Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει συγκεκριμένες απαιτήσεις για βέλτιστη δραστηριότητα. Ιδανικές συνθήκες χρήσης και αποθήκευσης εξασφαλίζουν τη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα. Συνθήκες όπως η

θερμοκρασία, το pH, ο συμπαραγόντας των ενζύμων, η σύνθεση αλάτων και η ιοντική ισχύ επηρεάζουν τη δραστικότητα και τη σταθερότητα κάθε ενζύμου. Η πέψη μορίων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιείται με επώαση στην προτεινόμενη θερμοκρασία και παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, σύμφωνα με τις υποδείξεις της εταιρείας (*Promega Corporation*). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης, η ποσότητα του προστιθέμενου ενζύμου, καθώς και ο χρόνος επώασης καθορίζονται ανάλογα με την ποσότητα του DNA. Σε κάθε περίπτωση, η ποσότητα του ενζύμου δεν ξεπερνάει το 10% της τελικής ποσότητας της αντίδρασης γιατί θα δρα ανασταλτικά στη διαδικασία πέψης.

Με βάση το χάρτη περιορισμού των δυο πλασμιδίων (*PFKWT, JCR2A*) τα οποία χρησιμοποιούνται στη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης, έχει επιλεγεί ως κατάλληλο ένζυμο περιορισμού το ένζυμο *MluI* (*Promega Corporation*) [112] το οποίο έχει προέλθει από το βακτήριο *Micrococcus luteus* [Πίνακας 2-1].

Πίνακας 2-1: Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου *MluI* που χρησιμοποιήθηκε για την πέψη των πλασμιδίων.

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία περιορισμού	Ενεργότητα	Εταιρεία
<i>MluI</i>	A ▼ CGCG T T GCGC ▲ A	10 u/μL	<i>Promega Corporation</i>

Για την αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκαν 25-30 μg πλασμιδιακού DNA, τα διάφορα αντιδραστήρια φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 2-2]. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 4 ώρες στους 37°C σε υδατόλουτρο.

Πίνακας 2-2: Αναλυτική παρουσίαση των συστατικών της αντίδρασης πέψης των πλασμιδίων.

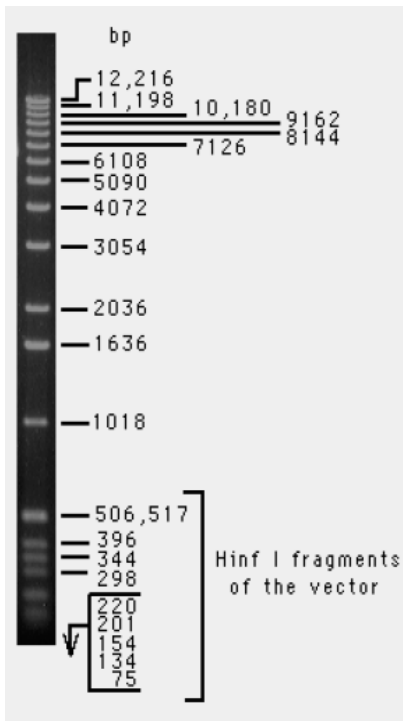
Αντίδραση πέψης	Πλασμίδιο PFKWT	Πλασμίδιο JCR2A
Ρυθμιστικό διάλυμα D	20 μL	20 μL
BSA	2 μL	2 μL
Ένζυμο <i>MluI</i>	20 μL	20 μL
Πλασμιδιακό DNA	25-30 μg	25-30 μg
dH <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου 200 μL	μέχρι τελικού όγκου 200 μL
Τελικός όγκος	20 μL	20 μL

#### B.5.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΠΕΨΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση πήκτωματος αγαρόζης είναι μια μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών, DNA ή RNA [113]. Τα μόρια νουκλεϊνικού οξέος διαχωρίζονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, όπου τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς την άνοδο (θετικός πόλος). Η ροή μετακίνησης καθορίζεται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος, όπου μόρια μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται ταχύτερα από τα μεγαλύτερα [114].

Το βρωμιούχο αιθίδιο (*EtBr*) είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική για την απεικόνιση νουκλεϊνικού οξέος. Δεδομένου ότι το χρωματισμένο με *EtBr* DNA δεν είναι ορατό στο φυσικό φως, ρυθμιστικά διαλύματα προστίθενται συνήθως στο DNA πριν από τη φόρτωση του στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Το κυανού του ξυλολίου και το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι οι δύο πιο συνήθεις χρωστικές, οι οποίες συμπυκνώνονται με το DNA και μετακινούνται περίπου με την ίδια ταχύτητα με τα θραύσματα DNA που είναι 5000 ζεύγη βάσεων και 300 ζεύγη βάσεων αντίστοιχα. Αρκετά ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κλασματοποίηση νουκλεϊνικού οξέος όπως το Tris-οξικό-EDTA (*Tris-acetate-EDTA*; TAE) ή Tris-βορικό-EDTA (*Tris-borate-EDTA*; TBE) [115-117].

- Για την παρασκευή πήκτωματος, σκόνη αγαρόζης (*UltraPure agarose, Thermofisher Scientific*) αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης στην επιθυμητή συγκέντρωσή (συνήθως με εύρος 0.5-4%).
- Θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς.
- Βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται συνήθως στο πήκτωμα σε συγκέντρωση 10 mg/mL (6  $\mu$ L) για την απεικόνιση των νουκλεϊνικών οξέων.
- Το μίγμα ψύχεται στους 60°C και χύνεται μέσα στο εκμαγείο για στερεοποίηση. Τα κατάλληλα χτενάκια έχουν τοποθετηθεί στο εκμαγείο νωρίτερα, και αφαιρούνται αμέσως μετά τη στερεοποίηση του πήκτωματος.
- Το πήκτωμα παραμένει στο πλαστικό εκμαγείο κατά την ηλεκτροφόρηση.
- Τα δείγματα DNA αφού αναμιχθούν με χρωστική (*Loading Dye 6x*) τοποθετούνται στα φρεάτια.
- Φορτώνεται και ο μάρτυρας (*1Kb DNA Ladder, Invitrogen*).
- Τέλος, εφαρμόζεται τάση περίπου 100-120 V για περίπου μια ώρα και έπειτα ακολουθεί παρατήρηση των ζωνών DNA σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και λήψη φωτογραφίας.



Εικόνα 2-4: Αναλυτική απεικόνιση των ζωνών του 1Kb DNA μάρτυρα, Invitrogen.

Ο 1 Kb DNA μάρτυρας έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό του μεγέθους αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό της διπλής έλικας DNA στην περιοχή από 100 ζεύγη βάσεων έως 15000 ζεύγη βάσεων [Εικόνα 2-4]. Ο 1 Kb DNA μάρτυρας μοριακών βαρών αποτελείται από 18 μεμονωμένα θραύσματα DNA καθαρισμένα με χρωματογραφία και έχει ζώνη αναφοράς στα 1500 ζεύγη βάσεων για εύκολο προσανατολισμό. Καθώς τα νουκλεϊνικά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα, πρέπει να τοποθετούνται τα φρεάτια προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

#### B.5.7. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

- Προσθέτουμε ίσο όγκο βασικής φαινόλης (200  $\mu$ L). Μετά την ομογενοποίηση με χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*), οι δύο φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση σε 13000 *rpm* για 3 λεπτά.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα και επαναλαμβάνουμε το πρώτο βήμα άλλη μια φορά.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιου με τον όγκο του υπερκείμενου διαλύματος που έχουμε συλλέξει και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13000 *rpm* για 4 λεπτά.
- Το DNA κατακρημνίζεται από την υδατική φάση με την προσθήκη 0.1 όγκου οξικού νατρίου 3 M pH 5.2 και 2.5 όγκων 100% αιθανόλης. Η κατακρήμνιση πραγματοποιείται με παραμονή 12 ώρες στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση διάρκειας 20 λεπτών και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 70% αιθανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά.
- Αφαιρείται το διάλυμα αιθανόλης και ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος σε συσκευή συμπυκνωτή κενού.

- Πραγματοποιείται αναδιάλυση του ιζήματος σε 20  $\mu\text{L}$  απεσταγμένο νερό και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με τη βοήθεια του φωτόμετρου *Thermal Scientific NanoDrop 2000*.

#### B.5.8. RNA *IN VITRO* ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης RNA *in vitro* μεταγραφής ακολουθούμε το παρακάτω πρωτόκολλο.

- Προσθέτουμε σε σωλήνα προπυλενίου (200  $\mu\text{L}$ ), 5  $\mu\text{g}$  γραμμικό DNA, ρυθμιστικό διάλυμα (400 mM HEPES pH 7.5, 60 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM σπερμιδίνη, 200 mM διθειοθρεϊτόλη), ριβονουκλεοτίδια (100 mM), αναστολέα ριβονουκλεασών (*Promega*) και T7 RNA πολυμεράση (*Promega*).
- Πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 4 ½ ώρες.
- Ενδιάμεσα προσθέτουμε επιπλέον ποσότητα (2  $\mu\text{L}$ ) T7 RNA πολυμεράσης.
- Τέλος προσθέτουμε 10  $\mu\text{L}$  δεοξυριβονουκλεάσης (DNase free RNase RQ1, *Promega*) και πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Τα συστατικά της αντίδρασης της *in vitro* RNA μεταγραφής και οι ποσότητες τους εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 2-3].

Πίνακας 2-3: Αναλυτική παρουσίαση των συστατικών της αντίδρασης *in vitro* RNA αντιγραφής.

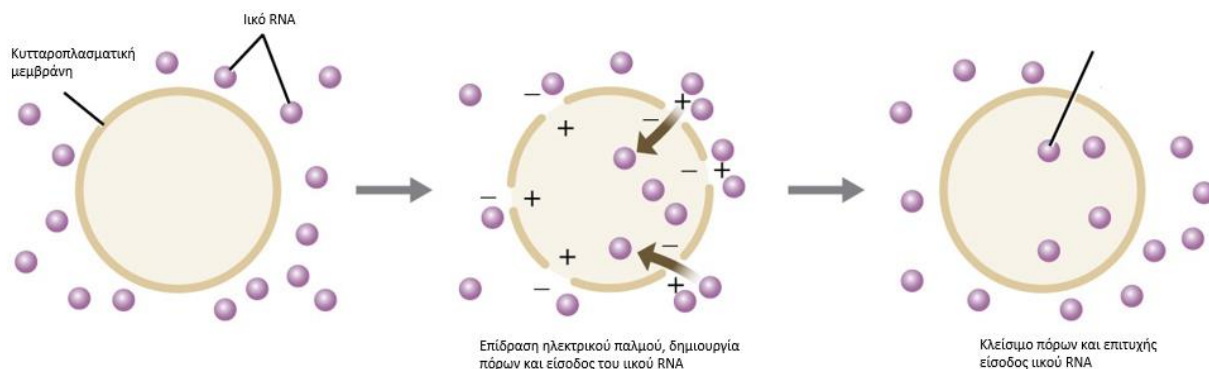
<b>Αντίδραση <i>in vitro</i> RNA transcription</b>	<b>Σύσταση</b>	<b>Ποσότητα</b>
Υψηλής απόδοσης ρυθμιστικό διάλυμα ( <i>High Yield Transcription Buffer</i> )	400 mM HEPES pH 7.5, 60 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM σπερμιδίνη, 200 mM διθειοθρεϊτόλη	20 $\mu\text{L}$
rNTPs	100 mM διάλυμα από ATP, CTP, GTP, UTP ( <i>Roche</i> )	12.5 $\mu\text{L}$
Αναστολείς ριβονουκλεασών (RNasin)	(40 $\mu\text{L}$ ) ( <i>Promega Corporation</i> )	20.5 $\mu\text{L}$
Πλασμιδιακό DNA		5 $\mu\text{g}$
T7 πολυμεράση	40 $\mu\text{L}$	4 + 2 $\mu\text{L}$
DNase	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O		μέχρι συμπλήρωσης 100 $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος		118 $\mu\text{L}$

### B.5.9. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ RNA ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ *IN VITRO* ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

- Αρχικά προσθέτουμε 400 μL όξινης φαινόλης (pH 6.5), 440 μL απεσταγμένο νερό και 60 μL 2 M οξικό νάτριο (*CH<sub>3</sub>COONa*) pH 4.5. Μετά την ομογενοποίηση με τη χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 10 λεπτά και οι δύο φάσεις διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση σε 13000 *rpm* για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο υδατικό διάλυμα σε καινούριο σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL), προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιου και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 13.000 *rpm* για 4 λεπτά.
- Το RNA καταβυθίζεται από την υδατική φάση με την προσθήκη 0.7 όγκων ισοπροπανόλης και παραμονή στους -80°C για 16 ώρες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση διάρκειας 20 λεπτών και απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος.
- Το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα 70% αιθανόλης και φυγοκεντρείται για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Η πειραματική διαδικασία ολοκληρώνεται με απομάκρυνση του διαλύματος αιθανόλης, ξήρανση του ιζήματος σε συσκευή *SpeedVac*, αναδιάλυση σε 50 μL απεσταγμένο νερό και πάλι μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA με τη βοήθεια του φωτόμετρου *Thermal Scientific NanoDrop 2000*.

### B.6. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μέθοδος φυσικής διαμόλυνσης, που χρησιμοποιεί έναν ηλεκτρικό παλμό για τη δημιουργία προσωρινών πόρων σε κυτταρικές μεμβράνες μέσω των οποίων, ουσίες όπως τα νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να περάσουν μέσα στα κύτταρα. Είναι μια πολύ αποτελεσματική στρατηγική για την εισαγωγή ξένων νουκλεϊνικών οξέων σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και κυττάρων θηλαστικών [Εικόνα 2-5].



Εικόνα 2-5: Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας κυτταρικής ηλεκτροδιάτρησης. (*Jobilize.com*)



Η ηλεκτροδιάτρηση βασίζεται σε μια απλή διαδικασία. Κύτταρα-ξενιστές και επιλεγμένα μόρια αιωρούνται σε ένα αγώγιμο διάλυμα εντός κυψελίδας, η οποία τοποθετείται σε κατάλληλη υποδοχή σε συσκευή ηλεκτροδιάτρησης και ένας ηλεκτρικός παλμός με βελτιστοποιημένη τάση που διαρκεί μόνο από μερικά μικροδευτερόλεπτα μέχρι ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου εκκενώνεται διαμέσου του κυτταρικού εναιωρήματος.

Η εφαρμογή του ηλεκτρικού παλμού διαταράσσει τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης και οδηγεί στο σχηματισμό προσωρινών πόρων. Το ηλεκτρικό δυναμικό κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης αυξάνεται ταυτοχρόνως επιτρέποντας στα φορτισμένα μόρια όπως το DNA να διαπερνούν τη μεμβράνη μέσω των πόρων με τρόπο παρόμοιο με της ηλεκτροφόρησης [118].

Το κύριο πλεονέκτημα της ηλεκτροδιάτρησης είναι η εφαρμογή της για παροδική και σταθερή διαμόλυνση όλων των κυτταρικών τύπων. Περαιτέρω, επειδή η ηλεκτροδιάτρηση είναι εύκολη και ταχεία, είναι ικανή να επιμολύνει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων σε σύντομο χρονικό διάστημα αφού προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες ηλεκτροδιάτρησης. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από τους παλμούς υψηλής τάσης και η μερικώς επιτυχημένη επαναφορά της δομής της κυτταρικής μεμβράνης, με συνέπεια να απαιτεί τη χρήση μεγαλύτερων ποσοτήτων κυττάρων σε σύγκριση με τις μεθόδους χημικής διαμόλυνσης.

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης για την εισαγωγή του RNA που παράγεται από τα πλασμίδια *PFKWT* και *JCR2A* και τα οποία εκφράζουν το γονίδιο της λουσιφεράσης, κάτω από τον έλεγχο διαφορετικών υποκινητών, εφαρμόζεται σε δυο τύπους σταθερών ηπατοκυτταρικών σειρών, σε κυτταροσειρά μάρτυρα *Huh7 (Control)* και σε έναν κλώνο ο οποίος υπερεκφράζει τον επιγενετικό παράγοντα *LSD-1, Huh1B*.

- Για την πραγματοποίηση του πειράματος ηλεκτροδιάτρησης χρειαζόμαστε δυο φιάλες καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> κυττάρων *Huh1B* και δυο φιάλες καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> κυττάρων *Huh7*.
- Αρχικά τα κύτταρα τα οποία έχουν φτάσει σε 100% πληρότητα ανάπτυξης εντός των φιαλών καλλιέργειας (*F75*) αποκολλώνται από το υπόστρωμά τους με τη βοήθεια διαλύματος τρυψίνης-*EDTA*.
- Προσθέτουμε πλήρες θρεπτικό υλικό *DMEM (DMEM High Glucose για Huh1B & DMEM Low Glucose για Huh7)* και διαχωρίζουμε τα σχηματισμένα συσσωματώματα με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας.

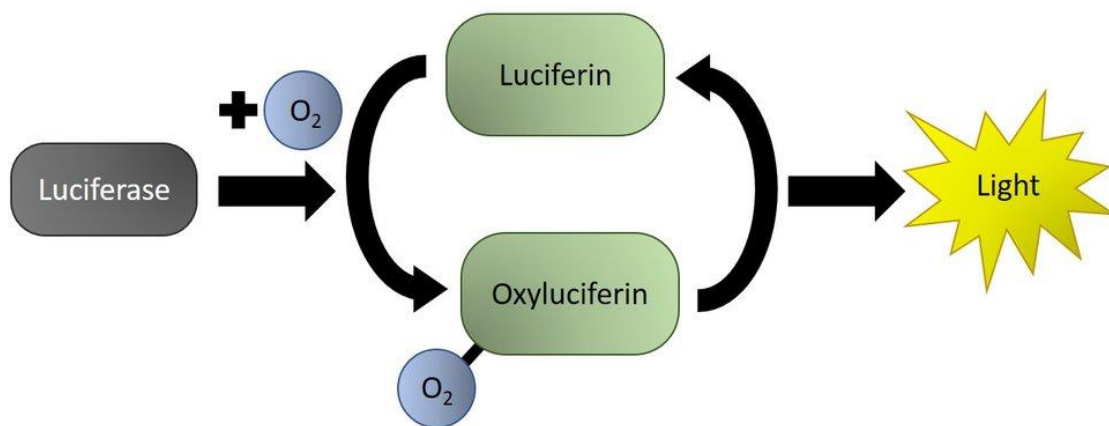
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων σε σωλήνες προπυλενίου (15 mL) (1 σωλήνας/δοχείο καλλιέργειας F75) σε 800 rpm για 5 λεπτά.
- Ξεπλένουμε το ίζημα των κυττάρων με PBS δύο φορές για την ολική αφαίρεση υπολειμμάτων θρεπτικού ή τρυψίνης.
- Πραγματοποιείται αναδιάλυση των κυττάρων σε 400  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα *Cytomix* ανά δείγμα [120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.6), 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>], στο οποίο έχουν προστεθεί 2 mM ATP και 5 mM γλουταθειόνη.
- Σε αυτό το μίγμα προσθέτουμε ποσότητα RNA (10  $\mu$ g) και 1  $\mu$ L t-RNA.
- Μετά από καλή ανάμιξη το μίγμα μεταφέρεται σε κυβέττα ηλεκτροδιάτασης (0.4 cm gap, BioRad) και πραγματοποιείται ηλεκτροδιάταξη σε 975  $\mu$ F και 270 V για 19-25 msec (GenePulser XCell; BioRad).
- Σύμφωνα με το σχεδιασμό του πειράματος, η ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται τέσσερις φορές, δυο φορές (δυο κυβέττες) σε κύτταρα κλώνου *Huh1B*, μια φορά για την εισαγωγή του ρεπλικονίου *PFKWT* και μια φορά για την εισαγωγή του ιού *JCR2A*. Ομοίως πραγματοποιήθηκε δυο φορές για τα κύτταρα *Huh7*.
- Το περιεχόμενο κάθε κυβέττας αναδιαλύεται σε τόση ποσότητα κατάλληλου θρεπτικού μέσου (ανάλογα με την κυτταροσειρά), ώστε να καλυφθούν μια πλάκα καλλιέργειας 24 φρεατίων και 6 φρεατία από μια πλάκα 12 φρεατίων. Η ηπατική κυτταροσειρά *Huh7* η οποία χρησιμοποιείται ως μάρτυρας στο πείραμα, καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό *DMEM Low Glucose* της *Gibco* με προσθήκη 10% ορού (FCS), ενώ η ηπατική κυτταροσειρά *Huh1B* που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη LSD-1 σε θρεπτικό υλικό *DMEM High Glucose* με προσθήκη 10% ορού και αμινοξέα 1x (*Non-Essential Amino Acids 100x*).
- Το πείραμα έχει διάρκεια 144 ωρών. Ανά 24 ώρες συλλέγουμε όλο το περιεχόμενο του φρεατίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 3 λεπτά δυο φορές. Η δεύτερη έκπλυση πραγματοποιείται με αναδιάλυση σε PBS, προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του θρεπτικού μέσου.
- Για κάθε χρονική στιγμή (*Time Point*) συλλέγουμε το περιεχόμενο τεσσάρων φρεατίων από την πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 φρεατίων για τη μέτρησή της λουσιφεράσης και ενός φρεατίου από την πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 12 φρεατίων για την απομόνωση RNA. Η συλλογή τεσσάρων φρεατίων για κάθε time point στοχεύει στην ύπαρξη περισσότερων τεχνικών αντιγράφων (*Technical Replicates*) για την καλύτερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

## B.7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗΣ

Τα κύτταρα υποβάλλονται σε διάφορες δοκιμασίες, μέσα στα ειδικά φρεάτια (επιμολύνσεις, δοκιμασίες με διάφορες χημικές ουσίες, επώαση με ιικά ρεπλικόνια κτλ.) και συλλέγονται σε διάφορες χρονικές στιγμές, οι οποίες καθορίζονται από το εκάστοτε πειραματικό πρωτόκολλο. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και η λύση τους πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους ανάλογα με τον πειραματικό στόχο.

### B.7.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ *FIREFLY*

Καταρχάς, θα αναφερθούμε στη διαδικασία κυτταρικής λύσης η οποία ακολουθήσε το πείραμα της ηλεκτροδιάτρησης. Τα γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται συνήθως στην κυτταρική βιολογία για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και άλλων κυτταρικών γεγονότων συζευγμένων με αυτήν όπως η δράση ενός υποδοχέα, η ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, η επεξεργασία του mRNA, η πρωτεϊνική αναδίπλωση και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.



Εικόνα 2-6: Αντίδραση κατάλυσης λουσιφεράσης *Firefly*.

Η λουσιφεράση *Firefly* χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς για τους ακόλουθους λόγους: Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της είναι διαθέσιμος αμέσως μετά τη μετάφραση, καθώς η πρωτεΐνη δεν υπόκειται σε μετα-μεταφραστική επεξεργασία. Η ανάλυση είναι πολύ ευαίσθητη, γιατί η παραγωγή φωτός έχει την υψηλότερη κβαντική απόδοση συγκριτικά με οποιαδήποτε αντίδραση χημειοφωταύγειας, και δεν υπάρχει φωταύγεια υποβάθρου στα κύτταρα-ξενιστές. Ο προσδιορισμός είναι γρήγορος, απαιτώντας μόνο μερικά δευτερόλεπτα ανά δείγμα.

Το σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης έχει βελτιωθεί σημαντικά έναντι των συμβατικών μεθόδων ανάλυσης τόσο σε επίπεδο ευαισθησίας όσο και απλότητας χειρισμού. Η παραγωγή φωτός στηρίζεται στη μετατροπή της χημικής ενέργειας της οξειδωσης της λουσιφερίνης μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, σχηματίζοντας οξυλουσιφερίνη [Εικόνα 2-6] [119].

Η λουσιφεράση *Firefly*, μια μονομερής πρωτεΐνη 61 kDa, καταλύει την οξειδωση λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας  $ATP \cdot Mg^{2+}$  ως συν-υπόστρωμα. Στη συμβατική δοκιμασία για τη λουσιφεράση, μια αναλαμπή φωτός παράγεται η οποία γρήγορα φθίνει μετά την αλληλεπίδραση του ενζύμου και των υποστρωμάτων.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λουσιφεράσης *Firefly* πραγματοποιήθηκε συνολικά σε όλα τα δείγματα στα οποία έχει εισαχθεί το ρεπλικόνιο *PFKWT*, δηλαδή μετά την παρέλευση των 144 ωρών.

- Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του πρωτοκόλλου, αρχικά παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (*Passive Lysis Buffer; PLB*). Προσθέτουμε 4 όγκους διαλύματος *PBS* σε 1 όγκο ρυθμιστικού διαλύματος λύσης 5x, και ακολουθεί εξισορρόπηση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης 1x σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.
- Προσθέτουμε 100  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος λύσης 1x (*PLB*) σε κάθε δείγμα/σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL).
- Τοποθετούμε τους σωλήνες των δειγμάτων σε συσκευή έντονης ανάδευσης για 10 λεπτά, ακολουθεί ανακίνηση με τη χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*) για 10-15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* έως 2 λεπτά στους 4°C.
- Τέλος μεταφέρεται το υπερκείμενο διάλυμα σε νέο σωλήνα προπυλενίου και τα δείγματα προς μέτρηση διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο φωτόμετρο, ώστε να εκτελέσει μια καθυστέρηση μέτρησης 2 δευτερολέπτων ακολουθούμενη από μια ένδειξη μέτρησης 10 δευτερολέπτων για δραστηριότητα λουσιφεράσης.
- Τοποθετούμε στο φωτόμετρο (*Glowmax*) ένα σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL), ο οποίος περιέχει μόνο το αντιδραστήριο προσδιορισμού λουσιφεράσης, και παίρνουμε μέτρηση τουλάχιστον τρεις φορές για τη μέτρηση του υποβάθρου (*Background*).
- Προσθέτουμε 50  $\mu\text{L}$  αντιδραστήριου δοκιμασίας λουσιφεράσης *Firefly* σε σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL).

- Μεταφέρουμε 10 μL προϊόντος λύσης κυττάρων από κάθε δείγμα σε σωλήνα, πραγματοποιούμε ήπια ανακίνηση με τη βοήθεια της πιπέτας, εισάγουμε το σωλήνα στην κατάλληλη υποδοχή στο φωτόμετρο, και ακολουθεί καταγραφή της μέτρησης.
- Η καταχώρηση των μετρήσεων αποθηκεύεται αυτόματα σε αρχείο *Excel*, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται επεξεργασία για την εξαγωγή αποτελεσμάτων.

#### B.7.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ *RENILLA*

Το σύστημα προσδιορισμού λουσιφεράσης *Renilla* αναπτύχθηκε για την ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων αναφοράς σε κύτταρα θηλαστικών, σε αναλογία με το προαναφερόμενο σύστημα προσδιορισμού λουσιφεράσης *Firefly*. Η λουσιφεράση *Renilla*, μια μονομερής πρωτεΐνη 36 kDa, καταλύει την κοιλεντεραζίνη (Coelenterate-Luciferin ή Coelenterazine) για την παραγωγή φωτός. Δεν απαιτείται μετα-μεταφραστική τροποποίηση για τη δραστηριότητά της και το ένζυμο μπορεί να λειτουργήσει ως γονίδιο αναφοράς αμέσως μετά τη μετάφραση. Το υπόστρωμα της λουσιφεράσης *Renilla*, η κοιλεντεραζίνη, επίσης εκπέμπει φως μέσω οξειδωσης ανεξάρτητης ενζύμων, μια διαδικασία γνωστή ως αυτοφωταύγεια.

Το σύστημα δοκιμασίας λουσιφεράσης *Renilla* έχει σχεδιαστεί για να παρέχει μια γρήγορη και ευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης λουσιφεράσης του *Renilla reniformis* και θεωρείται μια εναλλακτική λύση στα συστήματα ανίχνευσης της λουσιφεράσης *Firefly* του *Photinus pyralis*.

Ακολουθεί το πρωτόκολλο του συστήματος προσδιορισμού λουσιφεράσης *Renilla*:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης λουσιφεράσης *Renilla* (*Promega Corporation*) παρέχεται σε συμπύκνωση 5x. Προετοιμάζουμε επαρκή ποσότητα διαλύματος εργασίας 1x προσθέτοντας 1 όγκο 5x ρυθμιστικού διαλύματος λύσης *Renilla* σε 4 όγκους απεσταγμένου νερού και αναμιγνύουμε καλά.
- Έχοντας ξανά προηγηθεί ο κατάλληλος χειρισμός συλλογής υπερκείμενου και κυττάρων *Huh7* και *Huh1B* από τα φρεατια των πλακών όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα ηλεκτροδιάτρησης με τον ιό *JCR2A*, με τη μορφή ιζήματος σε σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL), προσθέτουμε 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης σε κάθε δείγμα.

- Τοποθετούμε τους σωλήνες των δειγμάτων σε συσκευή έντονης ανάδευσης για 10 λεπτά, ακολουθεί ανακίνηση με τη χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*) για 10-15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* έως 2 λεπτά στους 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο διάλυμα σε νέο σωλήνα.
- Παρασκευάζουμε επαρκή ποσότητα διαλύματος του υποστρώματος (*Renilla Luciferase Assay*) προσθέτοντας 1 όγκο 100x υποστρώματος σε 100 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος (*Renilla Luciferase Assay Buffer*) σε ένα σωλήνα (1.5 mL).
- Τοποθετούμε τους σωλήνες των δειγμάτων σε συσκευή έντονης ανάδευσης για 10 λεπτά, ακολουθεί ανακίνηση με τη χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*) για 10-15 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* έως 2 λεπτά στους 4°C.
- Τέλος μεταφέρεται το υπερκείμενο διάλυμα σε νέο σωλήνα και τα δείγματα προς μέτρηση διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επιλέγουμε το κατάλληλο πρόγραμμα στο φωτόμετρο, ώστε να εκτελέσει μια καθυστέρηση μέτρησης 2 δευτερολέπτων ακολουθούμενη από μια ένδειξη μέτρησης 10 δευτερολέπτων για δραστικότητα λουσιφεράσης *Renilla*.
- Τοποθετούμε στο φωτόμετρο (*Glowmax*) ένα σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL) ο οποίος περιέχει μόνο το αντιδραστήριο προσδιορισμού λουσιφεράσης *Renilla*, τουλάχιστον τρεις φορές για τη μέτρηση του υποβάθρου (*Background*).
- Προσθέτουμε 50  $\mu$ L αντιδραστηρίου δοκιμασίας λουσιφεράσης *Renilla* σε σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL).
- Μεταφέρουμε 10  $\mu$ L προϊόντος λύσης κυττάρων από κάθε δείγμα σε σωλήνα, πραγματοποιείται ήπια ανακίνηση με τη βοήθεια της πιπέτας, εισάγεται ο σωλήνας στην κατάλληλη υποδοχή στο φωτόμετρο, και ακολουθεί καταγραφή της μέτρησης.

### B.7.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη σε επίπεδο πρωτεΐνης είναι η λύση των κυττάρων ώστε να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος (*Whole Cell Extracts Buffer; WCE*), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον πίνακα [Πίνακας 2-4]. Αποτελεί ένα ασφαλές αντιδραστήριο το οποίο προκαλεί ρήξη των μεμβρανών χωρίς να αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες.

- Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με ψυχρό διάλυμα PBS εντός της φιάλης καλλιέργειας που περιέχει τα κύτταρα.
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 3 mL PBS, πραγματοποιούμε απόξεση των κυττάρων, μεταφορά τους σε σωλήνες (1.5 mL) και φυγοκέντρωση σε 14000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο διάλυμα και ενδεικτικά σε ίζημα κυττάρων το οποίο έχει προέλθει από μια φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> προσθέτουμε 50 mL WCE.
- Αναδιλύουμε το κυτταρικό ίζημα μέσω πιπεταρίσματος μέχρι να λιώσει. Πραγματοποιείται ανάδευση με τη χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*) για 10 δευτερόλεπτα και επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C και μεταφορά των υπερκείμενων σε καινούριους σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL).

Πίνακας 2-4 : Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος.

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Ρυθμιστικό διάλυμα WCE (5 mL)</b>
HEPES 1 M pH 7.9	50 μL
Χλωριούχο νάτριο 4 M	500 μL
Διθειοθρεϊτόλη (DTT) 0.5 M	5 μL
PMSF 0.25 M	25 μL
Γλυκερόλη 40 %	625 μL
Αναστολείς πρωτεασών	715 μL
Αναστολείς φωσφατασών	500 μL
Νερό	2.580 μL

#### B.7.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η πυρηνική εκχύλιση είναι η διαδικασία διαχωρισμού των πυρηνικών και κυτταροπλασματικών κλασμάτων ενός κυττάρου. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται αντί για πρωτόκολλα λύσης ολόκληρων κυττάρων και μπορεί να είναι χρήσιμη για τη μελέτη μορίων που αλληλεπιδρούν ειδικά με τον πυρήνα, όπως παράγοντες μεταγραφής που δεσμεύουν το DNA. Εν προκειμένω στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η πρωτεΐνη LSD-1. Πρόκειται για έναν επιγενετικό παράγοντα, ο οποίος συμμετέχει σε πολλές διαφορετικές και σημαντικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων είναι η τροποποίηση ιστονών. Επομένως παρουσιάζει πυρηνική εντόπιση και καθιστά απαραίτητη την πυρηνική εκχύλιση για την περαιτέρω μελέτη του.

Συνοπτικά το πρωτόκολλο της παρασκευής πυρηνικών εκχυλισμάτων από ευκαρυωτικά κύτταρα είναι το εξής:

- Πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με ψυχρό διάλυμα *PBS* εντός της φιάλης καλλιέργειας που περιέχει τα κύτταρα.
- Προστίθενται 3 mL *PBS* και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
- Απόξεση των κυττάρων και μεταφορά τους σε σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL). Φυγοκέντρηση σε 14000 *rpm* για 5 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος.
- Πραγματοποιήθηκε δεύτερη πλύση με 1.5 mL *PBS* και φυγοκέντρηση σε 14000 *rpm* για 5 λεπτά στους 4°C. Απόρριψη του υπερκειμένου και μέτρηση του όγκου των κυττάρων. Αναδιάλυση σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος A, η σύσταση του οποίου εμφανίζεται στον Πίνακα 2-5.
- Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και λύση των κυττάρων με τη βοήθεια της σύριγγας *Hamilton* για την αποτελεσματικότερη καταστροφή των συσσωματωμάτων.
- Φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 20 δευτερόλεπτα στους 4°C.
- Πραγματοποιείται αναδιάλυση του ιζήματος σε 2/3 του όγκου ρυθμιστικού διαλύματος A με ρυθμιστικό διάλυμα C, τα συστατικά του οποίου παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 2-5 και επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά στους 4°C.
- Τέλος, η πειραματική διαδικασία ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση στις 14000 *rpm* για 10 λεπτά στους 4°C και συλλογή του υπερκειμένου διαλύματος, στο οποίο περιέχονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες.



Πίνακας 2-5: Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων για την παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων.

Αντιδραστήρια	Ρυθμιστικό διάλυμα Α	Ρυθμιστικό διάλυμα C
HEPES 1 M pH 7.9	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Χλωριούχο μαγνήσιο 1 M	1.5 $\mu$ L	1.5 $\mu$ L
Χλωριούχο κάλιο 4 M	2.5 $\mu$ L	-
Χλωριούχο νάτριο 4 M	-	105 $\mu$ L
EDTA 0.5 M	-	0.4 $\mu$ L
Διθειοθρεϊτόλη (DTT) 0.5 M	1 $\mu$ L	-
PMSF 0.25 M	2 $\mu$ L	-
Γλυκερόλη 40%	-	625 $\mu$ L
Αναστολείς πρωτεασών	143 $\mu$ L	143 $\mu$ L
Αναστολείς φωσφατασών	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Νερό	740 $\mu$ L	5.1 $\mu$ L

#### B.8. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD ΓΙΑ ΤΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΟΛΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Η δοκιμασία *Bradford* βασίζεται στη χρήση της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250* ή *Coomassie Blue*. Υπό όξινες συνθήκες, το αντιδραστήριο *Coomassie G-250* είναι κατιονικό, κυρίως διπλά πρωτονιωμένο, και είναι κόκκινο, ενώ σε ουδέτερες συνθήκες είναι πράσινο και η ανιονική του μορφή είναι μπλε. Το αντιδραστήριο *Bradford* είναι ένα οξινισμένο διάλυμα *Coomassie G-250*. Γι 'αυτό και η χρωστική είναι αρχικά πρωτονιωμένη και κόκκινη.

Η αρχή στην οποία βασίζεται η δοκιμασία *Bradford* είναι ότι για να μπορέσει η χρωστική *Coomassie* να δεσμευτεί σταθερά με μια πρωτεΐνη, πρέπει να είναι διπλά πρωτονιωμένη. Όταν η βαφή έρχεται σε επαφή με μια πρωτεΐνη, το πρώτο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται σε φορτισμένες ομάδες στην πρωτεΐνη. Η χρωστική δεσμεύεται σε αυτές τις θέσεις, με τις ομάδες σουλφονικού οξέος να δεσμεύονται σε θετικά φορτισμένες αμίνες. Επιπλέον, υπάρχει έλξη λόγω των δυνάμεων του *Van der Waals*. Το σταθερά δεσμευμένο *Coomassie G-250* είναι πλέον μπλε στη μη πρωτονιωμένη του μορφή.

Η δοκιμασία *Bradford* περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, απαραίτητη τόσο για την ακριβέστερη ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης στα δείγματα όσο και την αφαίρεση οποιουδήποτε υπόβαθρο εξαιτίας παρεμβαλλόμενων ουσιών που μπορούν να μετατοπίσουν τις αναλογίες μεταξύ των τριών μορφών της χρωστικής ουσίας. Αναλυτικότερα, προσδιορίζουμε την

απορρόφηση στο κατάλληλο μήκος κύματος, διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων μιας πρότυπης ουσίας αναφοράς και στη συνέχεια κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης με βάση την περιεκτικότητα του κάθε διαλύματος. Έτσι αφού προσδιορίσουμε πειραματικά την απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίζουμε τη συγκέντρωσή του. Η αλβουμίνη ορού βοός (*Bovine Serum Albumin; BSA*) χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη αναφοράς για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης [120].

- Για τη δοκιμασία Bradford χρησιμοποιούμε πλάκα 96 φρεατίων [Πίνακας 2-6] και αρχικά παρασκευάζουμε το πρότυπο διάλυμα/διάλυμα εργασίας (*Working Stock; WS*), το οποίο απαιτείται για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και που αποτελείται από 3.5  $\mu\text{L}$  BSA αραιωμένο σε 346.5  $\mu\text{L}$  PBS 1x.
- Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη με την προσθήκη διαφορετικών αναλογιών του πρότυπου διαλύματος (0  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$ , 12  $\mu\text{L}$ , 18  $\mu\text{L}$ , 24  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ ) και PBS (συνολικός όγκος 120  $\mu\text{L}$ /φρεάτιο), σε δυο φρεάτια για κάθε αναλογία (*Duplicate*), όπως φαίνεται στον Πίνακα 2-6, ώστε να χρησιμοποιηθεί ο μέσος ορός και να εξομαλυνθούν τα λάθη λόγω πιπιταρίσματος.
- Για κάθε δείγμα, επίσης χρησιμοποιούνται δυο φρεάτια στα οποία αρχικά τοποθετήθηκαν 119  $\mu\text{L}$  PBS και έπειτα 1  $\mu\text{L}$  από το δείγμα (αραίωση 1:120).
- Τέλος, προστίθενται 30  $\mu\text{L}$  από το αντιδραστήριο *Bradford* σε κάθε φρεάτιο (αραίωση 1:5).
- Ακολουθεί ανάδευση του περιεχομένου των φρεατίων με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μέτρηση των απορροφήσεων στα 595 nm στο φασματοφωτόμετρο σάρωσης μικροπλάκας 96 φρεατίων (*Microplate Reader Model 680; BioRad Laboratories*) και υπολογισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης του κάθε δείγματος με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Πίνακας 2-6: Σύσταση πλάκας 96 φρεατίων δοκιμασίας Bradford.

A	0	120 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 1/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 1 / 119 $\mu\text{L}$ PBS
B	6 $\mu\text{L}$ WS (5 $\mu\text{g}$ )	114 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 2/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 2 / 119 $\mu\text{L}$ PBS
C	12 $\mu\text{L}$ WS (10 $\mu\text{g}$ )	108 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 3/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 3/ 119 $\mu\text{L}$ PBS
D	18 $\mu\text{L}$ WS (15 $\mu\text{g}$ )	102 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 4/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 4/ 119 $\mu\text{L}$ PBS
E	24 $\mu\text{L}$ WS (20 $\mu\text{g}$ )	96 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 5/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 5/ 119 $\mu\text{L}$ PBS
F	30 $\mu\text{L}$ WS (25 $\mu\text{g}$ )	90 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 6/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 6/ 119 $\mu\text{L}$ PBS
G			1 $\mu\text{L}$ δείγμα 7/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 7/ 119 $\mu\text{L}$ PBS
H			1 $\mu\text{L}$ δείγμα 8/ 119 $\mu\text{L}$ PBS	1 $\mu\text{L}$ δείγμα 8/ 119 $\mu\text{L}$ PBS

## B.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Η *SDS-PAGE* ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανάλυση πρωτεϊνών που περιέχονται σε σύνθετα κυτταρικά εκχυλίσματα. Αυτό το σύστημα ηλεκτροφόρησης αποτελείται στην πραγματικότητα από δύο πηκτώματα, ένα πήκτωμα διαχωρισμού (*Running Gel*) στο οποίο οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τα μοριακά τους βάρη (MWs) και ένα πήκτωμα επιστοίβαξης (*Stacking Gel*) στο οποίο οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται πριν εισέλθουν στη διαχωριστική γέλη. Τροποποιήσεις στη σύνθεση του πηκτώματος επιστοίβαξης, του πηκτώματος διαχωρισμού και του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης παράγουν ένα σύστημα το οποίο μπορεί να έχει υψηλή ικανότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών σύμφωνα με τα μοριακά τους βάρη.

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών σχηματίζονται από τον πολυμερισμό ακρυλαμιδίου και N, N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου με τις ομάδες βινυλίου του ακρυλαμιδίου και του δισακρυλαμιδίου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παράγονται από τον καταλύτη, υπερθειικό αμμώνιο (AMPS), όταν αυτό αντιδρά με ένα δεύτερο καταλύτη, N, N, N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν καλύτερα μετά από την αναγωγή των δισουλφιδικών τους δεσμών, γι αυτό και θερμαίνονται στους 100°C για 3 λεπτά παρουσία β-μερκαπτοαιθανόλης και SDS [121].

Πίνακας 2-7: Συστατικά διαλυμάτων διαχωρισμού και επιστοίβαξης για την παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών μορίων.

Αντιδραστήριο	Διάλυμα Διαχωρισμού 10%	Αντιδραστήριο	Διάλυμα Επιστοίβαξης 5%
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	4 mL	<i>dH<sub>2</sub>O</i>	3.4 mL
30% μίγμα ακρυλαμιδίου	3.3 mL	30% μίγμα ακρυλαμιδίου	0.83 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 mL	1.5 M Tris pH 6.8	0.63 mL
10% SDS	0.1 mL	10% SDS	0.05 mL
10% AMPS	0.1 mL	10% AMPS	0.05 mL
TEMED	0.004 mL	TEMED	0.005 mL

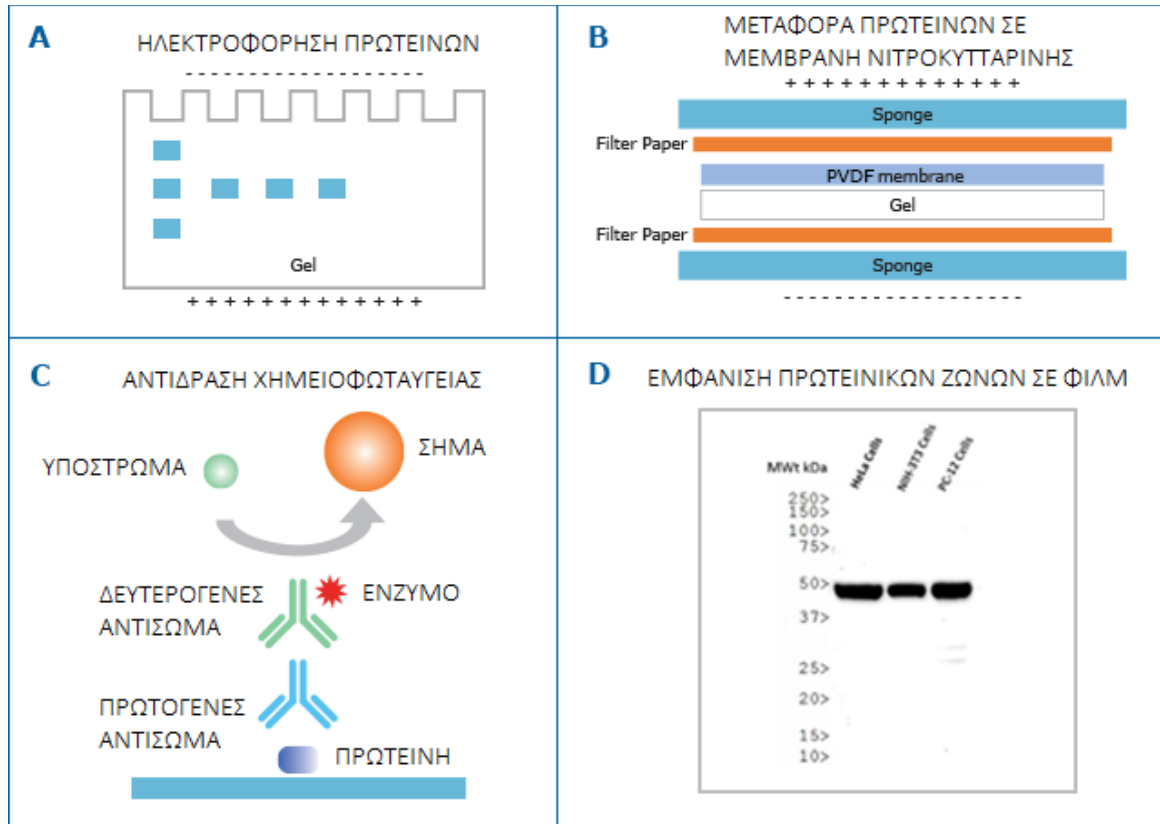
- Το πρωτόκολλο της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ξεκινάει με τη συναρμολόγηση της συσκευής-βάσης στην οποία θα στηριχτούν τα τζαμάκια μεταξύ των οποίων θα εκχυθεί το *gel* της ηλεκτροφόρησης (*Running & Stacking gel*).
- Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα διαχωρισμού το οποίο τοποθετείται στη συσκευή με τη βοήθεια σύριγγας 60 mL. Αφήνεται να πολυμεριστεί περίπου 30-50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να προκύψει το πήκτωμα διαχωρισμού [Πίνακας 2-7].
- Στη συνέχεια, παρασκευάζεται το διάλυμα επιστοίβαξης, το οποίο τοποθετείται με σύριγγα των 10 mL στη συσκευή και αμέσως μετά ακολούθησε γρήγορη βύθιση των χτενιών (1.5 mm) εντός αυτού και αφήνεται το διάλυμα να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε να προκύψει το πήκτωμα επιστοίβαξης [Πίνακας 2-7].
- Αφαιρούμε το χτενάκι και τοποθετούμε το ασυνεχές πήκτωμα σε συγκεκριμένο εκμαγείο εντός της συσκευής ηλεκτροφορησης.
- Προσθετούμε περίπου 1000 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης *Tris-γλυκίνης* τόσο στην άνοδο, όσο και στην κάθοδο.
- Ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων, προσθέτοντας 1/6 του όγκου του δείγματος που τελικά φορτώνεται, διάλυμα χρωστικής *Dye 6x* και πραγματοποιείται θέρμανση για 3 λεπτά στους 100°C.
- Τέλος, φορτώνονται τα δείγματα και ένας μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (*Benchmark Invitrogen*) και τίθεται η συσκευή σε λειτουργία με την εφαρμογή τάσης ρεύματος στα 120 V για 2 1/2 ώρες.

## B.10. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Η ανάλυση κατά *Western* είναι μια βασική τεχνική στην Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε σύνθετο πρωτεϊνικό μίγμα που προκύπτει μετά τη λύση κυττάρων. Η διαδικασία βασίζεται σε τρία στοιχεία-κλειδιά για την επίτευξη αυτού του στόχου:

- Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών κατά μέγεθος χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE*.
- Η μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών από το πήκτωμα ηλεκτροφορησης στην επιφάνεια μια μεμβράνης νιτροκυτταρίνης.

- Η ειδική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης στόχου με τη βοήθεια αντισωμάτων. Μόλις ανιχνευτεί η πρωτεΐνη θα εμφανιστεί ως ζώνη σε μια μεμβράνη, ή σε ένα φιλμ ακτίνων X ή ένα σύστημα απεικόνισης [Εικόνα 2-7].



Εικόνα 2-7: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων ανάλυσης κατά Western. (Novus Biologicals)

Αναλυτικότερα τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας είναι τα ακόλουθα:

- Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου (PAGE), το επόμενο στάδιο είναι η μεταφορά των πρωτεϊνών από τη γέλη σε μια μεμβράνη υποστήριξης, η οποία συνήθως αποτελείται από μια χημικά αδρανής ουσία, όπως νιτροκυτταρίνη ή διφθοριούχο πολυβινυλιδένιο (PVDF). Οι πρωτεΐνες ακινητοποιούνται στις αντίστοιχες σχετικές μεταναστευτικές τους θέσεις στη μεμβράνη σε σχέση με τις θέσεις στις οποίες βρίσκονταν στο πηκτώμα της ηλεκτροφόρησης όταν σταμάτησε η διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου αυτού.
- Για το στάδιο της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πηκτώμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Protran BA, 100%, με μέγεθος πόρου 0.45  $\mu\text{m}$  ή 0.2  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare Life Sciences) απομακρύνεται με τη βοήθεια νυστεριού το πηκτώμα επιστοιβάξης.

- Ακολουθεί διάβρεξη για τα φύλλα στυπόχαρτου (*Whatmann*), τα σφουγγάρια, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα διαχωρισμού μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (39 mM γλυκίνης, 48 mM *Tris*, 0.037% (κ.β.) *SDS*, 20% (κ.ό.) μεθανόλη).
- Συναρμολογείται το σάντουιτς στην κασέτα ανάλυσης κατά *Western*, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να μεταναστεύουν προς τη μεμβράνη. Στην πλαστική κασέτα, στη μαύρη της πλευρά (αρνητικός πόλος) αρχικά τοποθετείται ένα διαβρεγμένο σφουγγάρι, στη συνέχεια δυο φύλλα στυπόχαρτου, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια πάλι δυο φύλλα στυπόχαρτου και το δεύτερο σφουγγάρι στην κόκκινη πλευρά. Η κασέτα η οποία έχει συναρμολογηθεί, πρέπει να συγκρατεί το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης σε σταθερή επαφή με τη μεμβράνη χωρίς να συμπιέζεται.
- Τοποθετείται η κασέτα εντός της συσκευής μεταφοράς και προστίθεται αρκετή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (*Transfer Buffer*).
- Συνδέουμε τη συσκευή στο τροφοδοτικό ρεύματος και ρυθμίζουμε την ένταση του ρεύματος σταθερά στα 300 mA για 1 ώρα στους 4°C.
- Μετά την ηλεκτρομεταφορά, είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι έχουν μεταφερθεί όλες οι πρωτεΐνες από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια χρωστικών ολικών πρωτεϊνών, οι οποίες βάφουν τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Η χρωστική *Ponceau S* είναι καταρχάς, συμβατή με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, αφαιρείται εύκολα με νερό και θεωρείται ως μια ήπια χρωστική που δεν παρεμβαίνει με τα ακόλουθα βήματα ανοσολογικής ανίχνευσης των πρωτεϊνών.

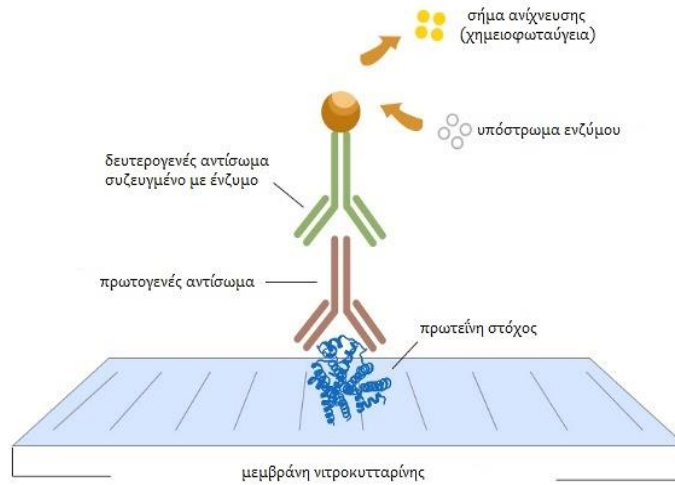
#### B.11. ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Μετά την ανάλυση κατά *Western*, η πρωτεΐνη-στόχος θα ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας κατάλληλα προσαρμοσμένα και επισημασμένα αντισώματα [Εικόνα 2-8]. Το στάδιο ανοσοανίχνευσης περιλαμβάνει τα παρακάτω βασικά βήματα:

- Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, κατόπιν χρώσης με τη χρωστική *Ponceau S* ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος κορεσμού [5% κ.β. χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε *TBST* 1x ή 3% ή 5% *BSA* σε *TBST* 1x].

- Πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με 10 mL διαλύματος κορεσμού για ώρα, υπό συνεχή ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα κορεσμού έχει ως στόχο την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων αναγνώρισης του αντισώματος.
- Στη συνέχεια ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης τρεις φορές με διάλυμα έκπλυσης [*TBST 1x* ή 1% (κ.β.) χωρίς λιπαρά αφυδατωμένο γάλα σε *TBST 1x* ή 0.3% *BSA* σε *TBST 1x*].
- Προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα (έναντι της LSD-1, ή της ιικής πρωτεΐνης NS5A ή της Core, ή της ακτίνης ή της ιστόνης H3 που είναι οι πρωτεΐνες αναφοράς, για τα κυτταρικά και τα πυρηνικά εκχυλίσματα αντίστοιχα) υπό συνεχή ανακίνηση για 16-18 ώρες στους 4°C. Οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται στα πειράματα Western της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 2-8]. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης. Οι εκπλύσεις διαρκούν 10 λεπτά και επαναλαμβάνονται τρεις φορές.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα (*anti-rabbit* ή *anti-mouse* ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα) για μια ώρα, υπό συνεχή ανακίνηση, σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα αυτό είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση μαύρου ραπανιού (*Horse Radish Peroxidase*). Τα *anti-mouse* και *anti-rabbit* αντισώματα συνήθως χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:5000 και διαλύονται σε διάλυμα κορεσμού. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης. Οι εκπλύσεις διαρκούν 10 λεπτά και επαναλαμβάνονται τρεις φορές.
- Τέλος, επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το διάλυμα δυο συστατικών (σε ίση αναλογία, 1 mL - 2 mL τελικό όγκο ανά μεμβράνη) της χημειοφωταύγειας ECL (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*).
- Απομακρύνεται η μεγαλύτερη του ποσότητα διαλύματος χημειοφωταύγειας κρατώντας τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κάθετα, και έπειτα τοποθετείται σε ειδική κασετίνα εμφάνισης.
- Στο σκοτεινό θάλαμο, επαρκές κομμάτι φιλμ, όμοιων διαστάσεων με τη μεμβράνη, τοποθετείται πάνω της και σφραγίζεται η κασετίνα.
- Το φιλμ παραμένει στην κασετίνα από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι μερικά λεπτά ανάλογα την ένταση του αντισώματος. Στη συνέχεια εμβαπτίζεται το φιλμ στο διάλυμα εμφάνισης (*Developer*) για μερικά δευτερόλεπτα (10-20 secs) έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες και στη συνέχεια στο διάλυμα μονιμοποίησης (*Fixer*). Τέλος, το φιλμ πλένεται με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ



Εικόνα 2-8: Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών. (Elascience)

Πίνακας 2-8: Πίνακας πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Αντίσωμα	Οργανισμός προέλευσης	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	Εταιρεία
LSD-1 (C69G12) Rabbit mAb	Κουνέλι	5% κ.ό. BSA σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:2000)	Cell Signaling Technology
Histone H3 (D1H2) XP® Rabbit mAb	Κουνέλι	5% κ.ό. BSA σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:2000)	Cell Signaling Technology
Hep C cAg Antibody (C7-50)	Ποντίκι	5% κ.ό. BSA σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:200)	Santa Cruz Biotechnology
NS5A πολυκλωνικό	Κουνέλι	5% κ.ό. BSA σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:500)	
Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated	Κατσίκα	5% κ.ό. αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:5000)	Cell Signaling Technology
Goat anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated, H + L	Κατσίκα	5% κ.ό. αφυδατωμένο γάλα χωρίς λιπαρά σε 1x TBS, 0.1% Tween 20 (1:5000)	Cell Signaling Technology



## B.12. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Η απόκτηση RNA υψηλής ποιότητας είναι το πρώτο και συχνά το πιο κρίσιμο βήμα στην εκτέλεση πολλών μοριακών τεχνικών όπως η αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής (*Reverse Transcription; RT*), η ανάλυση μεταγραφώματος χρησιμοποιώντας αλληλούχιση επόμενης γενιάς, ανάλυση συστοιχίας, ανάλυση κατά Southern και κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA. Η διαδικασία απομόνωσης RNA πρέπει να περιλαμβάνει μερικά σημαντικά βήματα για τον πιο αποτελεσματικό καθαρισμό του RNA.

Η εύρεση της καταλληλότερης μεθόδου λύσης κυττάρων είναι σημαντική για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και της ποιότητας του RNA. Είναι εξαιρετικής σημασίας ο λυτικός παράγοντας να έρχεται σε επαφή με τα κυτταρικά περιεχόμενα τη στιγμή που τα κύτταρα διαρρηγνύονται.

Οι μέθοδοι οργανικής εκχύλισης θεωρούνται η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την απομόνωση RNA. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το δείγμα ομογενοποιείται σε ένα διάλυμα που περιέχει φαινόλη και το δείγμα κατόπιν φυγοκεντρείται. Κατά τη φυγοκέντρηση, το δείγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: την κατώτερη οργανική φάση, τη μεσαία φάση που περιέχει μετουσιωμένες πρωτεΐνες και γενωμικό DNA (gDNA), και την ανώτερη υδατική φάση που περιέχει RNA. Η ανώτερη υδατική φάση ανακτάται και το RNA συλλέγεται με καθίζηση αλκοόλης και επανενυδάτωση.

- Η εκχύλιση του RNA πραγματοποιείται με τη χρήση του αντιδραστηρίου *NucleoZol* (*Takarabio*).
- Με τη βοήθεια τρυψίνης ανασηκώνουμε τα κύτταρα από τη φιάλη καλλιέργειας, μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε σωλήνες προπυλενίου (1.5 mL) και φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 3 λεπτά.
- Ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος, αναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με PBS για καλύτερη έκπλυση και ξαναφυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 3 λεπτά.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο ξανά και προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα αντιδραστηρίου *NucleoZol* σύμφωνα με το πρωτόκολλο (500  $\mu$ L για φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup>, 150  $\mu$ L για φιάλη 25 cm<sup>2</sup>) και ακολουθεί αναδιάλυση του ιζήματος με τη βοήθεια πιπέτας.
- Στη συνέχεια προστίθενται 200  $\mu$ L απεσταγμένου νερού για κάθε 500  $\mu$ L *NucleoZol* και πραγματοποιείται ανακίνηση με χρήση συσκευής ανάδευσης (*Vortex*) για 15 δευτερόλεπτα, και αφήνεται το κυτταρικό διάλυμα για επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 16000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά από το υπερκείμενο ποσότητα ίσης με της ποσότητας του *NucleoZol* που προστέθηκε αρχικά για τη διάλυση του ιζήματος σε νέο σωλήνα προπυλενίου (1.5 mL) και προσθήκη ίσου

όγκου ισοπροπανόλης 100%. Αν το ίζημα έχει προέλθει από ένα φρεάτιο πλάκας 6 φρεατίων, τότε προστίθεται και γλυκογόνο σε αναλογία 1:40.

- Επιάζουμε για 14-16 ώρες στους -20°C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση χωρίς απόψυξη στα 12000 g για 15 λεπτά στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος.
- Το ίζημα ξεπλένεται δυο φορές με προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75%, στη συνέχεια φυγοκέντρηση στα 8000 g για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος.
- Τέλος, πραγματοποιείται ξήρανση του ιζήματος σε συσκευή *SpeedVac* για 5 λεπτά και επαναδιάλυση του RNA με απεσταγμένο νερό 50 μL (για φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup>).

### B.13. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Ποικίλες τεχνικές μοριακής βιολογίας έχουν καταστεί διαθέσιμες τα τελευταία χρόνια. Μια από τις πιο επαναστατικές τεχνικές όσον αφορά στην ανάλυση νουκλεϊνικού οξέος είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1985. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην εκθετική ενίσχυση ειδικών θραυσμάτων DNA, με αποτέλεσμα εκατομμύρια αντίγραφα να μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρότυπα για διαφορετικές αναλύσεις. Η PCR μπορεί να συνδυαστεί με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT) προκειμένου να παραχθεί cDNA από RNA (RT-PCR).

Η RT-PCR παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης των επίπεδων διαφορικής γονιδιακής μεταγραφής σε κύτταρα ή ιστούς. Το πρότυπο εκκίνησης για μια αντίδραση PCR μπορεί να είναι DNA ή RNA. Το DNA είναι συνήθως το κατάλληλο πρότυπο για τη μελέτη του γονιδιώματος του κυττάρου ή του ιστού (όπως σε κληρονομικές γενετικές ασθένειες, σωματική μετάλλαξη σε όγκο ή σωματική αναδιάταξη στα λεμφοκύτταρα) και για την ανίχνευση του DNA ιών. Για πληροφορίες σχετικά με τη γονιδιακή έκφραση ενός κύτταρου ή ιστού ή η παρουσία γονιδιωματικού RNA σε ρετροϊό όπως ο HIV, το RNA είναι το κατάλληλο πρότυπο. Το RNA μπορεί να είναι καλύτερο πρότυπο (*Template*) από το γονιδιωματικό DNA στην περίπτωση ανίχνευσης δομικών αλλαγών σε μεγάλα γονίδια, δεδομένου ότι ενισχύουν το RNA το οποίο έχει υποστεί μάτισμα και προορίζεται για μεταγραφή. Έτσι μειώνεται σημαντικά το μήκος του DNA που απαιτείται για χειρισμό χωρίς να χαθούν οι κώδικες περιοχές όπου συνήθως αναμένεται να εμφανιστούν κλινικά σημαντικές διαγραφές [122].

Στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (*Moloney-Murine Leukemia Virus*).

Πρόκειται για μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση cDNA από μεγάλα μόρια mRNA (>5 Kbp). Έχει προκύψει ως προϊόν του γονιδίου *pol* του M-MLV και αποτελείται από μία μοναδική υπομονάδα μοριακού βάρους 71 kDa. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια ως εξής:

- Αρχικά προσθέτουμε σε σωλήνες για PCR των 200  $\mu$ L, την ποσότητα RNA σε  $\mu$ L ίση με 1  $\mu$ g, των τυχαίων εκκινητών (*PDN6*) και του νερού όπως εμφανίζονται στον πίνακα [Πίνακας 2-9].

Πίνακας 2-9: Σύσταση αντιδράσεων σταδίου I και II της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Αντιδραστήριο	Αντίδραση σταδίου I	Αντιδραστήριο/Master Mix	Αντίδραση σταδίου II
Τυχαίοι εκκινητές ( <i>PDN6</i> )	1 $\mu$ L	5x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	4 $\mu$ L
1 $\mu$ g RNA	x $\mu$ L	dNTPs	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O ελεύθερο RNAσών	ως τελικό όγκο 13.5 $\mu$ L	RNAsin (αναστολέας ριβονουκλεασών)	0.5 $\mu$ L
		M-MLV Αντίστροφη μεταγραφάση	1 $\mu$ L
		Τελικός όγκος	13.5 $\mu$ L + 6.5 $\mu$ L = 20 $\mu$ L

- Κατόπιν τοποθετούμε τους σωλήνες προπυλενίου εντός θερμοκυκλοποιητή για θέρμανση στους 65°C για 5 λεπτά με σκοπό την αποδιάταξη του RNA και την υβριδοποίηση των εκκινητών.
- Αφαιρούμε τους σωλήνες από τη συσκευή και προσθέτουμε 6.5  $\mu$ L/δείγμα από το *Master Mix* που έχουμε παρασκευάσει και του οποίου η σύσταση παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα [Πίνακας 2-9].
- Ακολουθεί επώαση σε πάγο για 5 λεπτά.
- Τέλος, πραγματοποιούμε ήπια ανάδευση και επανατοποθετούμε τους σωλήνες PCR στον θερμοκυκλοποιητή, στις συνθήκες κατάλληλου προγράμματος για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Οι συνθήκες παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 2-10].

Πίνακας 2-10: Συνθήκες προγράμματος RT PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη	70°C	5 λεπτά
Πολυμερισμός	37°C	60 λεπτά
Απενεργοποίηση ενζύμου	94°C	2 λεπτά
Διατήρηση	4°C	∞

#### B.14. PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ

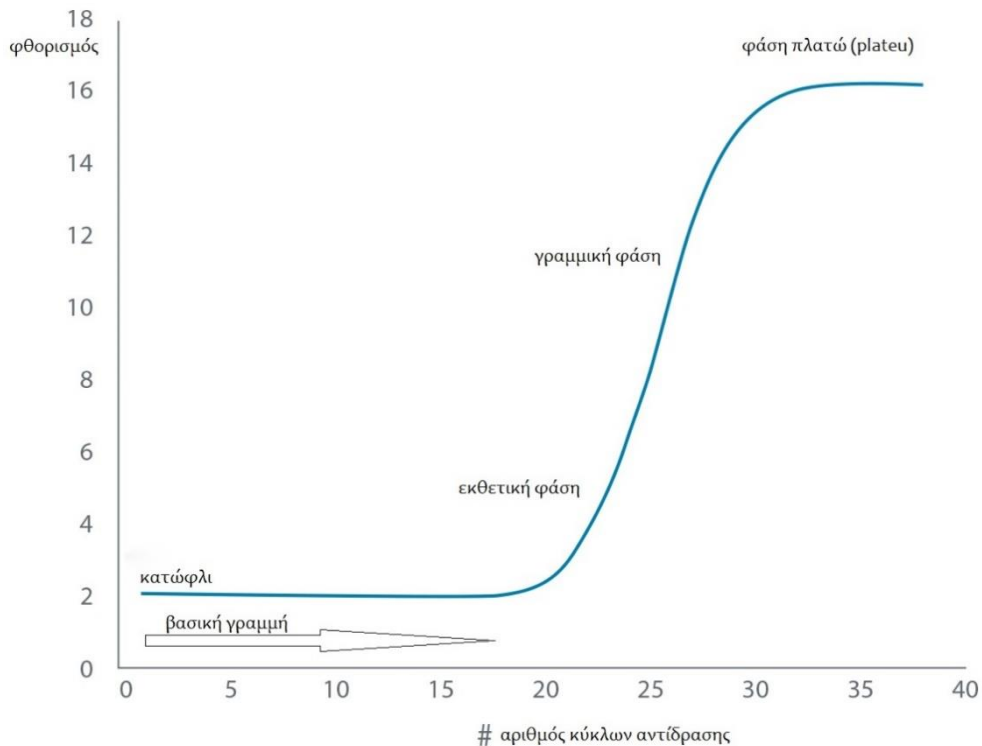
Η PCR θεωρείται αυτή τη στιγμή ως η πιο χρήσιμη τεχνική που εφαρμόζεται στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ικανότητά της μεθόδου να ενισχύει μια αλληλουχία νουκλεϊνικού οξέος στόχου (γενωμικό DNA ή συμπληρωματικό cDNA) κατά μερικά εκατομμύρια φορές. Όταν συνδυάζεται με ποσοτική PCR (τυπική ποσοτική ανίχνευση PCR σε πραγματικό χρόνο; qPCR), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της αρχικής ποσότητας σε ένα δείγμα. Δεδομένου ότι τα προϊόντα ανιχνεύονται καθώς προχωρά η αντίδραση, η qPCR έχει ένα πολύ μεγαλύτερο δυναμικό εύρος ανάλυσης από τη συμβατική PCR τελικού σημείου. Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο και η επακόλουθη ανίχνευση αμπλικονίου διεξάγεται σε μορφή κλειστού σωλήνα η οποία εξαλείφει την ανάγκη για χειρισμό μετά την PCR, όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής και μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο επιμόλυνσης.

Όταν πραγματοποιείται qPCR, χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς ως έμμεσος τρόπος μέτρησης της ποσότητας νουκλεϊνικού οξέος που υπάρχει κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ενίσχυσης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι άμεσα ανάλογη με την ποσότητα των εκθετικά συσσωρευμένων προϊόντων PCR (αμπλικόνια) που παράγονται κατά τη διάρκεια των επαναλαμβανόμενων φάσεων της αντίδρασης.

Η χρήση χρωστικής σύνδεσης σε δίκλωνο DNA (dsDNA), όπως η SYBR® Green, αντιπροσωπεύει την απλούστερη μορφή χημικής ανίχνευσης. Όταν είναι ελεύθερη σε διάλυμα ή είναι παρόν μόνο μονόκλωνο DNA (ssDNA), η χρωστική SYBR Green εκπέμπει φως σε χαμηλή ένταση σήματος. Καθώς η PCR εξελίσσεται και η ποσότητα του δίκλωνου DNA αυξάνεται, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στα αμπλικόνια και επομένως η ένταση του σήματος αυξάνεται και μπορεί να ανιχνευθεί η αύξηση της εκπομπής φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο από ένα τροποποιημένο θερμοκυκλοποιητή [Εικόνα 2-10] [123]. Η χρωστική SYBR Green I είναι μια χρωστική κυανίνης, μοριακής μάζας 509.73 g/mol, η οποία δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και σε μικρότερο βαθμό σε μονόκλωνο DNA και σε RNA. Το

σύμπλοκο SYBR Green-DNA που προκύπτει απορροφά το μπλε φως (497 nm) και εκπέμπει πράσινο (520 nm) [124].

Το λογισμικό του υπολογιστή (*Rotor Gene*) κατασκευάζει διαγράμματα ενίσχυσης χρησιμοποιώντας τα δεδομένα της εκπομπής φθορισμού που συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης PCR. Στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 2-9] παρουσιάζεται ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα ενίσχυσης όπου ορίζονται οι σημαντικοί όρους που συνδέονται με αυτό.

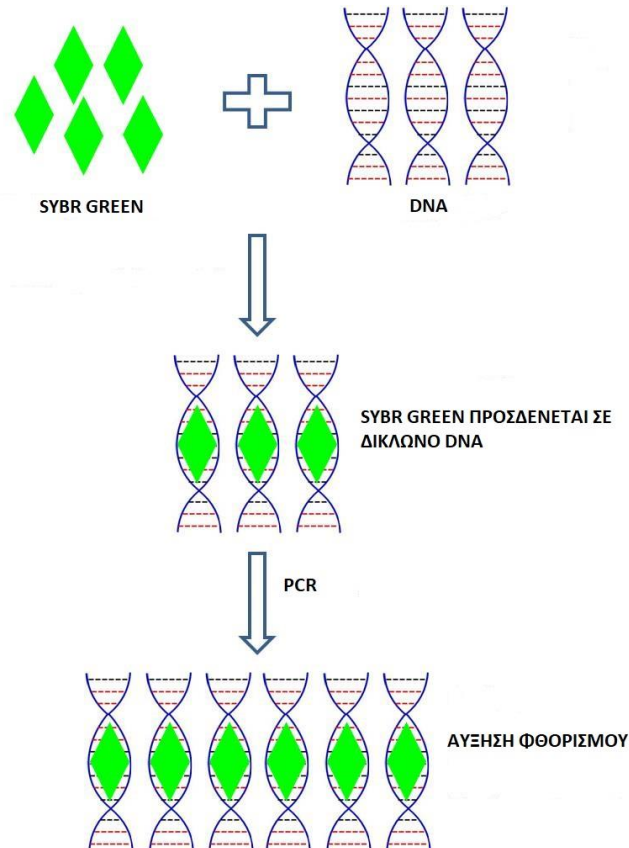


Εικόνα 2-9: Διάγραμμα πορείας σταδίων ενίσχυσης PCR πραγματικού χρόνου.

- **Βασική γραμμή (Baseline):** η βασική γραμμή ορίζεται ως οι κύκλοι PCR στους οποίους το φθορίζον σήμα ενός ανιχνευτή συσσωρεύεται αλλά βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου.
- **Κατώφλι (Threshold):** Επιλέγεται ένας αυθαίρετος ουδός από τον υπολογιστή, με βάση τη μεταβλητότητα της βασικής γραμμής (*Baseline*). Ένα φθορίζον σήμα που ανιχνεύεται παραπάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό σήμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του κύκλου κατωφλίου (*Ct*) για ένα δείγμα.
- **Ct:** ορίζεται ως ο αριθμός κλασματικού κύκλου PCR στον οποίο ο φθορισμός του ανιχνευτή είναι μεγαλύτερος από το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης (δηλ. το κατώφλι). Η τιμή *Ct* είναι μια βασική αρχή της

PCR σε πραγματικό χρόνο και αποτελεί ουσιαστικό στοιχείο για την παραγωγή ακριβών και αναπαραγωγίσιμων δεδομένων.

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται με σχετική ποσοτικοποίηση, η οποία βασίζεται σε εσωτερικά γονίδια αναφοράς. Η ποσότητα του mRNA του προς μελέτη γονιδίου συγκρίνεται ως προς την ποσότητα του mRNA του γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κανονικοποίηση (*Normalization*) και το γονίδιο αναφοράς ονομάζεται γονίδιο κανονικοποίησης (*Normalizing gene*). Συνήθως για το ρόλο αυτό επιλέγονται βιοσυνθετικά γονίδια (*Housekeeping genes*), τα οποία είναι γονίδια που χρησιμοποιούνται σε ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου και χαρακτηρίζονται από σταθερή και απανταχού κυτταρική έκφραση. Το γονίδιο που επιλέξαμε ως γονίδιο αναφοράς είναι το *18S rRNA*.



Εικόνα 2-10: Μηχανισμός δράσης χρωστικής SYBR Green κατά την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου. (Safdar Ali et al., 2011)

Στους παρακάτω πίνακες [Πίνακες 2-11 – 2-15] φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε αντίδραση, καθώς και οι συνθήκες της κάθε αντίδρασης *Real-Time PCR*:

#### A. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LDS-1 ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Πίνακας 2-11: Αναλυτική ποσοτική περιγραφή της αντίδρασης qPCR για το γονίδιο της LSD-1.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μL)
LSD-1 Forward primer (100 μM)	0.08 (400 nM)
LSD-1 Reverse primer (100 μM)	0.08 (400 nM)
SYBR Green (2X)	10
H <sub>2</sub> O	5.84
cDNA	4
Τελικός όγκος αντίδρασης	20

Πίνακας 2-12: Αναλυτική περιγραφή των συνθηκών της αντίδρασης qPCR για το γονίδιο της LSD-1.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95° C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95° C	15 δευτερόλεπτα	40
Υβριδισμός	55° C	15 δευτερόλεπτα	
Πολυμερισμός	72° C	15 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72° C	5 λεπτά	1
Διατήρηση	4° C	-	-

#### B. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ 18S rRNA ΓΟΝΙΔΙΟΥ

Πίνακας 2-13: Αναλυτική ποσοτική περιγραφή της αντίδρασης qPCR για το γονίδιο 18S.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μL)
18S rRNA Forward primer (100 μM)	0.08 (400 nM)
18S rRNA Reverse primer (100 μM)	0.08 (400 nM)
SYBR Green (2X)	10
H <sub>2</sub> O	5.84
cDNA	4
Τελικός όγκος αντίδρασης	20

Πίνακας 2-14: Αναλυτική περιγραφή των συνθηκών και σταδίων αντίδρασης qPCR για το γονίδιο της 18S.

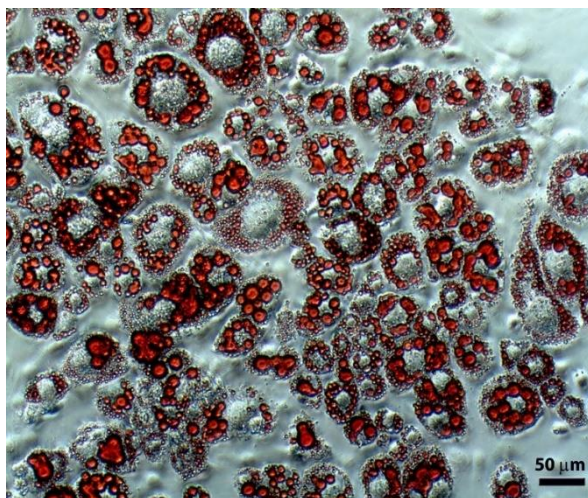
Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	95° C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95° C	15 δευτερόλεπτα	30
Υβριδισμός	55° C	20 δευτερόλεπτα	
Πολυμερισμός	72° C	20 δευτερόλεπτα	
Τελικός πολυμερισμός	72° C	5 λεπτά	1
Διατήρηση	4° C	-	-

#### Γ. ΟΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Πίνακας 2-15 : Αλληλουχίες εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν και το μέγεθος τους σε ζεύγη βάσεων.

Εκκινήτης	Αλληλουχία	Μέγεθος qPCR προϊόντος
qLSD-1-Forward (100 μM)	5'-GCTCGGGGCTCTTATTCC-3'	224 bp
qLSD-1-Reverse (100 μM)	5'-ATTGCAGACCAGTTTTTGGG-3'	224 bp
q18S-Forward (100 μM)	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'	224 bp
q18S-Reverse (100 μM)	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'	224 bp

#### B.15. ΧΡΩΣΗ OIL RED O



Εικόνα 2-11: Λιποσταγονίδια μετά από χρώση με Oil Red O. (Metabolic Systems Biology Lab, UC San Diego Jacobs school of engineering)

Η χρωστική *Oil Red O* είναι μια λιποδιαλυτή χρωστική που χρησιμοποιείται για τη χρώση ουδέτερων τριγλυκεριδίων και λιπιδίων σε κρουστομές και μερικών λιποπρωτεϊνών σε παρασκευάσματα παραφίνης. Στην ιστολογία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα υπέρ-κορεσμένο διάλυμα *Oil Red O* σε ισοπροπανόλη για τη χρώση του λίπους στον ιστό [Εικόνα 2-11]. Όπως και οι περισσότερες χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση λιπιδίων, η χρωστική *Oil Red O* δε μπορεί να σχηματίσει δεσμούς με λιπιδικά συστατικά. Είναι στην πραγματικότητα μια χρωστική



ουσία που λειτουργεί βάσει της λιποδιαλυτότητας της και η τεχνική αντιπροσωπεύει μια φυσική μέθοδο χρώσης [125].

Η διαδικασία χρώσης με *Oil Red O* των ηπατικών κυττάρων που ακολουθούμε είναι η εξής:

- Η χρωστική *Oil Red O* διατίθεται σε μορφή σκόνης. Προκειμένου να παρασκευάσουμε το διάλυμα στοκ εργασίας, διαλύουμε 0.3 g χρωστικής σε 100 mL ισοπροπανόλης και το αφήνουμε τουλάχιστον για 8 ώρες υπό συνεχόμενη ανάδευση.
- Τέλος, φιλτράρουμε το διάλυμα που προέκυψε με φύλλο στυπόχαρτου (*Whatmann*) και αυτό χρησιμοποιείται ως το αποθεματικό μας διάλυμα το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Από την προηγούμενη μέρα, κύτταρα έχουν επιστρωθεί σε κατάλληλες καλυπτρίδες εντός φρεατίων πλακών κυτταροκαλλιέργειας (π.χ. *24 well plate*), προκειμένου να έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια τους.
- Αφαιρείται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με διάλυμα *PBS*.
- Το διάλυμα *PBS* δεν αφαιρείται τη δεύτερη φορά και η πλάκα κυτταροκαλλιέργειας μεταφέρεται σε απαγωγό προκειμένου να ακολουθήσει η μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλίνης.
- Η φορμαλίνη είναι ιδιαίτερα τοξική για το αναπνευστικό σύστημα, γι' αυτό απαιτείται προσοχή στο χειρισμό. Το διάλυμα φορμαλίνης είναι 4% κ.ό. αραιωμένο σε *PBS*. Προσθέτουμε 300 mL φορμαλίνης σε κάθε φρεάτιο (*24 Well plate*).
- Μετά από 20 λεπτά αναμονής, πραγματοποιούμε μια πλύση αρχικά με απιονισμένο νερό και έπειτα προσθέτουμε 300 mL ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησής (*Neutralization Buffer*) (100 mM σε *PBS*) για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί μια πλύση με διάλυμα *PBS* και προσθέτουμε 300 mL ισοπροπανόλη, την οποία αφαιρούμε μετά από 5 λεπτά, και προσθέτουμε τη χρωστική *Oil Red O* (σε αραιώση 3:5 σε απιονισμένο νερό από το διάλυμα στοκ) που βάφει σχετικά άμεσα.
- Αφαιρούμε τη χρωστική και πραγματοποιούμε πλύσεις με νερό βρύσης, μέχρι να καθαρίσει η επιφάνεια της καλυπτρίδας και ώστε να αποφύγουμε το μεγάλο θόρυβο (υπολείμματα χρωστικής διάχυτα στο παρασκεύασμα) κατά την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.
- Με λαβίδα και βελόνα αφαιρούμε τις καλυπτρίδες από τα φρεάτια και τις τοποθετούμε σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τέτοιο τρόπο ώστε η καθαρή επιφάνεια της καλυπτρίδας να εφάπτεται της αντικειμενοφόρου και επομένως τα βαμμένα κύτταρα να βρίσκονται στην πάνω μεριά.

- Σταθεροποιούμε την καλυπτρίδα με μανό και αφήνεται να στεγνώσει.
- Ακολουθεί παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών των βαμμένων λιπιδικών σταγονιδίων.

## B.16. ΧΡΩΣΗ BODIPY

Τα λιπιδικά σταγονίδια (*LDs*) είναι δυναμικά οργανίδια και λειτουργούν ως περιοχές αποθήκευσης για ουδέτερα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των τριγλυκεριδίων και των εστέρων χοληστερόλης. Η μετακίνηση των λιπιδίων μέσα και έξω από τα *LDs* επηρεάζει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, όπως η ομοιόσταση της μεταβολισμού, η σηματοδότηση με βάση τα λιπίδια και η ομοιόσταση της μεμβράνης [126].

Για παράδειγμα, η αποθήκευση ουδέτερων λιπιδίων ενισχύεται με αυξημένη ενδογενή σύνθεση ή εξωγενή πρόσληψη. Από την άλλη πλευρά, τα εξωκυτταρικά σήματα μπορούν να ενισχύσουν την απελευθέρωση των λιπιδίων που βρίσκονται εντός των *LDs*. Έτσι, η διερεύνηση θεμάτων που αφορούν το μεταβολισμό των λιπιδίων μπορεί να απαιτεί την αξιολόγηση των επιπέδων της περιεκτικότητας των ουδέτερων λιπιδίων των κυττάρων .

Σε αυτό το πρωτόκολλο περιγράφουμε τη χρήση της φθορίζουσας ουδέτερης χρωστικής λιπιδίων-4,4-διφθορο-1,3,5,7,8-πενταμεθυλο-4-βορα-3α, 4α-διαζα-s-ινδακενίου (*BODIPY 493/503*) για να διευκολυνθεί η παρατήρηση των *LDs* με συνεστιακό μικροσκόπιο.

Η διαδικασία χρώσης με *Bodipy* των ηπατικών κυττάρων που ακολουθήσαμε εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με το πρωτόκολλο χρώσης *Oil red O* και είναι η ακόλουθη:

- Ηπατικά κύτταρα έχουν επιστρωθεί σε κατάλληλες καλυπτρίδες εντός φρεατίων πλακών κυτταροκαλλιέργειας (π.χ. *24 Well plate*) από την προηγούμενη μέρα, προκειμένου να έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια τους.
- Αφαιρείται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με διάλυμα PBS. Το διάλυμα PBS δεν αφαιρείται τη δεύτερη φορά και μεταφέρεται η πλάκα κυτταροκαλλιέργειας σε απαγωγό προκειμένου να ακολουθήσει η μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλίνης.
- Το διάλυμα φορμαλίνης είναι 4% κ.ό. αραιωμένο σε PBS. Προσθέτουμε 300 μL φορμαλίνης σε κάθε φρεάτιο (*24 Well plate*). Μετά από 20 λεπτά αναμονής, πραγματοποιούμε μια πλύση με PBS.

- Προσθέτουμε 300 μL ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησης (*Neutralization Buffer*) (100 mM σε *PBS*) για 10 λεπτά.
- Ακολουθούν τρεις πλύσεις με διάλυμα *PBS*.
- Η χρωστική *Bodipy* παρασκευάστηκε στην κατάλληλη αραιώση 1:10.000 σε διάλυμα *PBS*. Απαιτείται τόσο μεγάλη αραιώση γιατί εμφανίζει αρκετό θόρυβο στις φωτογραφίες παρατήρησης με συνεστιακό μικροσκόπιο.
- Από το διάλυμα χρωστικής *Bodipy* προσθέτουμε 200 μL σε κάθε φρεάτιο και αφήνεται για πέντε λεπτά.
- Ακολουθούν πέντε πλύσεις με διάλυμα *PBS*.
- Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα *Monoil*.
- Σταθεροποιείται η καλυπτρίδα με μανό και αφήνεται να στεγνώσει.
- Ακολούθησε παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών των βαμμένων λιπιδικών σταγονιδίων.

#### B.17. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, έχει αποδειχθεί ότι η ιική πρωτεΐνη Core συμβάλλει τόσο στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου όσο και στη δημιουργία του πρωτεϊνικού συμπλόκου μεταγραφής του ιού. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη NS5A συμμετέχει ενεργά τόσο στην ιική αντιγραφή όσο και στη συναρμολόγηση των ιικών ιωσωματιδίων σε συνεργασία με την πρωτεΐνη Core. Γιατούς τους λόγους, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση την οποία έχουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες στα επίπεδα ενδογενούς έκφρασης της LSD-1.

- Χρησιμοποιούμε σταθερές ηπατοκυτταρικές σειρές τύπου *Tet on/Tet off* οι οποίες υπερεκφράζουν το γονίδιο της NS5A ή το γονίδιο της Core και τις κυτταροσειρές μάρτυρες (*Control*) οι οποίες περιέχουν μόνο το φορέα (*Vector*) χωρίς το γονίδιο της ιικής πρωτεΐνης αντίστοιχα.
- Η κυτταροσειρά υπερέκφρασης της NS5A τύπου *Tet off* και η αντίστοιχη κυτταροσειρά μάρτυρας (*Huh7 T+A*) αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό *DMEM High Glucose* με προσθήκη 10% ορό, παρουσία αντιβιοτικών γενετισίνης (200 μg/mL), υγρομυκίνης (40 μg/mL) και δοξυκυκλίνης (10 μg/mL). Η κυτταροσειρά υπερέκφρασης της NS5A, όπως αναφέρθηκε, είναι τύπου *Tet off*, δηλαδή

προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο της NS5A θα πρέπει να αφαιρεθεί η δοξουκυκλίνη από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για τουλάχιστον 96 ώρες.

- Η κυτταροσειρά υπερέκφρασης της Core τύπου *Tet on* και η αντίστοιχη κυτταροσειρά μάρτυρας (*pTRE*) αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό *DMEM High Glucose* με προσθήκη 10% ορό, παρουσία αντιβιοτικών γενετισίνης (100 µg/mL) και υγρομυκίνης (200 µg/mL). Η κυτταροσειρά υπερέκφρασης της Core, όπως αναφέρθηκε, είναι τύπου *Tet on*, δηλαδή προκειμένου να εκφραστεί το γονίδιο της Core θα πρέπει να προστεθεί δοξουκυκλίνη (10 µg/mL) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για τουλάχιστον 96 ώρες.

Η οργάνωση του πειράματος βασίζεται στην αναγκαιότητα παραγωγής αποτελεσμάτων υψηλής επαναληψιμότητας. Σχεδιάστηκε η δημιουργία περισσότερων του ενός βιολογικών αντιγράφων (*Passages*) αλλά και τεχνικών αντιγράφων (*Wells*).

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κάθε μια από τις κυτταροσειρές και τα Control τους καλλιεργούνται αρχικά σε φιάλη καλλιέργειας 25 cm<sup>2</sup> σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, και έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup>. Η πορεία που ακολουθείται για την απόκτηση βιολογικών και τεχνικών αντιγράφων είναι εξής: κάθε φορά που η πληρότητα στο δοχείο καλλιέργειας πλησιάζει το 90-100%, μεταφέρονται τα κύτταρα μετά από αποκόλληση με τη βοήθεια τρυψίνης/*EDTA* από τη φιάλη καλλιέργειας 25 cm<sup>2</sup> σε φιάλη καλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup> και έπειτα σε πλάκα καλλιέργειας έξι φρεατίων.

Από τη χρονική στιγμή της διανομής των κυττάρων στα έξι φρεάτια της πλάκας καλλιέργειας ξεκινάει η επαγωγή υπερέκφρασης του γονιδίου της κάθε κυτταροσειράς είτε με την αφαίρεση δοξουκυκλίνης (NS5A) είτε με την προσθήκη δοξουκυκλίνης (Core). Μετά το πέρασμα 96 ωρών συλλέγονται τα κύτταρα από τα φρεάτια και αποθηκεύονται στους -80°C. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε τόσες φορές ώστε από την καθεμία κυτταροσειρά και το *Control* της να έχουμε συλλέξει 4 *Passages* (*P2, P3, P4, P5*). Από τα έξι φρεάτια του πιάτου καλλιέργειας, τα τρία προορίζονταν για απομόνωση RNA για την πραγματοποίηση qPCR και τα άλλα τρία για απομόνωση κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων για την πραγματοποίηση ανάλυσης κατά Western.

### Γ.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΚΛΩΝΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1

Όπως προαναφέρθηκε ο απώτερος στόχος των πειραμάτων τα οποία πραγματοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ήταν ο έλεγχος της ενδεχόμενης και ταυτόχρονα αμφίδρομης αλληλεπίδρασης του επιγενετικού παράγοντα LSD-1 και του ιού της ηπατίτιδας C. Αρχικά, η αλληλεπίδραση αυτή ελέγχθηκε σε επίπεδο διαφορικής έκφρασης της LSD-1, δηλαδή στο επίπεδο ενδογενούς έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1 αλλά και στο επίπεδο υπερέκφρασης της.

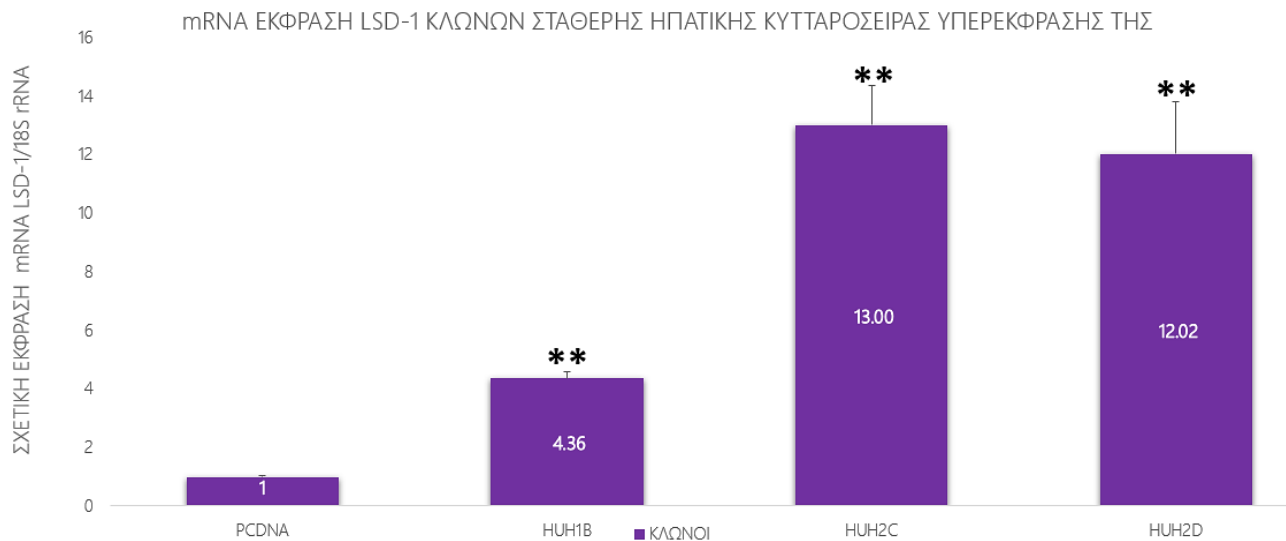
Όσον αφορά στο επίπεδο υπερέκφρασης, η ακολουθία των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, στηρίχθηκε σε κλώνο σταθερής ηπατικής κυτταροσειράς που υπερεκφράζει τον επιγενετικό παράγοντα LSD-1 και η οποία έχει παρασκευαστεί στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, ενώ ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ηπατική κυτταροσειρά *Huh7*. Εξέχουσας σημασίας για την ορθότητα των πειραμάτων μας, κατείχε η επιλογή του καταλληλότερου κλώνου, δηλαδή εκείνου του κλώνου, ο οποίος συγκριτικά με όλους τους υπόλοιπους υπερεκφράζει την πρωτεΐνη LSD-1 στο υψηλότερο επίπεδο. Προκείμενου να εξασφαλιστεί η καλύτερη επιλογή πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1 σε επίπεδο mRNA με τη βοήθεια της PCR πραγματικού χρόνου (*Real time PCR*) και σε επίπεδο πρωτεΐνης με τη βοήθεια της ανάλυσης κατά Western.

Ελέγχθηκαν τρεις κλώνοι ο *Huh1B*, ο *Huh2C* και ο *Huh2D* και η κυτταροσειρά μάρτυρας (*Control-rcDNA*) η οποία φέρει τον πλασμιδιακό φορέα *pcDNA3.1mycHis(-)C* χωρίς το γονίδιο *LSD-1* και στον οποίο θα αποτυπώνονται τα επίπεδα της ενδογενούς έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1.

Η πειραματική διαδικασία για τον έλεγχο της έκφρασης της LSD-1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης ξεκίνησε με την καλλιέργεια των προαναφερόμενων κυτταροσειρών, με στόχο την ικανοποιητική ποσότητα κυττάρων για την πραγματοποίηση της PCR πραγματικού χρόνου και της ανάλυσης κατά Western που έχουν περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο.

### Γ.1.1.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ RT-QPCR

Για τον έλεγχο της έκφρασης της LSD-1 σε επίπεδο mRNA, μετά την κατακρήμνιση των κυττάρων από τη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας 75 cm<sup>2</sup>, ακολούθησε απομόνωση RNA με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου *NucleoZol*. Η συγκέντρωση του ολικού RNA των δειγμάτων μετρήθηκε με τη βοήθεια του φωτόμετρου *Thermal Scientific NanoDrop 2000*. Μετά τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας σε μλ για 1 μg RNA κάθε δείγματος προχωρήσαμε σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) με τη χρήση του ενζύμου M-MLV για την παρασκευή cDNA. Τέλος πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης mRNA της LSD-1 σε κάθε δείγμα, τα οποία απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



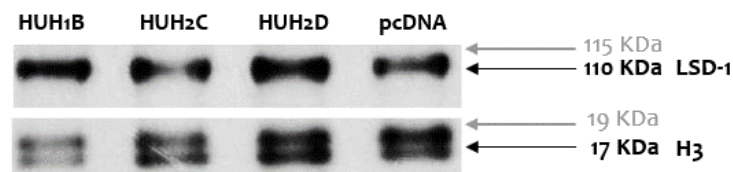
Διάγραμμα 3-1: Έλεγχος mRNA επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1 σε κλώνους σταθερής ηπατικής κυτταροσειράς υπερέκφρασης της και σε κύτταρα μάρτυρα (pcDNA).

Με βάση τα αποτελέσματα από την PCR πραγματικού χρόνου [Διάγραμμα 3-1], ο κλώνος εκείνος ο οποίος εμφανίζεται να εκφράζει τα υψηλότερα ποσοστά mRNA της LSD-1, είναι ο *Huh2C* σε σχέση με τους υπόλοιπους κλώνους και μάλιστα κατά 13 φορές (+) σε σύγκριση με το μάρτυρα *pcDNA* ( $p$  value<0.01). Τα επίπεδα έκφρασης της LSD-1 στους *Huh1B* και *Huh2D* είναι κατά ~4 ½ ( $p$  value<0.01) και 12 ( $p$  value<0.01) φορές υψηλότερα σε σχέση με το *pcDNA*. Ωστόσο, αυτό το συμπέρασμα χρήζει επαλήθευσης και σε επίπεδο πρωτεΐνης.

### Γ.1.1.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΜΕ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Για την ανάλυση κατά Western, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης σε πυρηνικά εκχυλίσματα με τη δοκιμασία *Bradford*, γιατί η πρωτεΐνη LSD-1 εμφανίζει πυρηνική εντόπιση. Ακολούθησε φόρτωση των κατάλληλων ποσοτήτων δειγμάτων (4 μg) σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η ανίχνευση με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της LSD-1, καθώς και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της ιστόνης H3 το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 3-1].

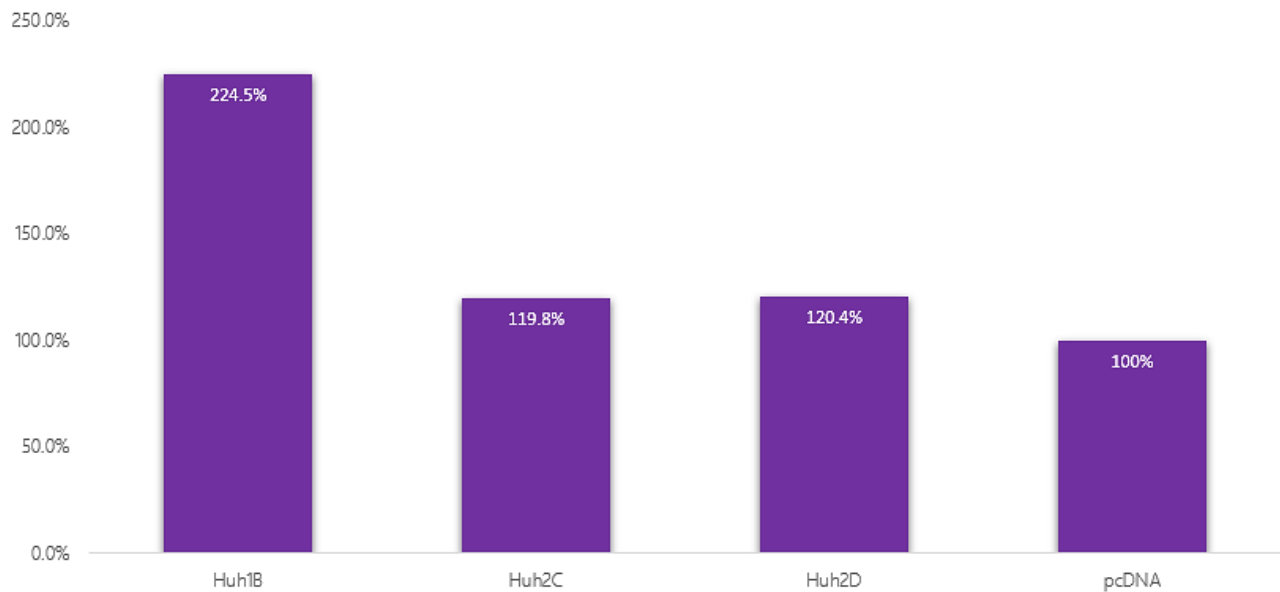


Εικόνα 3-1: Αντιπροσωπευτική εικόνα έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1 σε κλώνους και σε μάρτυρα μετά από ανάλυση κατά Western.

Η ευαισθησία του μονοκλωνικού αντισώματος της ιστόνης H3 είναι αρκετά υψηλή ώστε να αποτυπώνεται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και κατ'επέκταση στο φιλμ και η γλυκοζυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται δυο ζώνες μεταξύ των 15 και 19 kDa.

Για τον ακριβέστερο έλεγχο της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1, συγκρίθηκαν οι τρεις κλώνοι τόσο μεταξύ τους όσο και με το μάρτυρα με τη μέθοδο πυκνομετρίας (*Densitometry*) των ζωνών, χρησιμοποιώντας το λογισμικό *Quantity One-4.6.6 (Basic)* της *Biorad Laboratories* [Διάγραμμα 3-2].

### ΕΚΦΡΑΣΗ LSD-1 ΣΕ ΚΛΩΝΟΥΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΑΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ



Διάγραμμα 3-2: Αντιπροσωπευτική εικόνα ελέγχου υπερέκφρασης της LSD-1 σε κλώνους με τη χρήση της πυκνομετρίας των ζωνών από τη μέθοδο Western Blot.

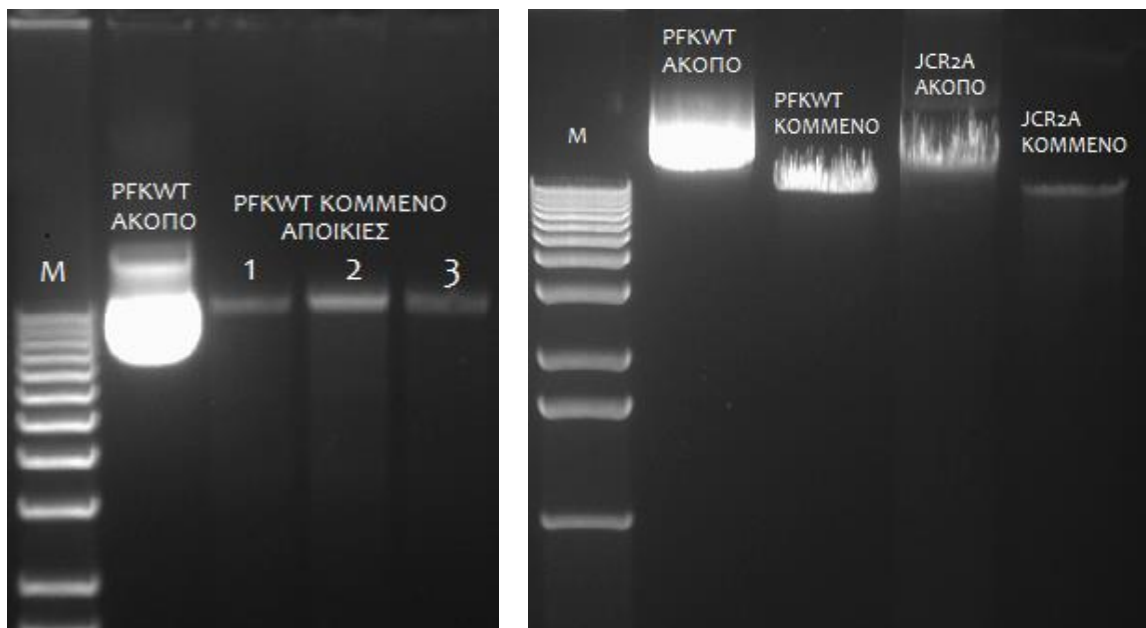
Μετά από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων, διαπιστώνουμε ότι ο κλώνος *Huh2C* εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα mRNA της LSD-1 στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, ενώ ο κλώνος *Huh1B* εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης της LSD-1 στην ανάλυση κατά Western. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί με ποικίλους τρόπους. Το παραγόμενο mRNA του κλώνου *Huh2C* καθώς και του κλώνου *Huh2D* μπορεί να υπόκειται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες προκαλούν είτε την αποικοδόμηση τους είτε την αναστολή της μετάφρασής τους, γεγονός που εξηγεί την παραγωγή χαμηλότερων επιπέδων πρωτεΐνης LSD-1. Επίσης είναι πιθανόν να υπάρχει παρεμβολή και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, δηλαδή η παραγομένη πρωτεΐνη να μην είναι λειτουργική. Γι' αυτούς τους λόγους στηριχθήκαμε στο αποτέλεσμα της ανάλυσης κατά Western και επιλέξαμε για τα πειράματά μας τη χρησιμοποίησή του κλώνου *Huh1B*.



### Γ.1.2. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΡFKWT ΚΑΙ JCR2A

Για τα πειράματά της ηλεκτροδιάτρησης (*Electroporation*) απαιτείται ικανή ποσότητα ιικού RNA (10 μg/κυβέττα). Και τα δυο πλασμίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, το πλασμίδιο *ΡFKWT* το οποίο περιέχει μόνο τις μη δομικές πρωτεΐνες του γονιδιώματος του ιού HCV (NS3-NS5B) και το πλασμίδιο *JCR2A* το οποίο περιέχει ολόκληρο το γονιδίωμα του HCV από την 5' μη μεταφραστική περιοχή μέχρι την 3' μη μεταφραστική περιοχή, δεν χρειάστηκε να παρασκευαστούν καθότι ήταν διαθέσιμα ήδη στο εργαστήριο της Μοριακής Ιολογίας. Ωστόσο χρειάστηκε μέσω μετασηματισμού σε δεκτικά κύτταρα *K12 JM109* να εξασφαλιστεί η παραγωγή απαιτούμενης ποσότητας ιικού RNA.

Κατόπιν, το πλασμιδιακό *DNA* υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *MluI* και σε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% (κ.β.) για να διαπιστωθεί η επιτυχία της πέψης με την παραγωγή ευθύγραμμου πλασμιδιακού *DNA* συγκεκριμένου μοριακού βάρους (MB) [Εικόνα 3-2].



Εικόνα 3-2: Ηλεκτροφόρηση άκοπων πλασμιδίων *ΡFKWT* & *JCR2A* και των προϊόντων πέψης τους με ένζυμο *MluI* σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8 %.

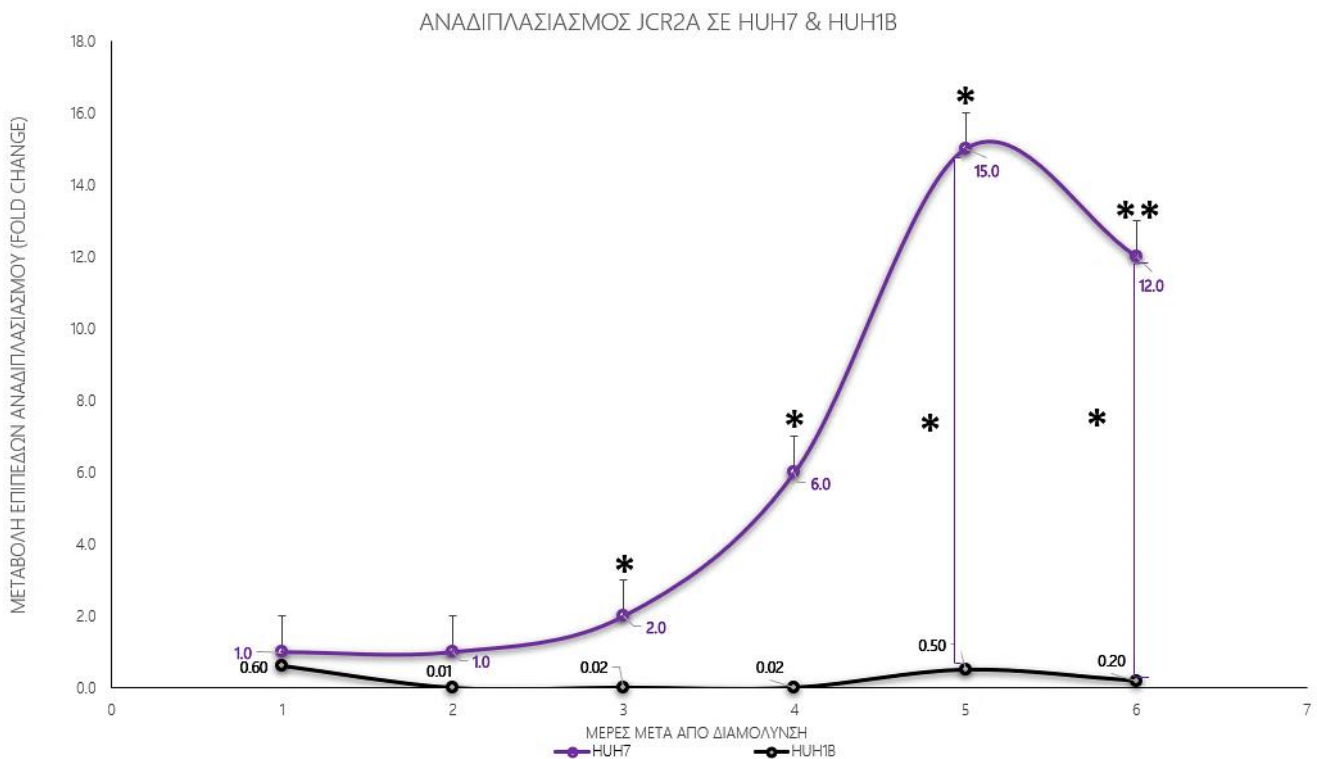
Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του πλασμιδιακού *DNA* που απομονώθηκε μετρήθηκε στο φωτόμετρο *Thermal Scientific NanoDrop 2000* ( $Optimal\ 260/280=1.8$ ). Ακολούθησε αντίδραση *in vitro* RNA μεταγραφή και καθαρισμός του παραγόμενου RNA προκειμένου να προχωρήσουμε στο πείραμα της ηλεκτροδιάτρησης.

### Γ.1.3. ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ HUH7 ΚΑΙ ΣΕ ΚΛΩΝΟ HUH1B

Η ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιεί έναν ηλεκτρικό παλμό για την εισαγωγή νέων, συνήθως πολικών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Η τεχνική εκμεταλλεύεται τις αδύναμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφολιπιδίων των διπλοστοιβάδων που διατηρούν την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών.

#### Γ.1.3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΡΕΠΛΙΚΟΝΙΩΝ JCR2A & PFKWT

Τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης (γονίδιο αναφοράς; *reporter gene*) είναι αντιπροσωπευτικά των επιπέδων αντιγραφής του ρεπλικονίου που έχουμε εισάγει στα κύτταρα κάθε φορά (JCR2A-ολόκληρο ιικό γονιδίωμα HCV, PFKWT-μη δομικές ιικές πρωτεΐνες NS3-NS5B). Τα τελικά αποτελέσματα μετά από στατιστική ανάλυση των μετρήσεων της λουσιφεράσης *Renilla* και *Firefly* κατόπιν ολοκλήρωσης του πειράματος, με το πέρασμα 144 ωρών, τόσο για το μάρτυρα *Huh7* όσο και για τον κλώνο *Huh1B*, παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς τις τιμές που προέκυψαν για τα δείγματα μετά από μέθοδο *Bradford*.



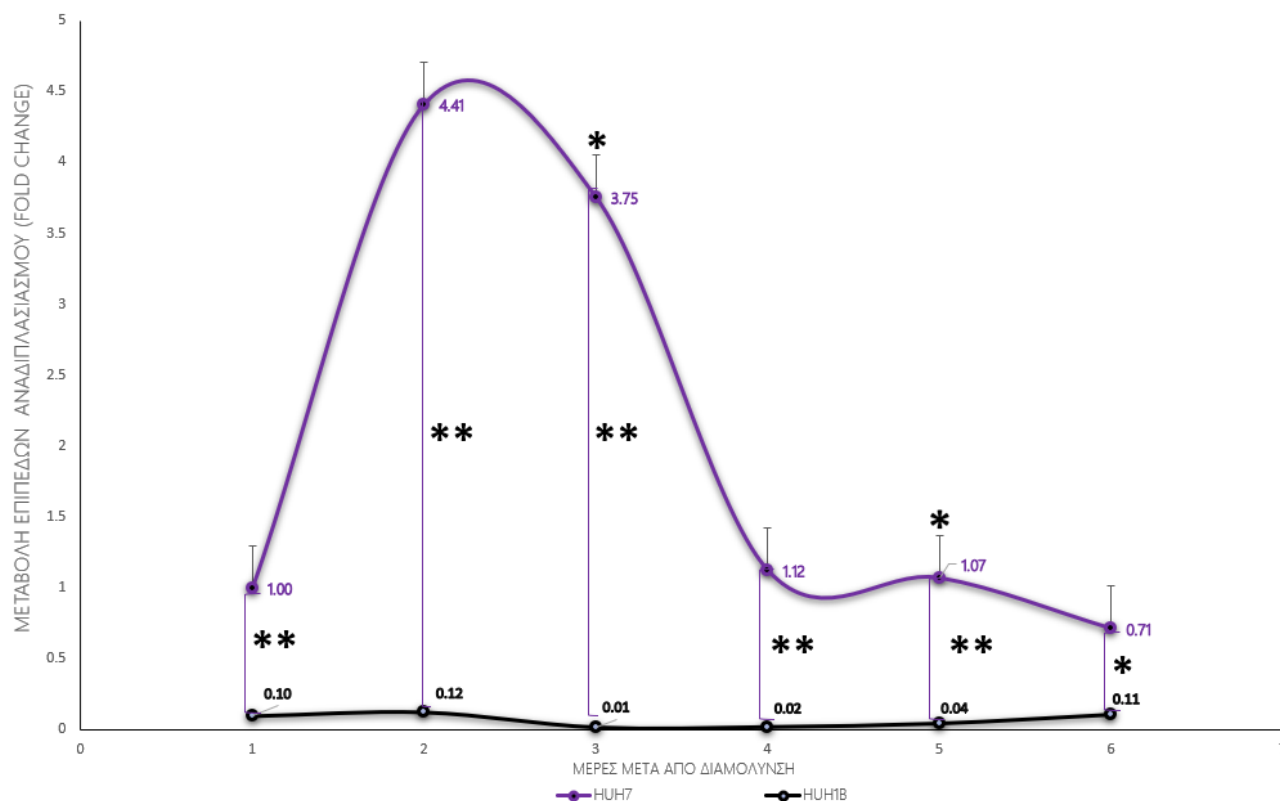
Διάγραμμα 3-3: Ρυθμός αναδιπλασιασμού ιικού γονιδιώματος JCR2A μετά από διαμόλυση κυττάρων *Huh7* & *Huh1B*.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα [Διάγραμμα 3-3], παρατηρούμε ότι μετά από τη διαμόλυνση με έναν πλήρως λειτουργικό ιό *JCR2A*, στα *Huh7* κύτταρα ο ιός επιτυγχάνει να πολλαπλασιαστεί ξεκινώντας με έναν αργό ρυθμό αναπαραγωγής μέχρι τις δυο πρώτες μέρες (48 ώρες), οπότε και σταδιακά εκτοξεύεται και αποκτά μέγιστο στις πέντε μέρες (120 ώρες) και στη συνέχεια μειώνεται μέχρι τη λήξη του πειράματος. Η αύξηση η οποία παρατηρείται στις 96 ώρες και 120 ώρες είναι κατά 3 φορές ( $p \text{ value} < 0.01$ ) και 7.5 φορές ( $p \text{ value} < 0.05$ ) υψηλότερη σε σχέση με τις 72 ώρες. Από τις 120 ώρες μέχρι τις 144 ώρες παρατηρείται μείωση στον αναδιπλασιασμό με στατιστική σημαντικότητα ( $p \text{ value} < 0.001$ ).

Στα κύτταρα του κλώνου *Huh1B*, γενικά παρατηρούμε ένα μοτίβο χαμηλών επιπέδων ιικού αναδιπλασιασμού με αυξομειώσεις καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Κατορθώνει να αντιγραφεί στις πρώτες 24 ώρες, για τις επόμενες τρεις ημέρες παρατηρείται μείωση, ακολουθούμενη από μικρή αύξηση κατά την πέμπτη μέρα και ξανά μείωση μέχρι την έκτη μέρα. Συγκριτικά με τα κύτταρα *Huh7*, στον κλώνο *Huh1B* οι συνθήκες οι οποίες επικρατούν εντός των κυττάρων λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1, φαίνεται να μην ευνοούν τον αναδιπλασιασμό του HCV σε τέτοιο βαθμό ώστε οι διαφορές που προκύπτουν μετά από συγκριτική ανάλυση των επιπέδων ιικού πολλαπλασιασμού να έχουν μεγάλη στατιστική σημασία όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα. Η διαφορά στις 72 ώρες αγγίζει τα 2 φορές (+) ( $p \text{ value} < 0.05$ ) μεταξύ κυττάρων μάρτυρα και κλώνου, ενώ στις 120 ώρες και στις 144 ώρες φτάνει τα 15 ( $p \text{ value} < 0.05$ ) και 12 ( $p \text{ value} < 0.05$ ) φορές (+) αντίστοιχα.

Είναι ευρύτερα γνωστό, ότι η μελέτη του ιού της ηπατίτιδας C έχει καθυστερήσει, εξαιτίας των δυσκολιών ανάπτυξης του σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας. Η απομόνωση του στελέχους *JFH1* του γονότυπου *2a* βοήθησε να ξεπεραστούν τέτοιου είδους προβλήματα, καθότι εμφανίζει πολύ ικανοποιητικά επίπεδα αναδιπλασιασμού στην ηπατοκυτταρική σειρά *Huh7*. Ο γονότυπος *2a* έχει επιλεγεί για τα πειράματα της ηλεκτροδιάτρησης στην παρούσα διπλωματική εργασία, γεγονός που προσδίδει περισσότερη αξιοπιστία στα αποτελέσματά μας. Η διαμόλυνση με το ιικό γονιδίωμα *JCR2A* σε κύτταρα μάρτυρα *Huh7* και σε κύτταρα κλώνου *Huh1B* επιβεβαιώνει δυο δεδομένα: α. ότι ο ιός αναπτύσσεται εξαιρετικά σε κύτταρα *Huh7*, ότι δηλαδή αποτελεί ιδανικό σύστημα ανάπτυξης του και μάλιστα, σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα κύτταρα κλώνου *Huh1B*, και β. ότι η υπερέκφραση της LSD-1, όπως αναμενόταν, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα αναδιπλασιασμού του ιού και συνεπώς εξέλιξης της ηπατικής νόσου.

### ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΡFKWT ΣΕ ΗUH7 & ΗUH1B

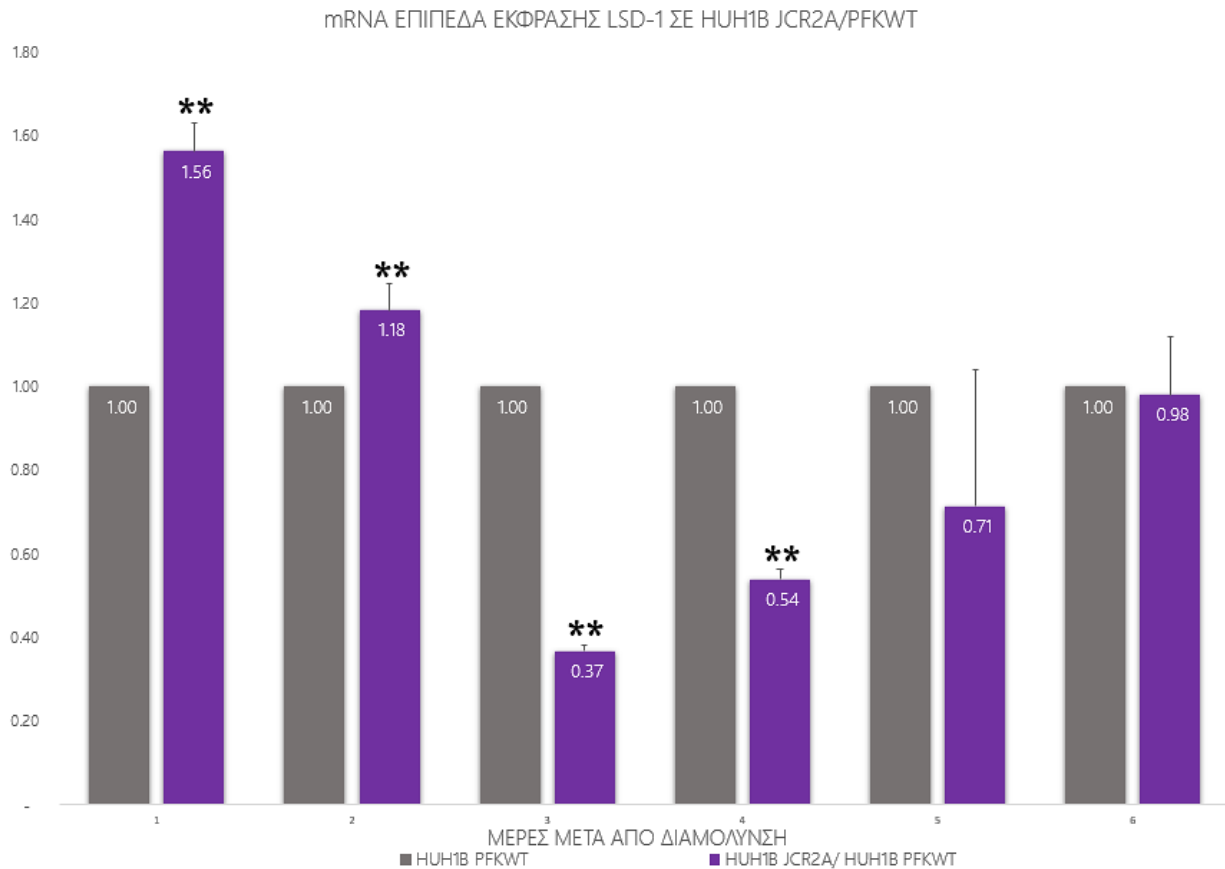


Διάγραμμα 3-4: Ρυθμός αναδιπλασιασμού ρεπλικονίου PFKWT μετά από διαμόλυση κυττάρων Huh7 & Huh1B.

Όσον αφορά στα επίπεδα αναδιπλασιασμού του ρεπλικονίου PFKWT, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα [Διάγραμμα 3-4], διαπιστώνουμε ότι στα Huh7 κύτταρα παρατηρείται από την πρώτη μέρα αύξηση, η οποία αποκτά μέγιστο τη δεύτερη μέρα (48ωρες), στη συνέχεια ακολουθείται από κατακόρυφη μείωση μέχρι την τέταρτη μέρα (96 ώρες), οπότε και αποκτά σταθεροποιητική τάση μείωσης μέχρι την έκτη μέρα. Στον κλώνο Huh1B τα επίπεδα αναδιπλασιασμού του ρεπλικονίου είναι ουσιαστικά μηδενικά. Απουσία της πρωτεΐνης Core, η οποία σύμφωνα με υπάρχουσες μελέτες, επάγει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στη λιπογένεση στα ηπατικά κύτταρα, το ρεπλικόνιο PFKWT που συγκροτείται από μη δομικές πρωτεΐνες, δεν έχει την ικανότητα να αντιρροπήσει τη μειωμένη σύνθεση τριγλυκεριδίων λόγω υπερέκφρασης της LSD-1, με αποτέλεσμα τα χαμηλά επίπεδα αναδιπλασιασμού του. Σε όλα τα time points του πειράματος η διαφορά στα επίπεδα αναπαραγωγής του ρεπλικονίου PFKWT ανάμεσα στα κύτταρα μάρτυρα Huh7 και του κλώνου Huh1B είναι στατιστικά σημαντική με  $p \text{ value} < 0.005$  εκτός από το τελευταίο time point των 144 ωρών που έχει  $p \text{ value} < 0.05$ .

Στο πείραμα διαμόλυνσης με το ρεπλικόνιο *PFKWT*, διαπιστώνουμε ότι στα κύτταρα Huh7 υπο την επίδραση του ισχυρού υποκινητή CMV το ρεπλικόνιο *PFKWT* αναδιπλασιάζεται, αλλά απουσία της πρωτεΐνης Core, τα επίπεδα αντιγραφής του είναι σαφώς χαμηλότερα από εκείνα που παρατηρούνται κατά τη διαμόλυνση με ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα *JCR2A*. Το μέγιστο αναδιπλασιασμού του ιού κατά τη διαμόλυνση με το ρεπλικόνιο *PFKWT* στα κύτταρα Huh7 είναι τουλάχιστον 3 φορές χαμηλότερο από το μέγιστο αναδιπλασιασμού κατά τη διαμόλυνση με ολόκληρο τον ιό. Αυτό επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο της πρωτεΐνης Core στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων σχετικών με τη λιπογένεση. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και για τα κύτταρα του κλώνου *Huh1B* στα οποία τα επίπεδα αναδιπλασιασμού του ρεπλικονίου *PFKWT* είναι ουσιαστικά μηδαμινά σε σχέση με ολόκληρού του ιού, παρότι και σε εκείνο το πείραμα διαμόλυνσης είναι επίσης ιδιαίτερα χαμηλά.

### Γ.1.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ mRNA ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΜΕ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ



Διάγραμμα 3-5: mRNA επίπεδα σχετικής έκφρασης LSD-1 σε κύτταρα κλώνου Huh1B μετά από διαμόλυνση *JCR2A* προς *PFKWT*.

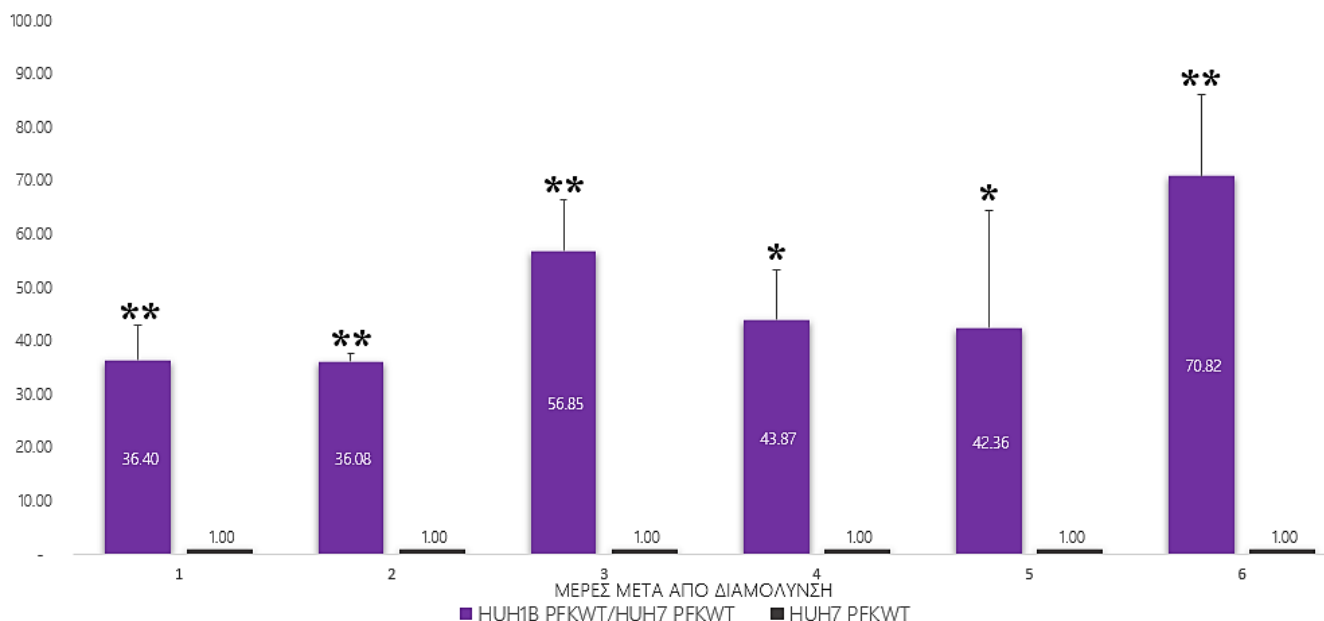
Όπως έχει αναφερθεί διεξοδικά κατά τη περιγραφή του πειράματος ηλεκτροδιάτρησης, απομονώθηκε RNA, παρασκευάστηκε cDNA από τα δείγματα και πραγματοποιήθηκαν PCR πραγματικού χρόνου για το γονίδιο της LSD-1 για τη μέτρηση των mRNA επιπέδων έκφρασης της LSD-1. Όσον αφορά στα κύτταρα *Huh7* πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενδογενούς έκφρασης της LSD-1 παρουσία του *PFKWT* και για το κλώνο *Huh1B* μέτρηση της υπερέκφρασης της LSD-1 παρουσία των *JCR2A/PFKWT*. Η κανονικοποίηση ως προς τις qPCR πραγματοποιήθηκε πάντοτε ως προς το γονίδιο *18S rRNA*.

Στο παραπάνω διάγραμμα [Διάγραμμα 3-5] απεικονίζονται τα mRNA επίπεδα σχετικής έκφρασης της LSD-1 στον κλώνο μετά από διαμόλυνση με τον *JCR2A* συγκριτικά με το *PFKWT*. Η κύρια διαφορά μεταξύ των ρεπλικονίων *JCR2A* και *PFKWT* είναι η παρουσία της πρωτεΐνης Core στον ιό *JCR2A*. Η πρωτεΐνη Core κατέχει σημαντικό ρόλο καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού HCV. Όσο μεγαλύτερη η τιμή των επιπέδων mRNA σχετικής έκφρασης της LSD-1 τόσο μεγαλύτερη η υπερέκφραση της παρουσία του ιού *JCR2A* και τόσο μεγαλύτερη η διαφορά υπερέκφρασης της κατά τη διαμόλυνση με τον ιό *JCR2A* σε σχέση με το ρεπλικόνιο *PFKWT*.

Στηριζόμενοι στις προαναφερόμενες διευκρινίσεις διαπιστώνουμε ότι παρουσία του *JCR2A* η υπερέκφραση της LSD-1 είναι αυξημένη την πρώτη μέρα σε σχέση εκείνη παρουσία του *PFKWT*, όπου σταδιακά μέχρι την τρίτη μέρα αυξάνεται σημαντικά η υπερέκφραση της στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με το ρεπλικόνιο *PFKWT*, ενώ από την τέταρτη μέρα μέχρι το τέλος του πειράματος, ξανά η υπερέκφραση της είναι σημαντικά μεγαλύτερη στη διαμόλυνση με τον *JCR2A* σε σχέση με του *PFKWT*.

Είναι φανερό ότι η διαφορά στα επίπεδα της σχετικής έκφρασης της LSD-1 μόνο σε κύτταρα κλώνου *Huh1B* όπου υπερεκφράζεται σταθερά, είναι μικρή (τάξης μεγέθους: 0.4-1.6 φορές) είτε έχουν μολυνθεί με ολόκληρο το γονιδίωμα *JCR2A* είτε μόνο με το ρεπλικόνιο *PFKWT*. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι πάρα τις αυξομειώσεις που παρουσιάζονται στην έκφραση της πρωτεΐνης LSD-1 κατά τη διάρκεια των 6 ημερών, η υπερέκφραση αυτή καθαυτή είναι το επικρατές φαινόμενο στο πείραμα μας. Ο ιός αδυνατεί να αντιρροπήσει τα προβλήματα που δημιουργεί η υπερέκφραση αυτή στη διαδικασία αναδιπλασιασμού του, δηλαδή την κατακόρυφη μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και των λιπιδικών σταγονιδίων που είναι απαραίτητα για την επιβίωση του.

mRNA ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ HUH1B PFKWT/HUH7 PFKWT



Διάγραμμα 3-6: mRNA επίπεδα σχετικής έκφρασης LSD-1 σε κύτταρα κλώνου *Huh1B* σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρα *Huh7* μετά από διαμόλυνση με το ρεπλικόνιο *PFKWT*.

Στο παραπάνω διάγραμμα [Διάγραμμα 3-6] απεικονίζεται η μεταβολή των mRNA επιπέδων σχετικής έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1 στον κλώνο *Huh1B* συγκριτικά με τα κύτταρα *Huh7* (μάρτυρας) μετά από διαμόλυνση με το ρεπλικόνιο *PFKWT*. Η κανονικοποίηση και σε αυτή την περίπτωση έχει πραγματοποιηθεί σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου *18S rRNA*. Στο κλώνο *Huh1B* τα mRNA επίπεδα έκφρασης της LSD-1 εμφανίζονται ιδιαίτερα υψηλά σε σχέση με το μάρτυρα όπως αναμενόταν, λόγω υπερέκφρασης του γονιδίου της LSD-1. Η διαφορά αυτή παρουσιάζει μοτίβο ελαφράς αυξομείωσης. Αρχικά και μέχρι την τρίτη μέρα στον κλώνο *Huh1B* είναι αρκετά μεγαλύτερη η έκφραση, ακολουθείται από μια μείωση μέχρι την πέμπτη μέρα οπότε και αυξάνεται η έκφραση της στο μάρτυρα *Huh7*, ενώ την έκτη μέρα εκτινάσσονται τα επίπεδα της υπερέκφρασης της LSD-1 στον κλώνο *Huh1B*. Αξιοσημείωτο είναι ότι, οι διαφορές αυτές στα mRNA επίπεδα της έκφρασης της LSD-1 μεταξύ του κλώνου *Huh1B* και του μάρτυρα εμφανίζουν στατιστική σημαντικότητα καθόλη τη διάρκεια του πειράματος ( $p$  value < 0.005 ή  $p$  value < 0.05 στις 120 ώρες).

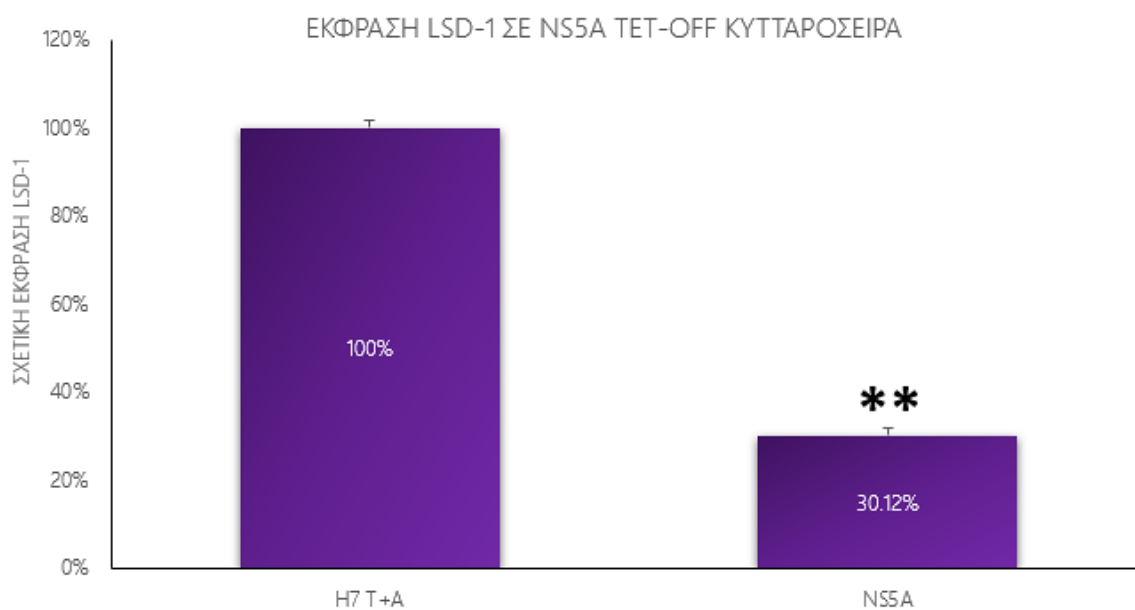
Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι η διαφορά στα επίπεδα σχετικής έκφρασης της LSD-1 σε κύτταρα κλώνου *Huh1B* και σε κύτταρα *Huh7* κατά τη διαμόλυνση με το ρεπλικόνιο *PFKWT* κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα : α. γιατί στον κλώνο *Huh1B* επικρατούν συνθήκες σταθερής υπερέκφρασης της LSD-1 ενώ στα κύτταρα *Huh7* υπολογίζεται η ενδογενής της έκφραση σε συνδυασμό με την επίδραση του ρεπλικονίου *PFKWT* και β. γιατί απουσιάζει από τη δομή του *PFKWT* η πρωτεΐνη Core η οποία

θεωρείται από τις πιο καθοριστικές πρωτεΐνες επαγωγής της λιπογένεσης. Ο αναδιπλασιασμός του ρεπλικονίου κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα και στις δυο κατηγορίες κυττάρων, συγκριτικά πάντα με τον αναδιπλασιασμό ολόκληρου του ιού.

Με το πείραμα της ηλεκτροδιάτρησης επιχειρήσαμε να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση του ιού HCV σε σχέση με τον επιγενετικό παράγοντα LSD-1. Αντικατοπτρισμός αυτής της αλληλεπίδρασης επιτεύχθηκε: 1) με τη μελέτη του ρυθμού αναδιπλασιασμού του ιού σε συνθήκες ενδογενούς έκφρασης της LSD-1 (*Huh7*) και σε συνθήκες υπερέκφρασης της (*Huh1B*), και 2) με τη χρησιμοποίηση δυο τύπων ρεπλικονίων, γιατί την εξερεύνηση της επίδρασης σημαντικών ιικών πρωτεϊνών α. στα επίπεδα αναδιπλασιασμού τους και β. στα επίπεδα έκφρασης της LSD-1.

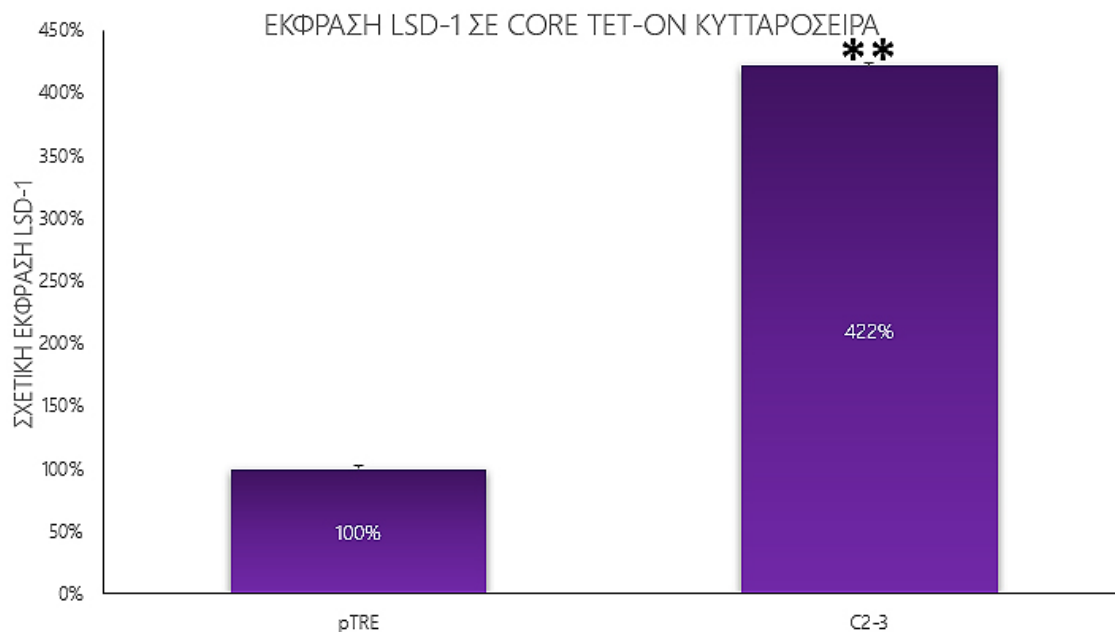
#### Γ.1.4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ mRNA ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE

Σύμφωνα με το σχεδιασμό της πειραματικής διαδικασίας που έχει ήδη αναλυτικά αναφερθεί, από τα τρία φρεάτια των πλακών καλλιέργειας για κάθε *passage* που δημιουργήθηκε, συλλέχθηκαν τα κύτταρα, απομονώθηκε RNA, παρασκευάστηκε cDNA και πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο των mRNA επιπέδων έκφρασης της LSD-1 στις κυτταροσειρές NS5A και Core σε σύγκριση με τα control τους. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ξανά σε σύγκριση με την έκφραση του *18S* rRNA. Τα αποτελέσματα μετά από στατιστική ανάλυση απεικονίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 3-7: mRNA επίπεδα έκφρασης LSD-1 σε σταθερή ηπατική κυτταροσειρά NS5A.





Διάγραμμα 3-8: mRNA επίπεδα έκφρασης LSD-1 σε σταθερή ηπατική κυτταροσειρά Core.

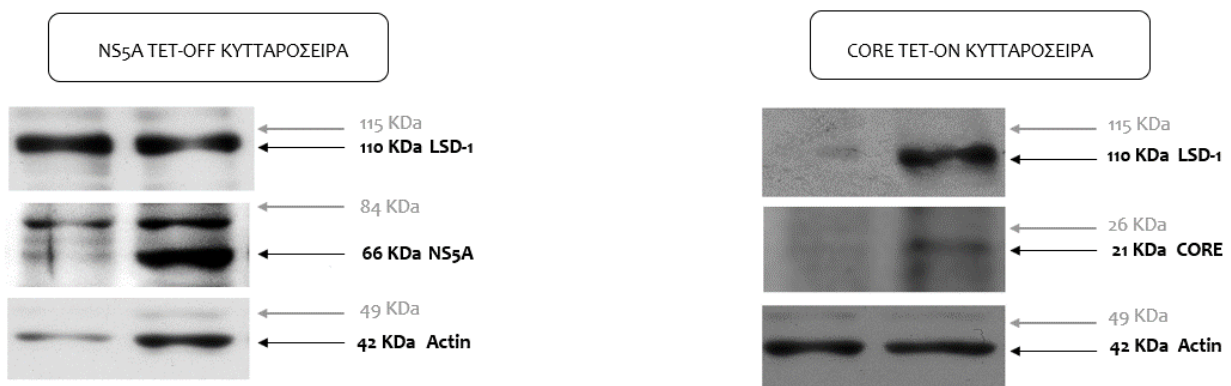
Συμπερασματικά διαπιστώνουμε ότι κατά την υπερέκφραση της ιικής πρωτεΐνης NS5A η ενδογενής έκφραση της πρωτεΐνης LSD-1 υποτριπλασιάζεται συγκριτικά με το control *Huh7 T+A* και η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p \text{ value} < 0.05$ ) [Διάγραμμα 3-7]. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη NS5A μεταξύ άλλων σημαντικών λειτουργιών για τον ιό, συμμετέχει στη συναρμολόγηση των ιικών σωματίων, πιθανόν σε αυτό το στάδιο του κύκλου της ζωής του ιού να μην απαιτείται η ύπαρξη μεγάλης ποσότητας λιπιδίων και η πρωτεΐνη αυτή να αποτελεί φρένο στην παραγωγή τους.

Τέλος, όσον αφορά στην κυτταροσειρά Core, σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα [Διάγραμμα 3-8], η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Core έχει ως αποτέλεσμα την εκτίναξη των mRNA επιπέδων της ενδογενούς έκφρασης της LSD-1 κατά 4 φορές με στατιστική σημαντικότητα ( $p \text{ value} < 0.005$ ). Αναμενόμενο αποτέλεσμα, μιας και μέχρι τώρα υπάρχουν συσσωρευμένα δεδομένα από πολλές επιστημονικές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη Core κατέχει το σημαντικό ρολό στην επαγωγή γονιδίων που ενεργοποιούν τους παράγοντες *SREBPs* για την παραγωγή λιπαρών οξέων και χοληστερόλης.

#### Γ.1.4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ LSD-1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΣΕΙΡΕΣ NS5A/CORE

Προκειμένου ο έλεγχος της έκφρασης ενός γονίδιου να θεωρηθεί ολοκληρωμένος και αξιόπιστος, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή βάσιμων επιστημονικών αποτελεσμάτων δεν αρκεί η μελέτη έκφρασης του γονίδιου μόνο σε επίπεδο μεταγραφής αλλά και σε επίπεδο μετάφρασης. Είναι δυνατόν να επισυμβαίνουν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, οι οποίες δεν επιτρέπουν στο mRNA να μεταφραστεί αλλά και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπου η παραγομένη πρωτεΐνη δεν καθίσταται λειτουργική.

Αυτή η παρατήρηση δεν αφορά μόνο το γονίδιο της LSD-1 αλλά και των ικών πρωτεϊνών Core και NS5A. Απαιτείται η επιβεβαίωση της επιτυχούς υπερέκφρασης τους στις σταθερές κυτταρικές σειρές *Tet-on/Tet-off* που χρησιμοποιήθηκαν. Για τους προαναφερόμενους λόγους παρασκευάστηκαν κυτταρικά και πυρηνικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση ανοσοσύτωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα της Western και για τις δυο κυτταροσειρές NS5A και Core φαίνονται παρακάτω [Εικόνα 3-3]:

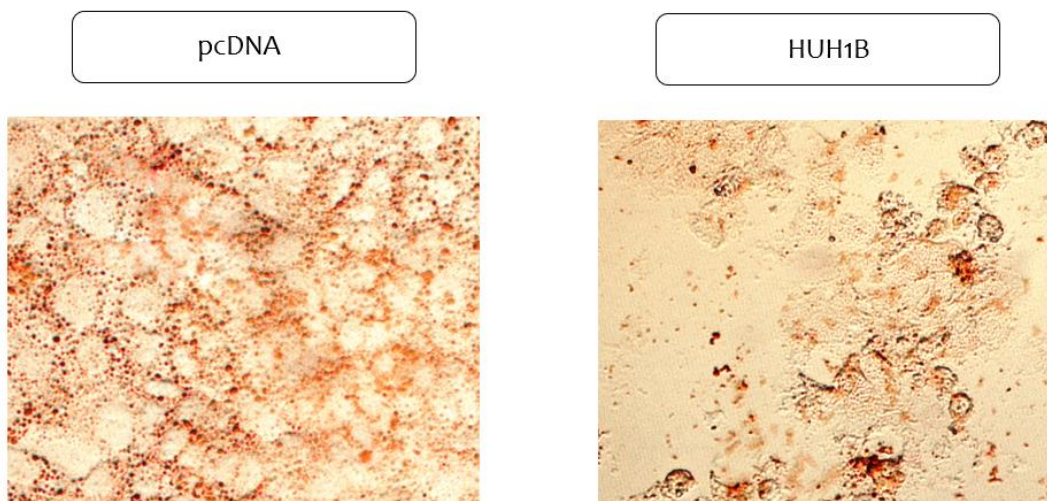


Εικόνα 3-3: Αντιπροσωπευτική εικόνα αποτελεσμάτων ανάλυσης κατά Western επιπέδων έκφρασης LSD-1 στις σταθερές ηπατοκυτταρικές σειρές NS5A/Core.

Τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν από τον έλεγχο των mRNA επιπέδων έκφρασης της LSD-1, συμφωνούν και επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Western. Αποδεικνύεται ξανά ότι η ιική πρωτεΐνη NS5A προκαλεί μείωση στην έκφραση της LSD-1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ενώ η ιική πρωτεΐνη Core προκαλεί αύξηση.

#### Γ.1.5. ΧΡΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ OIL RED O ΣΕ PCDNA ΚΑΙ ΚΛΩΝΟ HUH1B

Υπάρχουν αρκετές επιστημονικές μελέτες οι οποίες επισημαίνουν την εμπλοκή της πρωτεΐνης LSD-1 στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού στο ήπαρ. Επιχειρήσαμε να εξερευνήσουμε το αποτέλεσμα αυτού του ρυθμιστικού ρολού μέσω της απεικόνισης της ποσότητας των λιπιδίων που βρίσκονται εντός του ηπατικού κυττάρου σε συνθήκες ενδογενούς έκφρασης (*pcDNA*) και σε συνθήκες υπερέκφρασης (*Huh1B*) της πρωτεΐνης LSD-1. Γι' αυτό το λόγο εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο χρώσης με *OIL RED O* σε κύτταρα *pcDNA* (μάρτυρας) και σε κύτταρα κλώνου *Huh1B*. Τα αποτελέσματα μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο φαίνονται στις παρακάτω εικόνες.



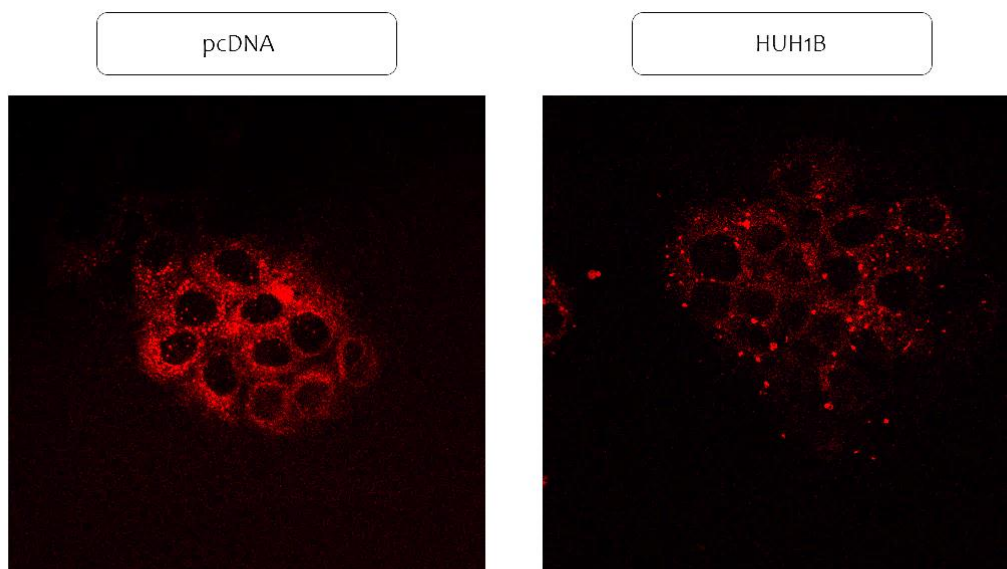
Εικόνα 3-4: Χρώση Oil Red O σε ηπατοκύτταρα μάρτυρα *PCDNA* και στον κλώνο *Huh1B* για την ανίχνευση λιπιδικών σταγονιδίων.

Διαπιστώνουμε μια σημαντική μείωση στον αριθμό και στο μέγεθος των κυτταρικών λιπιδίων στον κλώνο *Huh1B* που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη LSD-1 σε σχέση με το μάρτυρα *pcDNA*. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά της επιστημονικής μελέτης του *Abdulla et al., 2014* που υποστηρίζουν ότι σε φυσιολογικές κυτταρικές συνθήκες η πρωτεΐνη LSD-1 επάγει την έκφραση λιπογενών γονιδίων μέσω της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων SREBPs, και αυτό αποτυπώνεται με αύξηση των επιπέδων των λιπιδικών σταγονιδίων εντός του ηπατοκυττάρου. Ενώ σε συνθήκες υπερέκφρασης της LSD-1, προκαλείται το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα, φαίνεται η πρωτεΐνη να αποκτά έναν αρνητικό επικρατή ρόλο και να μειώνει δραστικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων.

#### Γ.1.6. ΧΡΩΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΣΤΙΚΗ BODIPY ΣΕ pcDNA ΚΑΙ ΚΛΩΝΟ HUH1B

Το *BODIPY* (493/503) θεωρείται η κύρια χρωστική η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη των λιπιδικών σταγονιδίων (*LDs*) εντός των ηπατοκυττάρων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εκτός από τη χρώση με *Oil Red O* για την απεικόνιση των λιπιδικών σταγονιδίων (*LDs*), προσπαθήσαμε να τα ανιχνεύσουμε και με χρώση *Bodipy*, που στηρίζεται στο φθορισμό και στην παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα της χρώσης *Bodipy* σε ηπατοκύτταρα μάρτυρα (*pcDNA*) και κλώνου υπερέκφρασης της *LSD-1* πρωτεΐνης (*Huh1B*) φαίνονται στις παρακάτω εικόνες. Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι στην κλώνο η ποσότητα των λιπιδικών σταγονιδίων είναι εμφανώς μικρότερη σε σχέση με το μάρτυρα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματά που προέκυψαν με τη χρώση *Oil Red O*.



Εικόνα 3-5: Χρώση λιπιδικών σταγονιδίων (*LDs*) με *BODIPY* (493/503) σε ηπατοκύτταρα *pcDNA* (*control*) και κλώνου υπερέκφρασης *LSD-1* (*Huh1B*) επιδεικνύουν την εμφάνιση σφαιρικών *LDs* όπως περιεγράφηκε προηγουμένως με διαδικασίες χρώσης *Oil Red O*.

## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Δ.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θελήσαμε να εξερευνήσουμε την αμφίδρομη αλληλεπίδραση του ιού της ηπατίτιδας C με τον επιγενετικό παράγοντα LSD-1 σε καρκινικές ηπατικές κυτταροσειρές. Η αφορμή για τη μελέτη της συσχέτισης των δυο αυτών παραμέτρων προέκυψε από τη διαπίστωση ότι τόσο ο ιός της ηπατίτιδας C όσο και η πρωτεΐνη LSD-1 συμμετέχουν ενεργά σε δυο βιολογικά φαινόμενα, στη μεταβολή του λιπιδικού μεταβολισμού και στην εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Εύλογα λοιπόν θελήσαμε να δημιουργήσουμε συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών τα οποία να μας επιτρέπουν τη μελέτη της επίδρασης του ιού της ηπατίτιδας C και της πρωτεΐνης LSD-1 στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού και στην πρόκληση ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

#### Δ.1.1. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΙΟΥ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) θεωρείται ο πέμπτος πιο κοινός τύπος καρκίνου, και η κύρια αιτία θανάτου σχετιζόμενη με το ήπαρ παγκοσμίως. Συντριπτικά στοιχεία από επιδημιολογικές έρευνες αποδεικνύουν ότι η επίμονη μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί το βασικό κίνδυνο εμφάνισης ΗΚΚ. Τα επίπεδα της νοσηρότητας και θνησιμότητας του σχετιζόμενου με τον ιό HCV ηπατοκυτταρικού καρκινώματος παραμένουν υψηλά, καθώς τα ποσοστά κίρρωσης από HCV συνεχίζουν να αυξάνονται. Ο μακροπρόθεσμος στόχος της αντιϊκής θεραπείας για χρόνια ηπατίτιδα C είναι η μείωση των επιπλοκών από την κίρρωση, συμπεριλαμβανομένης της εξέλιξης της σε ΗΚΚ.

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, κυρίως μέσω έμμεσων σηματοδοτικών και μεταβολικών μονοπατιών: χρόνια φλεγμονή και κυτταρικό θάνατο. HCV γονιδιώματα ανιχνεύονται σε όγκους αλλά και σε παρακείμενους ιστούς. Κλινικές έρευνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά μοντέλα ποντικού στα οποία η ιική πρωτεΐνη Core έχει ογκογόνο δυναμική, υποδεικνύουν ότι ο ιός HCV εμπλέκεται άμεσα στην ηπατοκαρκινογένεση. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι, ο HCV είναι ικανός να επάγει την παραγωγή ελεύθερων ριζών *per se*, και δεν είναι μόνο μέσω της φλεγμονής, και της ειδικής δράσης της πρωτεΐνης Core [127].

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ανέρχεται σε ποσοστό 85 έως 90% των περιπτώσεων πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος. Η χρόνια ηπατίτιδα και η κίρρωση αποτελούν τις κύριες προ-

νεοπλαστικές καταστάσεις στην πλειονότητα των ΗΚΚ. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ για έναν ασθενή με κίρρωση σχετιζόμενη με τον HCV είναι περίπου 2-6% ανά έτος. Ο κίνδυνος για ΗΚΚ αυξάνεται κατά 17 φορές σε μολυσμένους με HCV ασθενείς σε σύγκριση με HCV-αρνητικά άτομα. Γενικά, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα αναπτύσσεται μόνο μετά από δύο ή περισσότερες δεκαετίες με χρόνια HCV λοίμωξη και ο αυξημένος κίνδυνος εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό σε ασθενείς με κίρρωση ή προχωρημένη ίνωση [128].

Η εμφάνιση καρκίνου θεωρείται μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία. Η συσσώρευση γενετικών μεταλλαγών στα ηπατικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την ηπατική καρκινογένεση. Ωστόσο, στην περίπτωση της χρόνιας HCV λοίμωξης, ορισμένα από τα στάδια της καρκινογένεσης ενδέχεται να παραλειφθούν παρουσία της ιικής πρωτεΐνης Core.

Όπως έχει εκτενώς αναλυθεί η μοριακή βιολογία του ιού της ηπατίτιδας C σε προηγούμενη ενότητα, πρόκειται για έναν εικοσαεδρικό ιό RNA που μεταφέρεται με το αίμα, αποτελεί μέλος της οικογένειας των *Flaviviridae* και διαθέτει γονιδίωμα μεγέθους 9.6 Kb. Το γονιδίωμα του HCV κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη η οποία υπόκειται σε επεξεργασία με ικές και κυτταρικές πρωτεϊνάσες για την παραγωγή των δομικών και μη δομικών επιμέρους πρωτεϊνών του. Μεταξύ των μη δομικών πρωτεϊνών είναι οι NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B. Η κωδική περιοχή NS3-NS5B χρησιμεύει ως HCV ρεπλικάση, και ως εκ τούτου απαιτείται για το σωστό αναδιπλασιασμό του RNA σε κυτταροκαλλιέργειες και χιμπατζήδες. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες NS3, NS5A, και NS5B διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του HCV και ενισχύουν τον ογκογόνο μετασχηματισμό.

Σε αντίθεση με το ιό της ηπατίτιδας B (HBV), το γονιδίωμα του HCV δεν μπορεί να ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Ωστόσο, είναι σε θέση να προκαλέσει επιγενετικές αλλαγές που ευνοούν τη δική του αναπαραγωγή και να προκαλέσει ογκογόνες τροποποιήσεις μέσω των μη δομικών του πρωτεϊνών NS3, NS5A και NS5B που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου του ήπατος [129].

Αναλυτικότερα, η απολιποπρωτεΐνη E (*Apolipoprotein E; ApoE*) που απαιτείται για την ική αναπαραγωγή και ευνοεί τη μολυσματικότητα του HCV, θεωρείται γνωστό ότι εμφανίζεται υπερμεθυλιωμένη στη χρόνια ηπατίτιδα C. Εν προκειμένω, η υπερμεθυλίωση αυτή συνδέεται με αυξημένα επίπεδα ικού πολλαπλασιασμού και υψηλό κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας. Ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως τα γονίδια της E-καδερίνης (*E-cadherin; CDH1*) και του *p16*, εμπλέκονται σε μεταγραφικές δραστηριότητες της ικής πρωτεΐνης Core και υπόκεινται επιγενετικά σε απορρύθμιση μέσω DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs). Ειδικότερα, η πρωτεΐνη Core διεγείρει την αθανатоποίηση των

ηπατοκυττάρων καταστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων *p16* και της E-καδερίνης μέσω της αυξορρυθμισμού των DNA μεθυλοτρανσφερασών DNMT1 και DNMT3B [129].

Μειωμένη ρύθμιση του γονιδίου *SFPR1* (*Secreted Frizzled-related Protein 1 Gene; SPFR1*) μέσω της διαμεσολαβούμενης από την πρωτεΐνη Core μεθυλίωσης του, σχετίζεται με ανώμαλη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού *Wnt*, και κατ'επέκταση μη ελεγχόμενη επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση, συνθήκες που ευνοούν την καρκινογένεση στο ήπαρ. Η αποσιώπηση του *SFPR1* γονιδίου προκλήθηκε με μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του από την DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 (DNMT1) [130]. Καταστολή των ενζύμων, DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (DNMT1) και αποακετυλάσης ιστονών 1 (HDAC1) επανάφερε τη φυσιολογική λειτουργία των σηματοδοτικών μονοπατιών *Wnt/β-catenin-c-myc-cyclin D1* με αποτέλεσμα την αναστολή της ογκογόνου αύξησης και επιθετικότητας.

Οι επιγενετικές μεταβολές οι οποίες παρατηρούνται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μετά από χρόνια λοίμωξη με τον ιό HCV μπορεί επίσης να εμπλέκουν το γονίδιο *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A; CDKN2A*). Αρκετές μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη μεταβολή της μεταγραφής κυτταρικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων κλασικών ογκοκατασταλτικών γονιδίων που είναι γνωστά στο να προάγουν επιγενετικά τον κακοήθη μετασχηματισμό. Η τριμεθυλίωση του καταλοίπου της λυσίνης 23 στην ιστόνη H3 (H3K27me3) θεωρείται ένας καλά καθιερωμένος δείκτης μεταγραφικά ανενεργής χρωματίνης [131]. Ο κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινάσης 2A (CDKN2A) ταυτοποιήθηκε ως στόχος καταστολής από την H3K27me3 σε βιοψίες δειγμάτων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Το γονίδιο *CDKN2A* κωδικοποιεί για δυο σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια, *p16<sup>ink4a</sup>* και *p14<sup>arf</sup>*, που εμποδίζουν το σχηματισμό όγκων μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, διαίρεσης και απόπτωσης. Η πρωτεΐνη *p16<sup>ink4a</sup>* συνδέεται με την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 4 (CDK4) ή 6 (CDK6) και αναστέλλει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη *p14<sup>arf</sup>* προστατεύει την πρωτεΐνη *p53* από αποικοδόμηση και προάγει την ενεργοποίηση της *p21* οδηγώντας σε ελεγχόμενη κυτταρική διαίρεση και αυξημένη απόπτωση. Η επιγενετική καταστολή του γονιδίου *CDKN2A* έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του σηματοδοτικού μονοπατιού CDKN2A-TP53-P21 και επαγωγή καρκινογένεσης.

Η επαγόμενη από τον ξενιστή ανοσολογική απόκριση διαμεσολαβείται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF), και τις ιντερφερόνες (IFNs) μέσω της χρόνιας φλεγμονής από την HCV λοίμωξη. Οι επαναλαμβανόμενοι κυτταρικοί κύκλοι συνδέονται με συσσώρευση μεταλλάξεων, οι οποίες μπορούν να μετασχηματίζουν τα ηπατοκύτταρα σε κακοήθη κύτταρα. Τα γονίδια που μεταλλάσσονται συχνότερα στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα είναι η αντίστροφη μεταγραφάση τελομεράσης, η ογκοκατασταλτική

πρωτεΐνη p53 και η β-καδερίνη όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτές οι μεταλλάξεις απειλούν τη συντήρηση των τελομερών και οδηγούν σε αυξημένο οξειδωτικό στρες. Οι περισσότερες περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκίνου προκύπτουν από τα ηπατοκύτταρα σε κίρρωτικά οζίδια στα οποία έχουν συσσωρευτεί αρκετές μεταλλάξεις για την επανενεργοποίηση της τελομεράσης και την επανέναρξη του κυτταρικού κύκλου. Επιπρόσθετα, οξειδωτικό στρες που επάγεται στα ηπατοκύτταρα από τον ίδιο τον ιό και από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή σε αυτό, συντελεί σε κυτταρικό θάνατο και αναγέννηση, προκαλώντας μεταλλάξεις στα ηπατοκύτταρα και τελικά, την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου [129].

#### Δ.1.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1 ΚΑΙ ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ

Οι γενετικές τροποποιήσεις αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου στον άνθρωπο. Τα τελευταία χρόνια, το πεδίο της γονιδιωματικής του καρκίνου σημειώνει σημαντική πρόοδο στον τομέα του καθορισμού των γενετικών βλαβών που σχετίζεται με νεοπλασματικές ασθένειες. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί η σημασία των επιγενετικών τροποποιήσεων στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος [132]. Αυτές οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να λάβουν τη μορφή DNA μεθυλίωσης ή τροποποίησης ιστονών [133]. Τροποποιήσεις ιστονών με τη μορφή εκλεκτικής ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, και μεθυλίωσης χρησιμεύουν ως διακόπτες που μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης, και επιτρέπουν είτε τη μετα-μεταγραφική ενεργοποίηση είτε την καταστολή των καταρροϊκών πρωτεϊνών [134].

Η κατάσταση μεθυλίωσης των ιστονών από τις μεθυλοτρανσφεράσες και τις απομεθυλάσες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [135]. Ειδικότερα, οι επιγενετικές αλλαγές στην LSD-1 έχει αποδειχθεί ότι κατέχουν βασικό ρόλο στην καρκινογένεση [136]. Η LSD-1 μπορεί να αποτρέψει τη συσσώρευση ομάδων διμεθυλίου στο γονίδιο p53, με αποτέλεσμα την αναστολή της αποπτωτικής του δράσης και την καταστολή της p53-διαμεσολαβούμενης μεταγραφικής αυξορρύθμισης. Η υπερέκφραση της LSD-1 παρατηρήθηκε σε κακοήθεις ιστούς σε προχωρημένο στάδιο και με υψηλότερο βαθμό αποδιαφοροποίησης.

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πρωτεΐνη LSD-1 μπορεί να επιταχύνει τον κυτταρικό κύκλο (έλλειψη της LSD-1 οδήγησε σε μερική αναστολή κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M) και να επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση της μπορεί να συμβάλλει στην ογκογένεση. Η έκφραση της LSD-1 έχει συσχετιστεί με την επανεμφάνιση όγκων κατά τη διάρκεια της



θεραπείας σε διάφορους τύπους καρκίνου, ένδειξη που ενισχύει την υπόθεση ότι η LSD-1 δρα ως ογκογόνος παράγοντας [137].

Καρκινικά *stem-like* κύτταρα (*Cancer stem-like cells; CSCs*) χαρακτηρίζονται εκείνα τα κύτταρα του όγκου τα οποία εμφανίζουν λειτουργικές ομοιότητες με τα βλαστοκύτταρα και επομένως έχουν την ικανότητα να αυτοανανεώνονται, εν προκειμένω ανεξέλεγκτα. Τα *CSCs* στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα πιστεύεται ότι μεσολαβούν στην ανάπτυξη αντοχής σε θεραπευτικές μεθόδους και χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της LSD-1 συσχετίζονται με τα *CSCs*. Αν και ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ρυθμίζει η LSD-1 τη λειτουργία των *CSCs* δεν είναι πλήρως κατανοητός, πιθανώς ενεργεί ως ένας επιγενετικός μεσολαβητής που εμπλέκεται στη διατήρηση και/ή διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Η μειορρύθμιση της LSD-1 ανέστειλε την αυτοανανέωση και ογκογονικότητα των *CSCs*, υποδεικνύοντας έναν κρίσιμο ρόλο για αυτή την πρωτεΐνη σε αυτές τις διεργασίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ακετυλίωση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη μετα-μεταφραστική ρύθμιση της πρωτεΐνης LSD-1 με δύο μηχανισμούς. Κατ' αρχάς, η ακετυλίωση αναστέλλει την έκφραση και την ενζυματική της δραστηριότητα. Δεύτερον, διεγείρει την αποικοδόμηση της LSD-1 μέσω του πρωτεασώματος, επηρεάζοντας έτσι τη σταθερότητά της. Συγκεκριμένα, ακετυλίωση της LSD-1 προκλήθηκε σε ηπατικά μη-*CSCs*, και διαπιστώθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδα ακετυλίωσης σε αυτά τα κύτταρα μπορεί να συμβάλλουν σε αυξημένη έκφραση της LSD-1 και επομένως να διεγείρουν την ογκογένεση [138].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ενεργοποιείται και κατέχει ογκογόνο ρόλο στο ΗΚΚ. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού σηματοδότησης απαιτείται για τη διατήρηση της αυτοανανέωσης των *CSCs* του ήπατος μέσω της ενεργοποίησης άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως των SOX9 ή Stat3 και Wnt/-κατενίνης. Σύμφωνα με μελέτη των *Liu et al., 2017*, το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch μπορεί να ρυθμίσει την ακετυλίωση της LSD-1. Μηχανιστικά, αυτό φαίνεται να προκαλείται μέσω της επαγωγή της έκφρασης της *SIRT1*. Η αναστολή του μονοπατιού Notch μείωσε τα επίπεδα της αποακετυλάσης *SIRT1* (*NAD-dependent Deacetylase Sirtuin-1; SIRT1*) και ταυτόχρονα αύξησε την ακετυλίωση της LSD-1. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η σηματοδότηση μέσω Notch προωθεί την αυτοανανέωση των *CSCs* τουλάχιστον μέσω της επαγωγή της *SIRT1* και κατά συνέπεια με την ενεργοποίηση της LSD-1, της οποίας τα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται ιδιαίτερα υψηλά. Τα καρκινικά σε σχέση με τα μη καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη ακετυλίωση στο μόριο της LSD-1, συνθήκη με ογκογόνο δράση [139].

Τέλος, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η εναλλαγή από το μιτοχονδριακό στο γλυκολυτικό μεταβολισμό, το αποκαλούμενο *Warburg Effect*, με στόχο την αποτελεσματικότερη προσαρμογή στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Υπάρχουσες μελέτες έχουν δείξει ότι,

μέσα στη δαιδαλώδη πολυπλοκότητα των επιγενετικών μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού του καρκίνου, ουσιαστικό ρόλο κατέχει η απομεθυλάση LSD-1. Συμβάλλει ενεργά στη διατήρηση της μεταβολικής μετατόπισης σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Αναστολή της LSD-1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων πρόσληψης γλυκόζης αλλά και της γλυκολυτικής δραστηριότητας, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής αναπνοής. Αυτές οι μεταβολικές τροποποιήσεις συνυπάρχουν με την αδρανοποίηση του επαγόμενου από υποξία παράγοντα HIF-1α (*Hypoxia-inducible Factor-1 alpha; HIF-1a*), με αποτέλεσμα μειωμένη έκφραση του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-1 (*Glucose transporter 1; GLUT-1*) και άλλων γλυκολυτικών ενζύμων. Σε συνθήκες αναστολής της έκφρασης της LSD-1, ένα σύνολο γονιδίων μιτοχονδριακού μεταβολισμού ενεργοποιούνται με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων μεθυλίωσης της λυσίνης 4 στο μόριο της ιστόνης H3 (H3K4) σε περιοχές γονιδιακών υποκινητών. Κατά συνέπεια, τα επίπεδα έκφρασης τόσο της πρωτεΐνης LSD-1 όσο και του μεταφορέα γλυκόζης GLUT-1 είναι σημαντικά υψηλά σε ιστούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Διαπιστώνουμε δηλαδή ότι, η παρατηρούμενη επιγενετική πλαστικότητα του μεταβολισμού των ηπατικών καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει ένα μηχανισμό στον οποίο μεσολαβεί ενεργά η πρωτεΐνη LSD-1 [140].

#### Δ.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1

Βασιζόμενοι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, θελήσαμε να εξερευνήσουμε την αλληλεπίδραση του ιού της ηπατίτιδας C με τον επιγενετικό παράγοντα LSD-1, υπο το πρίσμα του λιπιδικού μεταβολισμού. Γνωρίζουμε ότι ο ιός HCV εμφανίζει υψηλή εξάρτηση στο λιπιδικό δυναμικό του κυττάρου ξενιστή καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. Προκειμένου να επιτύχει την εξασφάλιση και την ενίσχυση του αναδιπλάσιασμού του, τροποποιεί μηχανισμούς του λιπιδικού μεταβολισμού.

Συνοπτικά υπενθυμίζουμε ότι, τα ισωμάτια του HCV κυκλοφορούν στο αίμα πάντα σε σύνδεση με κυτταρικές λιποπρωτεΐνες και μπορούν υπό αυτή τη μορφή να μετακινηθούν από ηπατικό σε ηπατικό κύτταρο και να διασπείρουν τη μόλυνση σε όλη την έκταση του ηπατικού ιστού. Ο ιός χρησιμοποιεί κυτταρικούς υποδοχείς δέσμησης χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (*Very-low Density Lipoproteins; VLDLs*) και γλυκοζαμινογλυκάνες, προκειμένου να εισέλθει στα ηπατοκύτταρα, όπου τροποποιεί την ενδοκυτταρική μεμβρανώδη αρχιτεκτονική και χρησιμοποιεί το απόθεμα των λιπιδικών σταγονιδίων, με απώτερο στόχο την αντιγραφή του γονιδιώματος του και τη συναρμολόγηση των ιικών λιποσωματιδίων. Είναι γνωστό, ότι τα συστατικά στοιχεία που εμπλέκονται στη συναρμολόγηση των χαμηλής πυκνότητας

λιποπρωτεϊνών (VLDLs) απαιτούνται επίσης για μορφογένεση και έκκριση του HCV, υποδηλώνοντας ότι ο ιός HCV χρησιμοποιεί το εκκριτικό τους μονοπάτι για τη δική του απελευθέρωση. Τα παραπάνω δεδομένα καθιστούν εμφανείς τους λόγους για τους οποίους η HCV μόλυνση βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με ενισχυμένη λιπογένεση και μειωμένα επίπεδα έκκρισης και β-οξειδωσης των λιπιδίων.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαχείριση των μοριακών μηχανισμών του κυτταρικού λιπιδικού μεταβολισμού είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση του ιού της ηπατίτιδας C, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην ανακάλυψη και μελέτη βασικών παραγόντων για τη ρύθμιση της λιπογένεσης και στη πιθανή συσχέτιση τους με τις δραστηριότητες του ιού εντός του κυττάρου ξενιστή. Μεταξύ των ρυθμιστικών μορίων της λιπογένεσης εξέχουσα θέση κατέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBPs (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins; SREBPs*) [141]. Οι SREBPs εμφανίζονται σε σύνδεση με μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, πρόκειται για συντηρημένους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων. Υπάρχουν τρεις ισομορφές, και διακρίνονται στους SREBP-1a, SREBP-1c και SREBP-2. Ο μεταγραφικός παράγοντας SREBP-1a ενεργοποιεί όλα τα γονίδια στόχων των SREBPs, ενώ οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBP-1c και το SREBP-2 ενεργοποιούν γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης, αντίστοιχα [141,142].

Δεδομένης της σημασίας των SREBPs στο λιπιδικό μεταβολισμό, έχουν πραγματοποιηθεί επιστημονικές μελέτες για τη διερεύνηση του μηχανισμού ενεργοποίησής τους στα πλαίσια HCV μόλυνσης σε συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών. Έχει διαπιστωθεί ότι, η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών HCV του γονότυπου 1b μπορεί να προκαλέσει πρωτεολυτική επεξεργασία του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-2. Ειδικότερα, η μη δομική ιική πρωτεΐνη NS4B, είτε του γονότυπου 1 είτε του 3, μπορεί να προκαλέσει πρωτεολυτική διάσπαση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-2, πιθανώς μέσω των δομικών αλλαγών που προκαλεί στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (*Endoplasmic Reticulum; ER*) και μέσω του επακόλουθου ER στρες. Το ER στρες προκαλεί την πρωτεολυτική διάσπαση των προδρόμων SREBPs στην ώριμη τους μορφή [143,144]. Η πρωτεΐνη NS4B είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία επάγει τη διαμόρφωση ενός μεμβρανώδους δικτύου εντός του κυτοσολίου, η ύπαρξη του οποίου δημιουργεί το ER στρες [145,146]. Είναι επίσης πιθανό ότι, η επαγωγή της δημιουργίας αυτού του μεμβρανώδους ιστού ως μια νέας πλατφόρμας όπου θα λαμβάνουν χώρα οι δραστηριότητες αναδιπλασιασμού του ιού HCV να απαιτεί υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης. Και η διέγερση των μεταγραφικά ενεργών SREBPs συμφωνεί με αυτή την απαίτηση. Επίσης έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες HCV Core και NS4B του γονότυπου 3a εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά στην πρωτεολυτική επεξεργασία του SREBP-2

[147] και αυτό συμφωνεί με μελέτες στις οποίες προέκυψε ότι η πρωτεΐνη HCV Core του γονότυπο 3a προκαλεί σημαντική συσσώρευση των τριγλυκεριδίων [148,149].

Επιπρόσθετα, επιστημονικά στοιχεία υποστηρίζουν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBPs όχι μόνο συμμετέχουν σε γεγονότα που σχετίζονται με τη ρύθμιση της χοληστερόλης αλλά αποτελούν και ρυθμιστικούς στόχους της MAP κινάσης και του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3-K-AKT. Ο συνδυαστικός κύκλος με τον ιό HCV προκύπτει από το γεγονός ότι μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση των ιικών γονιδίων προκαλεί την ενεργοποίηση των κυτταρικών κινασών όπως JAK, MAP κινάση, και της οδού σηματοδότησης PI3-K-AKT μέσω οξειδωτικού στρες, και της σηματοδότησης του ασβεστίου [150,151]. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων σερίνης των SREBPs σε κύτταρα μολυσμένα με ιό HCV, η οποία είναι αποτέλεσμα της HCV επαγόμενης σηματοδότησης ασβεστίου, της επακόλουθης αύξησης των επιπέδων των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και της ενεργοποίησης της PI3 κινάσης. Η φωσφορυλίωση των SREBPs συμβάλλει στην παραγωγή ομο- και ετεροδιμερών, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν το δυναμικό διενεργοποίησης των SREBPs [152,153]. Όπως έχει προαναφερθεί τα μονοπάτια σηματοδότησης της MAP κινάσης και PI3-K-AKT έχουν αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής των SREBPs [152,153]. Τέλος, έχει διαπιστωθεί η παρουσία φωσφορυλιωμένης PTEN κατά τη διάρκεια HCV μόλυνσης. Η Phospho-PTEN είναι μια ανενεργή μορφή της φωσφατάση PTEN, η οποία ευνοεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3-K-AKT σε HCV-μολυσμένα κύτταρα [154].

Σύμφωνα με μελέτες, η πρωτεΐνη HCV Core αυξάνει τα επίπεδα της λιπογένεσης στα ηπατοκύτταρα. Χρησιμοποιεί το κυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT με στόχο την επαγωγή της φωσφορυλίωσης του SREBP-1a. Η φωσφορυλίωση θεωρείται καθοριστικός μηχανισμός για τη ρύθμιση της λειτουργίας του SREBP-1a, γιατί επηρεάζει τη σταθερότητα του και τη δυνατότητα πρόσδεσης του στην αλληλουχία των υποκινητών των γονιδίων στόχων. Τέλος, εκτός από την πρωτεΐνη Core έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες για την πρωτεΐνη NS5A. Τέλος έχει διαπιστωθεί, ότι η φωσφορυλιωμένη της μορφή της πρωτεΐνης NS5A εμπλέκεται στη διαδικασία συναρμολόγησης των ιικών σωματιδίων του HCV, επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη Core [155]. Η πρωτεΐνη NS5A έρχεται σε επαφή και ενεργοποιεί την PI4KIII A (*Phosphatidylinositol-4 Kinase-IIa; PI4KIIIa ή PI4KA*) κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του HCV, η οποία με τη σειρά της αλληλεπιδρά με δυο πρωτεΐνες μεταφορείς λιπιδίων, τις OSBP και FAPP2. Οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρουν λιπίδια στο ιικό συμπλοκο αντιγραφής [156-158].

Η ρύθμιση της πρωτεολυτικής διάσπασης των μεταγραφικών παραγόντων SREBP-1a και του SREBP-2 με βάση την περιεκτικότητα στερόλης στο κύτταρο αλλά και την παρουσία HCV λοίμωξης είναι

καλά καθορισμένη, ωστόσο λίγα δεδομένα υπάρχουν όσον αφορά στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1c, που αποτελεί την κυρίαρχη ισόμορφη στο ήπαρ [159]. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι οι υποδοχείς LXRs (*Liver X receptors; LXRs*) επάγουν τον SREBP-1c σε μεταγραφικό επίπεδο [160]. Οι LXRs, LXRa και LXRb, είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούνται μέσω της πρόσδεσης μορίου συνδέτη (*Ligand*) και θεωρούνται μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων δέσμησης στο DNA. Οι λειτουργίες τους σχετίζονται με τους υποδοχείς ρετινοειδών X. Οι LXRs παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση της χοληστερόλης και στην ηπατική λιπογένεση [161]. Ο υποδοχέας LXRa προκαλεί την επαγωγή του SREBP-1c μέσω της πρόσδεσης στοιχείων LXREs στις περιοχές του υποκινητή του [162]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενεργοποίηση του LXRa αυξάνει την έκφραση SREBP-1c, η οποία οδηγεί σε ηπατική λιπογένεση και υπερτριγλυκεριδαιμία. Παράλληλα έχουν διαπιστωθεί υψηλά επίπεδα μεταγραφικής διέγερσης του mRNA των LXRs σε κύτταρα μολυσμένα με HCV. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έκφραση γονιδίων του HCV διεγείρει την ενεργοποίηση του SREBP-1c σε μεταγραφικό επίπεδο τουλάχιστον μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης των LXRs. Πώς επάγει ο ιός HCV την ενεργοποίηση των LXRs και στη συνέχεια τον SREBP-1c δεν είναι σαφώς κατανοητό [147], ωστόσο είναι γνωστό ότι εφόσον ο HCV εξαρτάται από την οδό σύνθεσης λιπαρών οξέων για την αποτελεσματική αντιγραφή RNA, αιτιολογείται η εμπλοκή του σε αυτό το μονοπάτι [159].

Ο ρόλος της πρωτεΐνης NS5A διαφορετικών HCV γονότυπων στη διαμόρφωση της έκφρασης των λιπογενών γονιδίων δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η NS5A του HCV-3a μπορεί να επάγει την έκφραση του SREBP-1c σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω της πρωτεΐνης Sp1 (*Specificity Protein 1; Sp1*) [163]. Πρόκειται για έναν ευρέως διαδεδομένο μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος μέσω της πρόσδεσης του σε μοτίβα αλληλουχιών πλούσια σε GC των υποκινητών γονιδίων στόχων ρυθμίζει την έκφραση τους. Άλλα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη NS5A του HCV-1b είναι ασθενέστερος ενεργοποιητής της δραστηριότητας SREBP-1c [147]. Φαίνεται λοιπόν ότι, οι διαφορετικοί γονότυποι του HCV εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά μηχανισμών στεατογένεσης.

Έχει δειχθεί ότι αναστολή των SREBPs με θεραπεία με 25-υδροξυχοληστερόλες, αναστέλλει την αντιγραφή του HCV. Ομοίως, η συνθετάση των λιπαρών οξέων (FAS), ένα ένζυμο που εμπλέκεται πρωτίστως στην de novo λιπογένεση, αυξορρυθμίζεται κατά τη διάρκεια μόλυνσης από τον ιό HCV και η αναστολή της δραστηριότητας της αναστέλλει την HCV αναπαραγωγή και απελευθέρωση [141,142].

Τέλος, υπάρχουν μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι ο ιός HCV έχει ιδιαίτερα εκτεταμένο φάσμα δράσης για την εξασφάλιση της ενεργοποίησής των SREBPs. Σε συνέχεια όσων έχουν αναφερθεί ως τώρα, ο ιός HCV επεμβαίνει στη ρύθμιση της έκφρασης των SREBPs και μέσω μη-κωδίκων μορίων RNA. Επάγει

την αυξορρύθμιση δυο κυτταρικών μη-κωδικών RNAs, του lnc-HR-1 και του HOTAIR [164,165]. Σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό, τα επίπεδα της έκφρασης του lnc-HR1 είναι υψηλά. Το συγκεκριμένο μη-κωδικό RNA κατέχει ρυθμιστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1c μέσω της φωσφορυλίωσης του PDK1/AKT/FoxO1 μονοπατιού, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τριγλυκεριδίων και λιπιδικών σταγονιδίων στα ηπατικά μολυσμένα κύτταρα, τα οποία χρειάζεται ο ιός HCV για τον αναδιπλασιασμό του. Τέλος, η πρωτεΐνη HCV Core επάγει την έκφραση του μη-κωδικού lncRNA HOTAIR, το οποίο μπλοκάρει την έκφραση της αποακετυλάσης SIRT1, η οποία είναι καταστολέας των μεταγραφικών παραγόντων SREBPs [164,165].

Συμπερασματικά, έχουμε παραθέσει βιβλιογραφικές αναφορές, οι οποίες παρέχουν δεδομένα τα οποία αποδεικνύουν ότι ο ιός HCV έχει βρει διάφορους τρόπους με τους οποίους επιτυγχάνει να εμπλακεί στη ρύθμιση/ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων *SREBPs*. Αυτό πραγματοποιείται είτε μέσω της επαγωγής της πρωτεολυτικής τους επεξεργασίας η οποία είναι καθοριστικής σημασίας για την απελευθέρωση της ώριμης ενεργής μορφής τους, είτε μέσω της επαγωγής σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγουν τη φωσφορυλίωση τους απαραίτητη για την ενεργοποίηση της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων *SREBPs*, είτε τέλος μέσω της εμπλοκής τους στη λειτουργία ηπατικών υποδοχέων (*LXRs*) που επάγουν την έκφραση τους σε μεταγραφικό επίπεδο.

Εύλογα λοιπόν, υποθέσαμε ότι εφόσον ο επιγενετικός παράγοντας LSD-1 συμμετέχει στην επαγωγή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων *SREBPs*, ο ιός HCV θα μπορούσε να διαμεσολαβεί στη ρύθμιση του, χρησιμοποιώντας τον ως έναν επιπρόσθετο τρόπο ελέγχου του βιοσυνθετικού μονοπατιού της λιπογένεσης. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε, ότι η πρωτεΐνη LSD-1 βρίσκεται σε άμεση φυσική αλληλεπίδραση με την NAD<sup>+</sup>-εξαρτώμενη αποακετυλάση ιστονών SIRT1. Η SIRT1 θεωρείται ένας σημαντικός καταστολέας των *SREBPs* (*Sterol Regulatory Elements Binding Proteins; SREBPs*), καθώς επάγει την αποακετυλίωση τους με τελικό αποτέλεσμα την αποικοδόμηση τους. Σύμφωνα με μελέτη των *Abdulla et al., 2014*, η δράση της SIRT1 υπερκαλύπτεται από το θετικό ρόλο της πρωτεΐνης LSD-1 να επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP-1a, και απαιτείται για την SREBP-1a-διαμεσολαβούμενη μεταγραφή του γονιδίου της συνθετάσης λιπαρών οξέων (FAS), ρυθμίζοντας τη δέσμευση του SREBP-1a στον υποκινητή της FAS.

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν για το ρόλο της HCV λοίμωξης σε ένα ευρύτερο πλαίσιο, καθώς ειδικότερα για το ρόλο συγκεκριμένων ιικών πρωτεϊνών όπως των Core και NS5A στη ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων *SREBPs*, διαπιστώνουμε τη σημαντικότητα τους στην εξασφάλιση της επαρκούς ποσότητας λιπιδίων για τον επιτυχή πολλαπλασιασμό του ιού και μελετήσαμε την επίδραση

τους στα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1. Η LSD-1 συμμετέχει και αυτή στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού και εξετάσαμε κατά πόσο ο ιός έχει την ικανότητα να τη χρησιμοποιήσει ή όχι προς όφελος του.

Χρησιμοποιήσαμε σταθερές ηπατικές κυτταροσειρές τύπου *Tet-on/Tet-off* οι οποίες υπερεκφράζουν τα γονίδια NS5A και Core και μετρήσαμε τα ποσοστά έκφρασης της LSD-1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Το πείραμα σχεδιάστηκε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να εξεταστεί η έκφραση της LSD-1 και σε συνδυασμό με τη γήρανση των ηπατοκυττάρων και με ό,τι αυτή συνεπάγεται, όπως παραγωγή σημάτων κυτταρικού θανάτου, καθώς χρησιμοποιήσαμε περισσότερα του ενός *passages* (P2 έως P5).

Διαπιστώσαμε ότι η έκφραση της LSD-1 εμφανίζει ουσιαστική αύξηση στην κυτταροσειρά που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη Core-HCV-2a συγκριτικά με την κυτταροσειρά μάρτυρα (pTRE), τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην ανάγκη του HCV να επάγει την παραγωγή κυτταρικών λιπιδίων μέσω της Core, και η LSD-1 συμμετέχει σε αυτήν τη διαδικασία ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων SREBPs. Η πρωτεΐνη Core εμπλέκεται μεταξύ άλλων στη δημιουργία του ιικού καψιδίου, σε πρώιμο στάδιο του κύκλου ζωής του, οπότε και οι ανάγκες σε λιπίδια είναι υψηλές.

Όσον αφορά στην κυτταροσειρά που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη NS5A, τα επίπεδα της LSD-1 παρουσιάζονται μειωμένα. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με επιστημονικές μελέτες των οποίων τα αποτελέσματα προαναφέρθηκαν και βάση των οποίων διατυπώνεται η γενικότερη αντίληψη ότι και η πρωτεΐνη NS5A συμμετέχει στην επαγωγή της έκφρασης λιπογενών γονιδίων και στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων εντός του ηπατικού κυττάρου. Πολύ πιθανόν αυτή η μείωση σε πρώτη φάση να συσχετίζεται με το γονότυπο του HCV (HCV-2a) που χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας. Δεύτερον, γνωρίζουμε ότι η πρωτεΐνη NS5A συμμετέχει στην ιική αντιγραφή αλλά και στη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, πριν την απελευθέρωση τους στην κυκλοφορία του αίματος. Πιθανόν ο ιός δίνει προτεραιότητα στη διαδικασία της παραγωγής των ισοματιών στο συγκεκριμένο HCV γονότυπο, μειώνοντας προσωρινά τα επίπεδα της λιπογένεσης μέχρι να ολοκληρωθεί ο κύκλος ζωής του.

Συμπερασματικά, ο ιός HCV εξαρτώμενος από τη διαθέσιμη ποσότητα λιπιδίων εντός των ηπατοκυττάρων για τον πολλαπλασιασμό του έχει καταφέρει να παρεμβεί σε πολλαπλούς κυτταρικούς μηχανισμούς ρύθμισης του λιπιδικού μεταβολισμού και να τους χρησιμοποιεί προς όφελος του. Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της LSD-1 από την πρωτεΐνη Core, έχει θετικό αντίκτυπο στην εξάπλωση του ιού HCV στον ηπατικό ιστό και στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου.

## Δ.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ LSD-1 ΣΤΟΝ ΙΟ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

Η πρωτεΐνη LSD-1 μελετάται κυρίως στον καρκίνο, αλλά λόγω του μεγάλου βιολογικού της ρόλου, η δυσλειτουργία της διερευνάται όλο και περισσότερο και σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, φλεγμονή, καρδιαγγειακές παθήσεις και σε ιογενείς λοιμώξεις. Οι DNA ιοί δε συνδέονται με ιστόνες εντός του ιικού καψιδίου, αλλά σύντομα αποκτούν τη δομή της χρωματίνης μέσα στο κύτταρο ξενιστή μετά τη μόλυνση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες αναδιαμόρφωσης του γονιδιώματος τους θα μπορούσαν ένζυμα όπως μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών ή απομεθυλάσες να εμπλέκονται στη ρύθμιση του ιικού DNA. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η αναστολή της LSD-1 μπορεί να εμποδίσει τη μεταγραφή και αντιγραφή του γονιδιώματος των DNA ιών. Αντίθετα, οι RNA ιοί δε βασίζονται στη δομή της χρωματίνης για την αντιγραφή τους. Ως αποτέλεσμα, πιστεύεται ότι η LSD-1 έχει μικρή επίδραση στην αντιγραφή των RNA ιών μέσω απομεθυλίωσης ιστονών. Παρόλα αυτά, μέχρι τώρα μελέτες δεν μπορούσαν να αποκλείσουν την πιθανότητα ότι η LSD-1 ρυθμίζει την αντιγραφή του γονιδιώματος των RNA ιών μέσω της απομεθυλίωσης άλλων πρωτεϊνών του ξενιστή ή ακόμα και πρωτεϊνών των ιδίων των ιών [166].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε την ικανότητα της πρωτεΐνης LSD-1 να μεταβάλλει το ρυθμό αναδιπλασιασμού του ιού της ηπατίτιδας C. Γνωρίζουμε ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού στο ήπαρ, τον οποίο εκμεταλλεύεται ο ιός για την αντιγραφή του. Η βιβλιογραφία που υπάρχει όσον αφορά στην επίδραση της LSD-1 στον ιό της ηπατίτιδας C είναι πολύ περιορισμένη. Στη μελέτη των *Abdulla et al., 2014*, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η *υπερέκφραση της πρωτεΐνης LSD-1* πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα μια κυρίαρχη αρνητική επίδραση στην έκφραση των λιπογενών γονιδίων όπως της FAS και επομένως μείωση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων.

Προκειμένου να διαπιστώσουμε τι συμβαίνει σε συνθήκες υπερέκφρασης της LSD-1 όσον αφορά στα επίπεδα των λιπιδίων στα ηπατοκύτταρα και στη συνέχεια παρουσία HCV λοίμωξης, παρασκευάσαμε σταθερή ηπατοκυτταρική σειρά η οποία υπερεκφράζει την LSD-1. Πραγματοποιήσαμε χρώση *Oil Red O* και *Bodipy* για την απεικόνιση των λιπιδικών σταγονιδίων σε κλώνο υπερέκφρασης της LSD-1 και σε κύτταρα μάρτυρα. Διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στην ποσότητα και στο μέγεθος των λιπιδικών σταγονιδίων στα κύτταρα του κλώνου *Huh1B* σε σχέση με τα κύτταρα *Huh7*, μείωση η οποία επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις των *Abdulla et al., 2014*, για κατακόρυφη μείωση των τριγλυκεριδίων υπό καθεστώς υπερέκφρασης του επιγενετικού παράγοντα LSD-1.



Με βάση πειράματα τα οποία έχουν επίσης πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο της Μοριακής Ιολογίας προτείνεται ένας επιπρόσθετος μηχανισμός ρύθμισης του λιπιδικού μεταβολισμού από την πρωτεΐνη LSD-1 και αυτός είναι μέσω της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης *ANGPTL-3*. Πρόκειται για μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, που εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, και της οποίας η λειτουργία είναι στενά συνυφασμένη με το λιπιδικό μεταβολισμό. Θεωρείται καταστολέας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (*LPL*) καθώς και της ενδοθηλιακής λιπάσης (*LIPG*). Σε κλώνους υπερέκφρασης LSD-1 έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα της *ANGPTL-3* αυξάνονται, η LSD-1 δηλαδή επιβάλλει το καθεστώς των μειωμένων τριγλυκεριδίων στο εσωτερικό των ηπατικών κυττάρων, καταστέλλοντας τη δράση των ενζύμων *LPL* και *LIPG* μέσω της υπερέκφρασης της *ANGPTL-3*.

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση της υπερέκφρασης της LSD-1 στον αναδιπλασιασμό του ιού HCV. Ως μέθοδος διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροδιάτρηση και οι ηπατικές καλλιέργειες (*Huh7* και *Huh1B*) μολύνθηκαν με το ιικό γονιδίωμα *JCR2A*. Ο ρυθμός αναδιπλασιασμού του ιού μελετήθηκε για το χρονικό διάστημα των 6 ημερών. Στα κύτταρα μάρτυρα στα οποία η LSD-1 εκφράζεται μόνο ενδογενώς παρατηρούμε ότι ο ιός αναπαράγεται με αργό ρυθμό μέχρι τις 72 ώρες. Μετά τις 72 ώρες τα επίπεδα ιικού αναδιπλασιασμού αυξάνουν κατακόρυφα, στις 120 ώρες το ιικό φορτίο φτάνει στο μέγιστο και ακολουθεί καθοδική πορεία μέχρι τις 144 ώρες. Σε αντιδιαστολή με το παραπάνω μοτίβο ιικής αντιγραφής, ο ιός στον κλώνο *Huh1B* παρουσιάζει εμφανώς πολύ χαμηλότερα επίπεδα αναδιπλασιασμού. Επιτυγχάνει να αντιγραφεί στις πρώτες 24 ώρες και στη συνέχεια και μέχρι τις 120 ώρες πιθανόν δεν μπορεί να υπερκαλύψει το αρνητικό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της LSD-1, που έχει προκαλέσει ραγδαία μείωση των τριγλυκεριδίων. Απαιτούνται περαιτέρω μετρήσεις των τριγλυκεριδίων σε κυτταρικά εκχυλίσματα.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο χαμηλός έως μη ανιχνεύσιμος - σε κάποιες χρονικές στιγμές (*time points*) - ρυθμός αναδιπλασιασμού έχει προκληθεί ως συνέπεια της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LSD-1, προχωρήσαμε σε διαμόλυνση κυττάρων μάρτυρα *Huh7* και κλώνο υπερέκφρασης LSD-1 *Huh1B* με το ρεπλικόνιο *PFKWT*, το οποίο περιέχει μόνο τις μη δομικές πρωτεΐνες NS3 έως NS5B του ιού. Στα κύτταρα μάρτυρα το ρεπλικόνιο κάτω από τη δράση του ισχυρού υποκινητή CMV αναδιπλασιάζεται ταχύτατα από τις 24 ώρες, αποκτά μέγιστο στις 48 ώρες και στη συνέχεια εμφανίζει σταθεροποιητική τάση μείωσης μέχρι τις 144 ώρες. Ο κλώνος *Huh1B* παρουσιάζει μηδενικά επίπεδα αναδιπλασιασμού, γεγονός που επαληθεύει την υπόθεση ότι η υπερέκφραση της LSD-1 είναι η πρωταρχική αιτία και ότι αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τον αναδιπλασιασμό του HCV.

Αξίζει να επισημανθεί, ότι η διαμόλυνση με δυο τύπους ρεπλικονίων μας παρείχε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε και τη δυναμική της δράσης της ιικής πρωτεΐνης Core στον ιό *JCR2A*, όπου προσπαθεί να επάγει με μικρή αποτελεσματικότητα τη λιπογένεση και αυτό αποτυπώνεται στα χαμηλά επίπεδα αναδιπλασιασμού του ιού. Επιπλέον, από τη σύγκριση των *mRNA* επιπέδων έκφρασης της LSD-1 στον κλώνο *Huh1B* μετά από διαμόλυνση με τον *JCR2A* και με το *PFKWT*, προκύπτει ότι τα επίπεδα έκφρασης της LSD-1 παρουσία του *JCR2A* είναι ιδιαίτερα υψηλά στις πρώτες 24 ώρες σε σχέση με τα επίπεδα παρουσία του *PFKWT* και σταδιακά μειώνονται, ενδεικτικό της δράσης της πρωτεΐνης Core να εξισορροπήσει το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης. Η μείωση συνεχίζεται μέχρι τις 72 ώρες, οπότε και αρχίζουν τα επίπεδα της LSD-1 να αυξάνονται μέχρι τις 144 ώρες, γιατί η πρωτεΐνη Core αδυνατεί να αντιπαρέλθει το φαινόμενο της υπερέκφρασης της LSD-1.

Τέλος, συγκρίναμε τα *mRNA* επίπεδα έκφρασης της LSD-1 στον κλώνο *Huh1B* και στα κύτταρα μάρτυρα μετά τη διαμόλυνση με το ρεπλικόνιο *PFKWT*, για να διαπιστώσουμε το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της LSD-1 σε συνδυασμό με την απουσία της πρωτεΐνης Core. Στο κλώνο *Huh1B* τα *mRNA* επίπεδα έκφρασης της LSD-1 εμφανίζονται αυξημένα σε σχέση με το μάρτυρα όπως αναμενόταν, λόγω υπερέκφρασης του γονιδίου της. Η διαφορά αυτή παρουσιάζει μοτίβο αυξομείωσης μέχρι τις 144 ώρες, οπότε και η υπερέκφραση της LSD-1 στον κλώνο έχει εκτιναχτεί στο υψηλότερο επίπεδο.

Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου σε όλο τον κόσμο είναι ανησυχητική εξαιτίας δύο βασικών λόγων: πρώτον, το ΗΚΚ είναι μία από τις πιο θανατηφόρες μορφές κακοηθειών με ποσοστό επιβίωσης κάτω του 10% και δεύτερον, η έλλειψη αποτελεσματικών διαγνωστικών μεθόδων καθιστά σχεδόν αδύνατη την έγκαιρη του ανίχνευση. Η κακή πρόγνωση επιτείνει την ανάγκη ανάπτυξης νέων διαγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών προσεγγίσεων. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών του ΗΚΚ σε μοριακό επίπεδο, αυξάνοντας το δυναμικό της στοχευμένης μοριακής θεραπείας. Έχουν προσδιοριστεί ορισμένοι μοριακοί στόχοι που παρουσιάζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Γνωρίζοντας ότι μεγάλο ποσοστό των ασθενών με ΗΚΚ πάσχουν από ηπατίτιδα C, η καταπολέμηση της θα συμβάλλει ουσιαστικά στη μείωση των περιπτώσεων που τελικά αναπτύσσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Ο επιγενετικός παράγοντας LSD-1 ως ένα από τα ρυθμιστικά μόρια του κυτταρικού λιπιδικού μεταβολισμού, τον οποίο εκμεταλλεύεται ο ιός HCV για την αναπαραγωγή του, θα μπορούσε να κατέχει διττό ρόλο ως διαγνωστικός βιοδείκτης αλλά και ως στόχος για αντιϊκή και κα επέκταση αντικαρκινική θεραπεία.

### Δ.2.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έχουν περάσει σχεδόν δυο δεκαετίες από την ανακάλυψη του επιγενετικού παράγοντα LSD-1 και οι περισσότερες μελέτες αφορούν στη συμβολή του στην καρκινογένεση αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου. Καινούρια στοιχεία, ωστόσο, συνεχώς εμφανίζονται σε επιστημονικά άρθρα υπέρ της αντίληψης ότι η πρωτεΐνη LSD-1 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στις ικές διαδικασίες όπως η έκφραση ικών πρωτεϊνών και η εγκαθίδρυση ικών μολύνσεων.

Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι ένα κρίσιμο θέμα για την επιστημονική κοινότητα το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης καθώς συχνά δεν υπάρχουν επαρκείς επιλογές θεραπείας. Είναι ευρύτερα γνωστό ότι ένας ιός εκμεταλλεύεται το μεγαλύτερο μέρος του επιγενετικού μηχανισμού του ξενιστή για να εκκινήσει και να ελέγξει τον αναδιπλασιασμό του και ως εκ τούτου η ιδέα της αναχαίτισης της ικής αντιγραφής μέσω της χορήγησης μορίων ρύθμισης επιγενετικών παραγόντων, όπως οι αναστολείς LSD-1, μπορεί να είναι μια εφικτή θεραπευτική στρατηγική που απαιτεί βαθύτερη αξιολόγηση.

Τα πειράματα τα οποία περιλαμβάνονται στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο σχεδιασμό ώστε να ρίξουν φως σε πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους αλληλεπιδρούν ο ιός της ηπατίτιδας C και η πρωτεΐνη LSD-1. Γνωρίζοντας ότι ο ιός HCV χρησιμοποιεί τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό προς όφελος του αναδιπλασιασμού του και, ότι η πρωτεΐνη LSD-1, μεταξύ των πολλαπλών δράσεων που διαθέτει, είναι ένα από τα ρυθμιστικά μόρια της λιπογένεσης, μελετήσαμε αν αυτή η παράμετρος αποτελεί έναυσμα για την αλληλεπίδρασή τους.

Πράγματι, διαπιστώσαμε ότι κάτω από συνθήκες φυσιολογικής/ενδογενούς έκφρασης της LSD-1 ο ιός της ηπατίτιδας C έχει την ικανότητα να αυξήσει τα ποσοστά έκφρασής της τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης και να εξασφαλίσει την αναπαραγωγή του. Χρησιμοποιώντας σταθερές ηπατοκυτταρικές σειρές οι οποίες υπερεκφράζουν τις ικές πρωτεΐνες Core και NS5A, παρατηρήσαμε ότι σε συμφωνία με τη λειτουργική δράση καθεμίας από αυτές, η πρωτεΐνη Core φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της LSD-1 επάγοντας την αναγκαία για τον ιό λιπογένεση, ενώ η πρωτεΐνη NS5A να τα μειώνει. Η επιβεβαίωση αυτή προέκυψε μετά από μέτρηση επίπεδων mRNA της LSD-1 με *PCR* πραγματικού χρόνου και επίπεδων πρωτεΐνης μετά από ανάλυση κατά *Western*. Σε συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε σταθερή κυτταροσειρά υπερέκφρασης της LSD-1 προκειμένου να διαπιστώσουμε την επίδραση που έχει στη ρύθμιση της λιπογένεσης αλλά και στην ική αναπαραγωγή. Με χρώση λιπιδικών σταγονιδίων με *Oil Red O* και *Bodipy* σε ηπατικά κύτταρα που υπερεκφράζουν την LSD-1 και σε κύτταρα μάρτυρα παρατηρήσαμε μια δραματική μείωση των επιπέδων τους. Το αποτέλεσμα

αυτό συμφωνεί με επιστημονικά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι σε συνθήκη υπερέκφρασης η LSD-1 ρυθμίζει αρνητικά το σχηματισμό των λιπιδίων. Τέλος, μέσω της διαμόλυνσης κλώνου υπερέκφρασης της LSD-1 με πλήρως λειτουργικό ιικό γονιδίωμα (*JCR2A*) παρατηρήσαμε ότι ο ιός δεν έχει την ικανότητα να αντirroπήσει τις συνέπειες της υπερέκφρασης της LSD-1 στη λιπογένεση.

Σε γενικές γραμμές, η παρούσα εργασία έχει ανοίξει νέους δρόμους οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν στην καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ιού με το κύτταρο ξενιστή. Επομένως θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η επίδραση αναστολέων της LSD-1 σε σχέση πάντα με τον ιικό πολλαπλασιασμό τόσο στα επίπεδα του ιικού φορτίου όσο και στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να αποτελέσει στο μέλλον πολύτιμο εργαλείο για μια καλύτερη αντιϊκή θεραπεία για την αντιμετώπιση της ηπατίτιδας C και του ΗΚΚ.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Haraksingh, Rajini R., and Michael P. Snyder. "Impacts of variation in the human genome on gene regulation." *Journal of molecular biology* 425.21 (2013): 3970-3977.
2. Waddington, Conrad H. "The epigenotype." *International journal of epidemiology* 41.1 (2011): 10-13.
3. Felsenfeld, Gary. "A brief history of epigenetics." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.1 (2014): a018200.
4. Kornberg, Roger D. "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* 184.4139 (1974): 868-871.
5. Kornberg, Roger D. "Structure of chromatin." *Annual review of biochemistry* 46.1 (1977): 931-954.
6. Luger, Karolin, et al. "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389.6648 (1997): 251.
7. Razin, Aharon, and Arthur D. Riggs. "DNA methylation and gene function." *Science* 210.4470 (1980): 604-610.
8. Li, En, and Yi Zhang. "DNA methylation in mammals." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6.5 (2014): a019133.
9. Pinney, Sara. "Mammalian non-CpG methylation: stem cells and beyond." *Biology* 3.4 (2014): 739-751.
10. Bird, Adrian P., and Alan P. Wolffe. "Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin." *Cell* 99.5 (1999): 451-454.
11. Suetake, Isao, et al. "DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction." *Journal of Biological Chemistry* 279.26 (2004): 27816-27823.
12. Okano, Masaki, Shaoping Xie, and En Li. "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." *Nature genetics* 19.3 (1998): 219.
13. Labra, Massimo, et al. "Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L." *Chemosphere* 54.8 (2004): 1049-1058.
14. Janssen, Harry LA, et al. "Treatment of HCV infection by targeting microRNA." *New England Journal of Medicine* 368.18 (2013): 1685-1694.
15. Ling, Hui, Muller Fabbri, and George A. Calin. "MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development." *Nature reviews Drug discovery* 12.11 (2013): 847.
16. Gerhard, Glenn S., and Johanna K. DiStefano. "Micro RNAs in the development of non-alcoholic fatty liver disease." *World journal of hepatology* 7.2 (2015): 226.
17. Cech, Thomas R., and Joan A. Steitz. "The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones." *Cell* 157.1 (2014): 77-94.
18. Skene, Peter J., and Steven Henikoff. "Histone variants in pluripotency and disease." *Development* 140.12 (2013): 2513-2524.
19. Marmorstein R, Zhou MM. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(7): a018762.
20. Rossetto D, Avvakumov N, Cote J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 2012;7(10):1098–108.

21. Cheng X. *Structural and functional coordination of DNA and histone methylation.* *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(8): a018747.
22. Wang S, Wang Y. *Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis.* *Biochim Biophys Acta* 2013;1829(10):1126–35.
23. Cuthbert, Graeme L., et al. "Histone deimination antagonizes arginine methylation." *Cell* 118.5 (2004): 545-553.
24. Ramadoss, Sivakumar, Gao Guo, and Cun-Yu Wang. "Lysine demethylase KDM3A regulates breast cancer cell invasion and apoptosis by targeting histone and the non-histone protein p53." *Oncogene* 36.1 (2017): 47.
25. Margueron, Raphael, Patrick Trojer, and Danny Reinberg. "The key to development: interpreting the histone code?" *Current opinion in genetics & development* 15.2 (2005): 163-176.
26. Shi, Yujiang Geno, and Yu-ichi Tsukada. "The discovery of histone demethylases." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.9 (2013): a017947.
27. Hosseini, Amir, and Saverio Minucci. "A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer." *Epigenomics* 9.8 (2017): 1123-1142.
28. Forneris, Federico, et al. "Histone demethylation catalyzed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process." *FEBS letters* 579.10 (2005): 2203-2207.
29. Maiques-Diaz, Alba, and Tim CP Somerville. "LSD1: biologic roles and therapeutic targeting." *Epigenomics* 8.8 (2016): 1103-1116.
30. Fattovich, G. I. O. V. A. N. N. A., et al. "Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients." *Gastroenterology* 112.2 (1997): 463-472
31. Περουκίδης, Σταύρος. Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού ILK/p-Akt στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα του ανθρώπου: συσχέτιση με την έκφραση παραγόντων που εμπλέκονται στην απόπτωση και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. *Diss.* 2009.
32. Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "Hallmarks of cancer: the next generation." *cell* 144.5 (2011): 646-674.
33. Aravalli, Rajagopal N., Clifford J. Steer, and Erik NK Cressman. "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 48.6 (2008): 2047-2063.
34. Caldwell, Stephen, and Sang H. Park. "The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology." *Journal of gastroenterology* 44.19 (2009): 96-101.
35. Dourakis, Spyros P. "New developments in systemic therapy for hepatocellular carcinoma." *Current Cancer Therapy Reviews* 4.3 (2008): 219-226.
36. Fattovich, Giovanna. "Natural history and prognosis of hepatitis B." *Seminars in liver disease.* Vol. 23. No. 01. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: + 1 (212) 584-4662, 2003.
37. Parsons, Christopher J., Motoki Takashima, and Richard A. Rippe. "Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis." *Journal of gastroenterology and hepatology* 22 (2007): S79-S84.
38. Satyanarayana, Ande, Michael P. Manns, and K. Lenhard Rudolph. "Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis." *Hepatology* 40.2 (2004): 276-283.
39. Friedman, Scott L. "Mechanisms of hepatic fibrogenesis." *Gastroenterology* 134.6 (2008): 1655-1669.

40. Kordes, Claus, et al. "CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells." *Biochemical and biophysical research communications* 352.2 (2007): 410-417.
41. Glaser, Shannon S., et al. "Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis." *Expert reviews in molecular medicine* 11 (2009).
42. Yang, Jing, and Robert A. Weinberg. "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." *Developmental cell* 14.6 (2008): 818-829.
43. Yoshikawa, Hirohide, et al. "SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity." *Nature genetics* 28.1 (2001): 29.
44. Liao, Yi-Chun, and Su Hao Lo. "Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40.5 (2008): 843-847.
45. Calvisi, Diego F., et al. "Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." *The Journal of clinical investigation* 117.9 (2007): 2713-2722.
46. Mizuno, Shin-ichi, et al. "Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia." *Blood* 97.5 (2001): 1172-1179.
47. Sudo, T., et al. "Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma." *British journal of cancer* 92.9 (2005): 1754.
48. Pathil, Anita, et al. "HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL." *Hepatology* 43.3 (2006): 425-434.
49. Guichard, Cécile, et al. "Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma." *Nature genetics* 44.6 (2012): 694.
50. Cuenda, Ana, and Simon Rousseau. "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1773.8 (2007): 1358-1375.
51. Mercer, Tim R., Marcel E. Dinger, and John S. Mattick. "Long non-coding RNAs: insights into functions." *Nature reviews genetics* 10.3 (2009): 155.
52. Lai, Ming-chun, et al. "Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation." *Medical oncology* 29.3 (2012): 1810-1816.
53. Axley, Page, et al. "Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: a narrative review." *Journal of clinical and translational hepatology* 6.1 (2018): 79.
54. Bukh, Jens. "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* 65.1 (2016): S2-S21.
55. Drummer, Heidi E., Anne Maerz, and Pantelis Poubourios. "Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins." *FEBS letters* 546.2-3 (2003): 385-390.
56. Bukh, Jens, Robert H. Purcell, and Roger H. Miller. "Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.17 (1994): 8239-8243.
57. Santolini, Elisa, Giovanni Migliaccio, and Nicola La Monica. "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein." *Journal of virology* 68.6 (1994): 3631-3641.

58. Hope, R. Graham, Denis J. Murphy, and John McLauchlan. "The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins." *Journal of Biological Chemistry* 277.6 (2002): 4261-4270.
59. Tellinghuisen, Timothy L., and Charles M. Rice. "Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors." *Current opinion in microbiology* 5.4 (2002): 419-427.
60. Steinmann, Eike, and Thomas Pietschmann. "Hepatitis C virus p7—a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy." *Viruses* 2.9 (2010): 2078-2095.
61. Griffin, Stephen DC, et al. "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS letters* 535.1-3 (2003): 34-38.
62. Steinmann, Eike, et al. "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." *PLoS pathogens* 3.7 (2007): e103.
63. Grakoui, Arash, et al. "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90.22 (1993): 10583-10587.
64. Reed, Karen E., Arash Grakoui, and Charles M. Rice. "Hepatitis C virus-encoded NS2-3 protease: cleavage-site mutagenesis and requirements for bimolecular cleavage." *Journal of virology* 69.7 (1995): 4127-4136.
65. Lorenz IC, Marcotrigiano J, Dentzer TG, Rice CM: Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* 2006, 442:831-835.
66. Bartenschlager, Ralf, et al. "Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions." *Journal of virology* 67.7 (1993): 3835-3844.
67. Wölk, Benno, 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* 74.5 (2000): 2293-2304.
68. Tang, Hengli, and Henry Grisé. "Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis." *Clinical Science* 117.2 (2009): 49-65.
69. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13,17:2406-241
70. Huang, Ying, et al. "Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A nonstructural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral RNA replication?" *Virology* 364.1 (2007): 1-9.
71. Penin, François, et al. "Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *Journal of Biological Chemistry* 279.39 (2004): 40835-40843.
72. Tellinghuisen, Timothy L., et al. "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." *Journal of Biological Chemistry* 279.47 (2004): 48576-48587.
73. Macdonald, Andrew, and Mark Harris. "Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein." *Journal of General Virology* 85.9 (2004): 2485-2502.
74. Behrens, Sven-Erik, L. Tomei, and R. De Francesco. "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *The EMBO journal* 15.1 (1996): 12-22.
75. Yamashita, Tatsuya, et al. "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." *Journal of Biological Chemistry* 273.25 (1998): 15479-15486.
76. Lesburg, Charles A., et al. "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." *Nature Structural & Molecular Biology* 6.10 (1999): 937.



77. Jopling, Catherine L., et al. "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." *science*309.5740 (2005): 1577-1581.
78. Spångberg, Karin, Lisa Wiklund, and Stefan Schwartz. "Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro." *Journal of General Virology* 82.1 (2001): 113-120.
79. Scarselli, Elisa, et al. "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *The EMBO journal* 21.19 (2002): 5017-5025.
80. Pileri, Piero, et al. "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* 282.5390 (1998): 938-941.
81. Evans, Matthew J., et al. "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* 446.7137 (2007): 801.
82. Ploss, Alexander, et al. "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." *Nature*457.7231 (2009): 882.
83. Liu, Shufeng, et al. "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." *Journal of virology*83.4 (2009): 2011-2014.
84. Zeisel, Mirjam B., et al. "Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81." *Hepatology* 46.6 (2007): 1722-1731.
85. Koutsoudakis, George, et al. "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *Journal of virology* 80.11 (2006): 5308-5320.
86. Sourisseau, Marion, et al. "Temporal analysis of hepatitis C virus cell entry with occludin directed blocking antibodies." *PLoS pathogens* 9.3 (2013): e1003244.
87. Barth, Heidi, et al. "Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction." *Journal of virology* 80.21 (2006): 10579-10590.
88. Agnello, Vincent, et al. "Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96.22 (1999): 12766-12771.
89. Owen, David M., et al. "Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor." *Virology* 394.1 (2009): 99-108.
90. Martin, Danyelle N., and Susan L. Uprichard. "Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.26 (2013): 10777-10782.
91. Gosert, Rainer, et al. "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *Journal of virology* 77.9 (2003): 5487-5492.
92. Egger, Denise, et al. "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *Journal of virology* 76.12 (2002): 5974-5984.
93. Messina, Jane P., et al. "Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* 61.1 (2015): 77-87.
94. Άγγελος Χατζάκης και Μαρία Καντζανού, *Επιδημιολογία ηπατίτιδων Β και C στην Ελλάδα*© *hygeia.gr*

95. Alter, Miriam J., et al. "The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States." *New England journal of medicine* 327.27 (1992): 1899-1905.
96. Smith, Bryce D., et al. "Recommendations for the identification of chronic hepatitis C virus infection among persons born during 1945–1965." *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports* 61.4 (2012): 1-32.
97. Getchell, Jane P., et al. "Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians." *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 62.18 (2013): 362.
98. Mohd Hanafiah, Khayriyyah, et al. "Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence." *Hepatology* 57.4 (2013): 1333-1342.
99. Liang, T. Jake, and Marc G. Ghany. "Current and future therapies for hepatitis C virus infection." *New England Journal of Medicine* 368.20 (2013): 1907-1917.
100. Παπαθεοδωρίδης Γ, Γερμανίδης Γ, Νταλέκος Γ. Κατευθυντήριες οδηγίες θεραπευτικής παρέμβασης σε ασθενείς με λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C. Επιτροπή Ιογενούς Ηπατίτιδας ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. 2014.
101. Vespasiani-Gentilucci, Umberto, et al. "Hepatitis C virus and metabolic disorder interactions towards liver damage and atherosclerosis." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20.11 (2014): 2825.
102. Gibco™ DMEM, high glucose/low glucose, Thermofisher Scientific
103. HuH-7 Cell Line hepatocellular carcinoma cells, General Information (<https://huh7.com/>)
104. Γεωργία Παπαδοπούλου, Μελέτη του ρόλου του επιγενετικού παράγοντα LSD-1 κατά τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C- Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, 2018
105. Katsarou, Konstantina, Panagiota Tsitoura, and Urania Georgopoulou. "MEK5/ERK5/mef2: a novel signaling pathway affected by hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1813.10 (2011): 1854-1862.
106. Georgopoulou, Urania, et al. "The protein phosphatase 2A represents a novel cellular target for hepatitis C virus NS5A protein." *Biochimie* 88.6 (2006): 651-662.
107. Gossen, Manfred, and Hermann Bujard. "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.12 (1992): 5547-5551.
108. Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual- Clontech
109. Καραμιχάλη, Ειρήνη. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της μη δομικής πρωτεΐνης NS5A του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Diss. 2009.
110. Transformation, application overview, New England Biolabs.
111. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook
112. MluI Restriction Enzyme, Promega Laboratories
113. Kryndushkin, Dmitry S., et al. "Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104." *Journal of Biological Chemistry* 278.49 (2003): 49636-49643.
114. Sambrook, J., and D. W. Russell. "Molecular cloning: a laboratory manual., 3rd Edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York)." (2001).

115. Sharp, Phillip A., Bill Sugden, and Joe Sambrook. "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis." *Biochemistry* 12.16 (1973): 3055-3063.
116. Boffey, S. A. "Isolation of high molecular weight DNA." *Methods in Molecular Biology* 2 (1984): 333-341.
117. Lodge, Julia, Peter Lund, and Steve Minchin. *Gene cloning*. Taylor & Francis, 2006.
118. Goldman, G. H., M. Van Montagu, and A. Herrera-Estrella. "Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse." *Current genetics* 17.2 (1990): 169-174.
119. Gianuca Farusis et al., 2017 - Φως εν Ζωή: η χημεία του βιοφωτισμού
120. **Biorad Bradford assay, Copyright © 2019 Bio-Rad Laboratories, Inc.**
121. Ali, 2019, *The principle and Procedure of Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*, Howbiotech.com
122. Bustin S. (ed) (2004) *A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California.*
123. *A Technical Guide to PCR Technologies*, © 2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates.
124. Mackay, Ian M., Katherine E. Arden, and Andreas Nitsche. "Real-time PCR in virology." *Nucleic acids research* 30.6 (2002): 1292-1305.
125. Fabricio da Mota Ramalho Costa et al., 2018, *Procedures for the staining of lipid droplets with Oil Red O V.1*
126. Qiu, Bo, and M. Celeste Simon. "BODIPY 493/503 staining of neutral lipid droplets for microscopy and quantification by flow cytometry." *Bio Protoc* 6 (2016): e1912.
127. Farinati, F., et al. "Hepatitis C virus: from oxygen free radicals to hepatocellular carcinoma." *Journal of viral hepatitis* 14.12 (2007): 821-829.
128. El-Serag, Hashem B. "Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States." *Hepatology* 36.S1 (2002): S74-S83.
129. Kgatle, Mankgopo M., Mashiko Setshedi, and Henry N. Hairwadzi. "Hepatoepigenetic alterations in viral and non-viral-induced hepatocellular carcinoma." *BioMed research international* 2016 (2016).
130. Quan, H., et al. "Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial–mesenchymal transition." *Oncogene* 33.22 (2014): 2826.
131. Cai, Mu-Yan, et al. "EZH2 protein: a promising immunomarker for the detection of hepatocellular carcinomas in liver needle biopsies." *Gut* 60.7 (2011): 967-976.
133. Piperi, Christina, et al. "Epigenetic effects of lung cancer predisposing factors impact on clinical diagnosis and prognosis." *Journal of cellular and molecular medicine* 12.5a (2008): 1495-1501.
134. Seligson, David B., et al. "Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers." *The American journal of pathology* 174.5 (2009): 1619-1628.
135. Shi, Yang. "Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease." *Nature reviews genetics* 8.11 (2007): 829.

136. Ueda, Rie, et al. "Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors." *Journal of the American Chemical Society* 131.48 (2009): 17536-17537.
137. Lim, Soyoun, et al. "Epigenetic regulation of cancer growth by histone demethylases." *International journal of cancer* 127.9 (2010): 1991-1998.
138. Scoumanne, Ariane, and Xinbin Chen. "The lysine-specific demethylase 1 is required for cell proliferation in both p53-dependent and-independent manners." *Journal of Biological Chemistry* 282.21 (2007): 15471-15475.
139. Liu, Chungang, et al. "LSD1 Stimulates Cancer-Associated Fibroblasts to Drive Notch3-Dependent Self-Renewal of Liver Cancer Stem-like Cells." *Cancer research* 78.4 (2018): 938-949.
140. Sakamoto, Akihisa, et al. "Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells." *Cancer research* 75.7 (2015): 1445-1456.
141. Horton, J. D., J. L. Goldstein, and M. S. Brown. "SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Vol. 67. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
142. Yang W, et al. Fatty acid synthase is upregulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 2008; 48:1396–1403.
143. Harding, Heather P., et al. "Bioactive small molecules reveal antagonism between the integrated stress response and sterol-regulated gene expression." *Cell metabolism* 2.6 (2005): 361-371.
144. Kaplowitz, Neil, and Cheng Ji. "Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum." *Journal of gastroenterology and hepatology* 21 (2006): S7-S9.
145. Egger, Denise, et al. "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *Journal of virology* 76.12 (2002): 5974-5984.
146. Zheng, Yi, et al. "Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response." *The Journal of Microbiology* 43.6 (2005): 529-536.
147. Waris, Gulam, et al. "Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress." *Journal of virology* 81.15 (2007): 8122-8130.
148. Abid, Karim, et al. "An in vitro model of hepatitis C virus genotype 3a-associated triglycerides accumulation." *Journal of hepatology* 42.5 (2005): 744-751.
149. Jackel-Cram, Candice, Lorne A. Babak, and Qiang Liu. "Up-regulation of fatty acid synthase promoter by hepatitis C virus core protein: genotype-3a core has a stronger effect than genotype-1b core." *Journal of hepatology* 46.6 (2007): 999-1008.
150. Waris, Gulam, and Aleem Siddiqui. "Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication." *Journal of virology* 79.15 (2005): 9725-9734.
151. Waris, Gulam, et al. "Hepatitis C virus (HCV) constitutively activates STAT-3 via oxidative stress: role of STAT-3 in HCV replication." *Journal of virology* 79.3 (2005): 1569-1580.
152. Kotzka, Jörg, et al. "Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade." *Journal of lipid research* 41.1 (2000): 99-108.
153. Postman, Thomas, et al. "PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP." *Oncogene* 24.43 (2005): 6465.

154. Gericke, Arne, Mary Munson, and Alonzo H. Ross. "Regulation of the PTEN phosphatase." *Gene* 374 (2006): 1-9.
155. Jackel-Cram, Candice, et al. "Hepatitis C virus genotype-3a core protein enhances sterol regulatory element-binding protein-1 activity through the phosphoinositide 3-kinase–Akt-2 pathway." *Journal of General Virology* 91.6 (2010): 1388-1395.
156. Ahn, Ji-Won, et al. "Systematic identification of hepatocellular proteins interacting with NS5A of the hepatitis C virus." *BMB Reports* 37.6 (2004): 741-748.
157. Berger, Kristi L., et al. "Hepatitis C virus stimulates the phosphatidylinositol 4-kinase III alpha-dependent phosphatidylinositol 4-phosphate production that is essential for its replication." *Journal of virology* 85.17 (2011): 8870-8883.
158. Reiss, Simon, et al. "Recruitment and activation of a lipid kinase by hepatitis C virus NS5A is essential for integrity of the membranous replication compartment." *Cell host & microbe* 9.1 (2011): 32-45.
159. Shimomura, Ichihiro, et al. "Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells." *The Journal of clinical investigation* 99.5 (1997): 838-845.
160. Hegarty, Bronwyn D., et al. "Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element binding protein-1c." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.3 (2005): 791-796.
161. Ma, Zhiqiang, et al. "Liver X receptors and their agonists: targeting for cholesterol homeostasis and cardiovascular diseases." *Curr Issues Mol Biol* 22 (2017): 41-64.
162. Chu, Kiki, et al. "Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation." *Molecular and cellular biology* 26.18 (2006): 6786-6798.
163. Xiang, Zhonghua, et al. "Hepatitis C virus nonstructural protein-5A activates sterol regulatory element-binding protein-1c through transcription factor Sp1." *Biochemical and biophysical research communications* 402.3 (2010): 549-553.
164. Barriocanal, Marina, and Puri Fortes. "Long non-coding RNAs in hepatitis C virus-infected cells." *Frontiers in microbiology* 8 (2017): 1833.
165. Li, Duan, et al. "Long non-coding RNA HR1 participates in the expression of SREBP-1c through phosphorylation of the PDK1/AKT/FoxO1 pathway." *Molecular medicine reports* 18.3 (2018): 2850-2856.
166. Zwergel, Clemens, et al. "Trends of LSD1 inhibitors in viral infections." (2018): 1133-1136.

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.»

A handwritten signature in black ink, appearing to be the name 'Η. Φουλάκ'.

Υπογραφή

Αθήνα, 2019