



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΨΙΚΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.**

ΧΑΛΑΡΗ ANNA

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΨΚΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.**

ΧΑΛΑΡΗ ANNA

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ IV

ΚΑΙ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΤΜΗΜΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ L-DOPA ΑΠΟΚΑΡΒΟΞΥΛΑΣΗΣ ΩΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΙΙΚΗ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.**

ΧΑΛΑΡΗ ANNA

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ: Νίκη Βασιλάκη, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Νίκη Βασιλάκη, Εντεταλμένη ερευνήτρια, Τομέας Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΑΘΗΝΑ 2020

Περίληψη

Η μόλυνση με τον ιό του Δάγγειου πυρετού είναι μία άκρως απειλητική για τη ζωή λοίμωξη στις τροπικές χώρες. Η έρευνα για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου που θα προστατεύει ικανοποιητικά και από τους 4 ορότυπους με ελάχιστες παρενέργειες στον άνθρωπο, συνεχίζεται. Είναι γνωστό ότι μόλυνση με DENV μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων εκ των οποίων ολόένα και μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στις, μέχρι πρότινος, μη συνηθισμένες νευρολογικές επιπλοκές με την αιτιολογία του φαινομένου αυτού να παραμένει, ωστόσο, άγνωστη. Πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ ανέδειξαν την αλληλεπίδραση μεταξύ της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης (DDC) και της ιϊκής μόλυνσης με τους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae*. Η DDC αποτελεί κύριο ρυθμιστή της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας όντας το υπεύθυνο ένζυμο για την σύνθεση των βιογενών αμινών, των κατεξοχήν απαραίτητων μορίων για την νευροδιαβιβαστική λειτουργία του ΚΝΣ με εξίσου σημαντικό ρόλο, όμως, στην σηματοδότηση που λαμβάνει χώρα στους περιφερικούς ιστούς. Επιπλέον, η DDC κατέχει καθοριστικό ρόλο σε κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη κυτταρική βιωσιμότητα και απόπτωση, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται από την ιϊκή μόλυνση. Ταυτόχρονα, τα προϊόντα της (ισταμίνη) ή υποδοχείς τους (υποδοχείς ντοπαμίνης D2 και D4) παίζουν ρόλο στην είσοδο του DENV.

Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα του εργαστηρίου, στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε εκτενέστερη μελέτη της αμφίροπης αρνητικής σχέσης που φαίνεται να επικρατεί μεταξύ της DDC και της μόλυνσης με DENV. Η επαγωγή καθώς και η καταστολή της έκφρασης αλλά και της ενζυμικής ενεργότητας μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους στον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Σε δεύτερο χρόνο, η μελέτη επεκτάθηκε στο μεταβολικό μονοπάτι εκατέρωθεν της βιοσύνθεσης των προϊόντων της DDC. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις οξειδάσες των μονοαμινών (MAO), ένζυμα υπεύθυνα για την αποικοδόμηση των ελεύθερων στο κυτταρόπλασμα αμινών, καθώς και στους κυστιδιακούς μεταφορείς μονοαμινών (VMATs) που είναι υπεύθυνοι για την αποθήκευση τους στα εκκριτικά

κυστίδια. Ακολούθως, για την κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών, μελετήθηκε η ενδεχόμενη συσχέτιση του οξειδωτικού στρες, απόρροια της δυσλειτουργίας του μεταβολικού μονοπατιού των μονοαμινών, με τον ιϊκό πολλαπλασιασμό, εστιάζοντας στην σημασία της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στην έκβαση της μόλυνσης με DENV.

Επιπλέον, μελετήθηκε μία σειρά καινοτόμων αντιϊκών ουσιών ως προς τη δράση τους έναντι του ιού της Ηπατίτιδας Β (HBV). Ο HBV είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου, παρόλο που υπάρχουν εγκεκριμένα εμβόλια. Αναλυτικότερα, σχεδιάστηκε και συντέθηκε μία σειρά καινοτόμων ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δράση τους ως πιθανοί αναστολείς του HBV. Η αντί-HBV δραστηριότητα τους εκτιμήθηκε σε *in vitro* σύστημα μόλυνσης. Από το σύνολο των αναστολέων που ελέγχθηκαν, μελετήθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης επιλεγμένων ομάδων ενώσεων, εστιάζοντας στην εξακρίβωση του σταδίου που στοχεύουν στον ιϊκό κύκλο ζωής.

Abstract

DENV infection poses a life-threatening burden in tropical countries. Unfortunately, an effective vaccine or therapeutic agent for treating DENV infection with limited side effects on patients is unavailable to date. Infection with any of the DENV serotypes may be asymptomatic in the majority of cases or may result in a wide spectrum of clinical symptoms. However, an increasing number of dengue cases present neurological manifestations that may affect both the central and peripheral nervous systems. Interestingly, based on our previous report, we revealed an emerging bidirectional inverse relationship between DENV replication and L-Dopa decarboxylase (DDC), a PLP-dependent enzyme that catalyzes the biosynthesis of bioactive amines. DDC has a well-established role in neurotransmission and the enzyme has been purified from a variety of peripheral organs, including the liver, where its physiological significance is not yet fully understood. Recently we demonstrated the interaction between DDC and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which indicates the role of L-Dopa decarboxylase as a major participant in signal transduction regulation, governing cell proliferation and apoptosis processes.

As a confirmation of the bidirectional negative relationship between DDC and DENV infection, silencing and overexpression of DDC were studied for their putative effect on viral replication. Next, we sought to investigate a possible association between DENV propagation and the intracellular downstream metabolic pathway of dopamine and serotonin, that is their enzymatically induced oxidation by monoamine oxidases A and B (MAO A and B), which occurs concomitantly with the inevitable release of oxidized products. In addition, emphasis was given to vesicular monoamine transporters (VMATs) that protect biogenic amines from oxidation, through their storage in secretory vesicles and the putative role of oxidative stress on this intricate pathway.

Furthermore, a series of new 2-aminoalkylsubstituted 6-chloro- or 5,6-dichloro-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridines were synthesized, and evaluated as for their anti-HBV activity in an efficient infectious system. Hepatitis B virus (HBV) is the major causative factor of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), despite an efficient

prophylactic vaccine. The most promising compounds underwent an in-depth study for defining the specific step of the viral life cycle targeted by the novel compounds.

Η παρούσα ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος 'Κλινική βιοχημεία-Μοριακή διαγνωστική' του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Διδώ Βασιλακοπούλου, μέλος ΔΕΠ του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, που με επέλεξε και με εμπιστεύθηκε να αναλάβω ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό θέμα καθώς και για το αμείωτο ενδιαφέρον της στην ανάπτυξη των ερευνητικών δεξιοτήτων μου.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιστημονική μου υπεύθυνη και εντεταλμένη ερευνήτρια του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Δρ. κ. Νίκη Βασιλάκη, για την ξεχωριστή ευκαιρία που μου έδωσε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ την Δρ. κ. Ευσεβεία Φρακολάκη αλλά και την Δρ. κ. Κατερίνα Καλλιαμπάκου, τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες του εργαστηρίου, οι οποίες κατά την διάρκεια της εκπαίδευσής μου παρείχαν πολύτιμες συμβουλές και συνέβαλαν στην εξέλιξη των ικανοτήτων μου τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε γνωστικό επίπεδο.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον προπτυχιακό φοιτητή Βασίλειο Σιώζο, με τον οποίο είχαμε άψογη και εποικοδομητική συνεργασία κατά την διάρκεια της εκπόνησης των διπλωματικών εργασιών μας καθώς επίσης και τα νέα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου, Βασιλίνα Τσόπελα, Κωνσταντίνο Σίδηρη και Γιώργο Πάνο, στα οποία εύχομαι τα καλύτερα.

Αθήνα

2020

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΑΓΓΕΙΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ	2
1.1.1. Γενικά στοιχεία	3
1.1.2. Δομή και κύκλος ζωής του ιού DENV	8
1.1.3. Μοριακές τεχνολογίες μελέτης του ιού DENV	18
1.1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της λοίμωξης από τον ιό DENV	19
1.2. ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ DDC (L-DOPA DECARBOXYLASE)	20
1.2.1. Γενικά στοιχεία για την L-Dopa αποκαρβοξυλάση	20
1.2.2. Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά	24
1.2.3. Χαρακτηριστικά του ενζύμου.....	25
1.2.4. Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης	30
1.2.5. Ο ρόλος της DDC στις ιογενείς λοιμώξεις.....	34
1.3. ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ ΕΚΑΤΕΡΩΘΕΝ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥΣ 38	
1.3.1. Οι οξειδάσες των μονοαμινών (MAO A και B)	38
1.3.2. Οι κυστιδιακοί μεταφορείς μονοαμινών (VMATs)	44
1.4. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ DENV ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NRF2 52	
1.5. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β (HBV)	56
1.5.1. Γενικά στοιχεία.....	56
1.5.2. Δομή και κύκλος ζωής του HBV.....	59
1.5.3. Μοριακές τεχνολογίες μελέτης του ιού HBV	66
1.5.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της λοίμωξης από τον ιό HBV	67

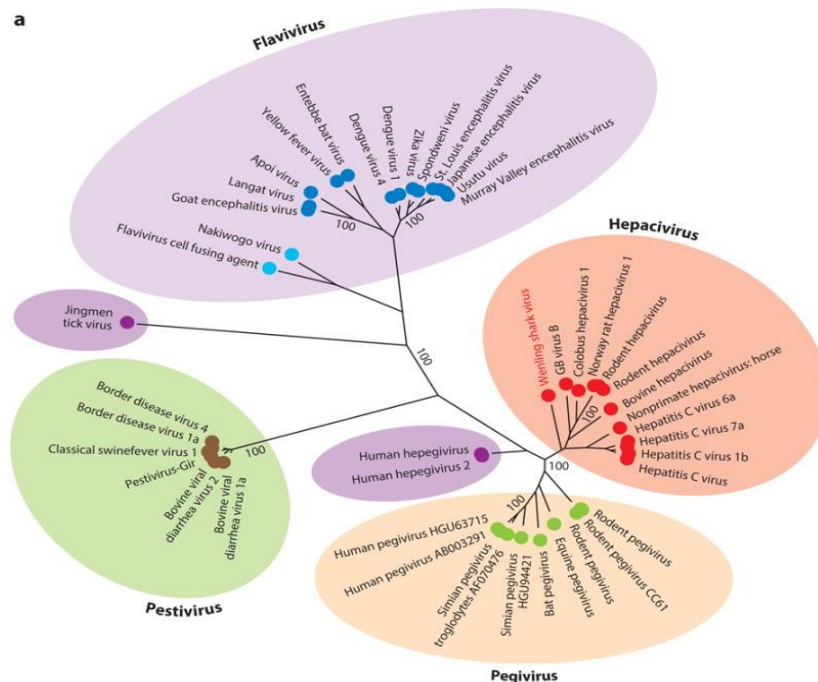
1.6.	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	71
2.	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	73
2.1.	ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	73
2.2.	ΠΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ.....	73
2.3.	ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ	75
2.3.1.	Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης της DDC	75
2.3.2.	Λεντοϊκός φορέας shRNAi της DDC.....	75
2.4.	ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	76
2.5.	ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	76
2.6.	ΧΗΜΙΚΑ.....	77
2.7.	ΜΕΘΟΔΟΙ	78
2.7.1.	Χημική μέθοδος προετοιμασίας δεκτικών βακτηρίων	78
2.7.2.	Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη βοήθεια θερμικού σοκ.....	79
2.7.3.	Δημιουργία καλλιέργειας βακτηρίων – βακτηριακό ίζημα.....	80
2.7.4.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midiprep) με χρήση στηλών που βασίζονται σε ιοντοανταλλακτική μέθοδο.....	80
2.7.5.	Πέψη με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών	82
2.7.6.	Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	83
2.7.7.	Καθαρισμός DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο	84
2.7.8.	In vitro μεταγραφή.....	85
2.7.9.	Καθαρισμός <i>in vitro</i> παραγμένου RNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο.....	86
2.7.10.	Διαίρεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)	87
2.7.11.	Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων	89

2.7.12. Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων.....	89
2.7.13. Εισαγωγή DNA/RNA σε κύτταρα θηλαστικών με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation).....	89
2.7.14. Παραγωγή και τιτλοποίηση ιϊκών στοκ	90
2.7.15. Μόλυνση κυττάρων με πλήρεις ιούς	93
2.7.16. Έλεγχος αντι-ϊικής δράσης και κυτταροτοξικότητας	95
2.7.17. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	96
2.7.18. Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC).....	96
2.7.19. Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP	97
2.7.20. Υπολογισμός μέσης δραστηκής (EC ₅₀) και μέσης κυτταροτοξικής (CC ₅₀) συγκέντρωσης αναστολέων	98
2.7.21. Απομόνωση ολικού RNA με χρήση διαλύματος NucleoZol.....	98
2.7.22. Απομόνωση HBV DNA	99
2.7.23. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)	101
2.7.24. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)	102
2.7.25. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page.....	106
2.7.26. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	107
2.7.27. Ανοσοστύπωση τύπου Western	108
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
3.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ DENV ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ	109
3.1.1. Η επίδραση της υπερέκφρασης της DDC στην ιϊκή αντιγραφή	109
3.1.2. Σίγηση της έκφρασης της DDC με shRNAi	111

3.1.3. Επίδραση της υπερέκφρασης και της σίγησης της DDC στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP	113
3.1.4. Επίδραση των υποστρωμάτων της DDC στον ιικό πολλαπλασιασμό	114
3.1.5. Οι οξειδάσες μονοαμινών A και B (MAO A και B) και η επίδραση των αναστολέων τους.....	118
3.1.6. Κυστιδιακοί μεταφορείς μονοαμινών (VMATs) και η επίδραση του αναστολέα τους.....	121
3.1.7. Το οξειδωτικό στρες στην μόλυνση με DENV	127
3.1.8. Επαγωγείς του μονοπατιού βιοσύνθεσης των βιογενών αμινών	131
3.1.9. Επίδραση των αναστολέων στην έκφραση της DDC.....	133
3.1.10. Επίδραση των δισιστρονικών ρεπλικονίων του DENV στη έκφραση της DDC	135
3.1.11. Επίδραση του DENV στο μεταβολικό μονοπάτι των μονοαμινών	136
3.2. Έλεγχος της δράσης νέων φαρμακευτικών αναλόγων έναντι του HBV	137
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	144
4.1. Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΟΥ DENV	144
4.1.1. Επίδραση του μονοπατιού βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των βιογενών αμινών στην αντιγραφή του ιού DENV	144
4.1.2. Επαγωγείς του μονοπατιού βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των βιογενών αμινών	153
4.1.3. Επίδραση των αναστολέων στην έκφραση της DDC	154
4.1.4. Επίδραση του DENV στην έκφραση των DDC, MAO, VMAT2 και TH...	154
4.2. ANTI-HBV ΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ	156
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	160

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

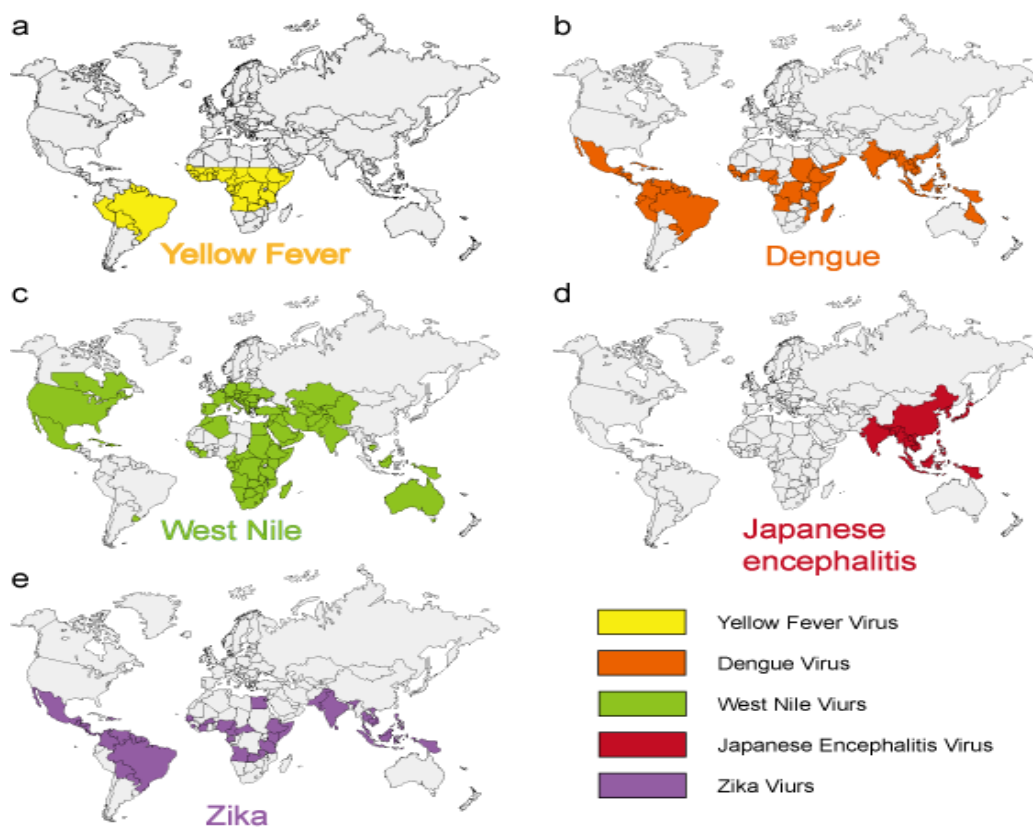
Οι ιοί της οικογένειας *Flaviviridae* (Φλαβοϊοί) περιλαμβάνει τέσσερα γένη: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* και *Pegivirus*, με πάνω από 60 είδη (Εικ. 1). Οι περισσότεροι από τους ιούς αυτούς μολύνουν θηλαστικά και πτηνά. Χαρακτηρίζονται από ιικό σωματίδιο σφαιρικού σχήματος και διαμέτρου 40-60 nm, το οποίο περιβάλλεται από λιπιδικής φύσης φάκελο. Το γενετικό τους υλικό είναι ένα θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA μήκους περίπου 9 – 13 kb [1]. Τα γένη *Hepacivirus* και *Flavivirus* είναι σημαντικά αίτια ανθρώπινων ασθενειών και θνησιμότητας παγκοσμίως, με το πρώτο να περιλαμβάνει τον ιό της Ηπατίτιδας C (Hepatitis C virus - HCV) και το δεύτερο ιούς που μεταφέρονται με αρθρόποδα, όπως ο ιός του δάγκειου πυρετού (Dengue virus - DENV), ο ιός του κίτρινου πυρετού (Yellow fever virus - YFV) και ο ιός Ζίκα (Zika virus - ZIKV) [1]. Οι ιοί του γένους *Pestivirus* προκαλούν ασθένειες σε ζώα, πολλές φορές με οικονομικό κόστος [2], ενώ οι ιοί του γένους *Pegivirus* προκαλούν χρόνιες μολύνσεις σε πολλά είδη θηλαστικών, χωρίς να έχουν συνδεθεί μέχρι σήμερα με κάποια νόσο [3].



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας *Flaviviridae*. Παρουσιάζονται κάποιοι χαρακτηριστικοί ιοί. [4]

1.1. Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΑΓΓΕΙΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ

Ο ιός του Δάγγειου πυρετού (Dengue Virus – DENV) ανήκει στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*, το οποίο περιλαμβάνει περισσότερους από 70 ιούς που είναι γνωστοί και ως αρμποϊοί (arboviruses: arthropod-borne viruses) διότι μεταδίδονται στους ανθρώπους κυρίως μέσω κουνουπιών και κροτώνων (τσιμπούρια). Οι συνηθέστεροι κύριοι ξενιστές τους είναι θηλαστικά και πτηνά, στους οποίους οι μολύνσεις κυμαίνονται από ασυμπτωματικές μέχρι σοβαρή εγκεφαλίτιδα ή αιμορραγικοί πυρετοί. Άλλα σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα του γένους αυτού αποτελούν οι ιοί της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας (JEV), της εγκεφαλίτιδας του Σαιντ Λούις (SLEV) και του κίτρινου πυρετού



(Yellow fever virus - YFV), ενώ πρόσφατα απασχόλησε τη δημόσια υγεία ο ιός Zika (Zika virus - ZIKV) **(Εικ.2)** [1].

Εικόνα 2: Περιοχές εξάπλωσης χαρακτηριστικών ιών του γένους *Flavivirus*. [5]

1.1.1. Γενικά στοιχεία

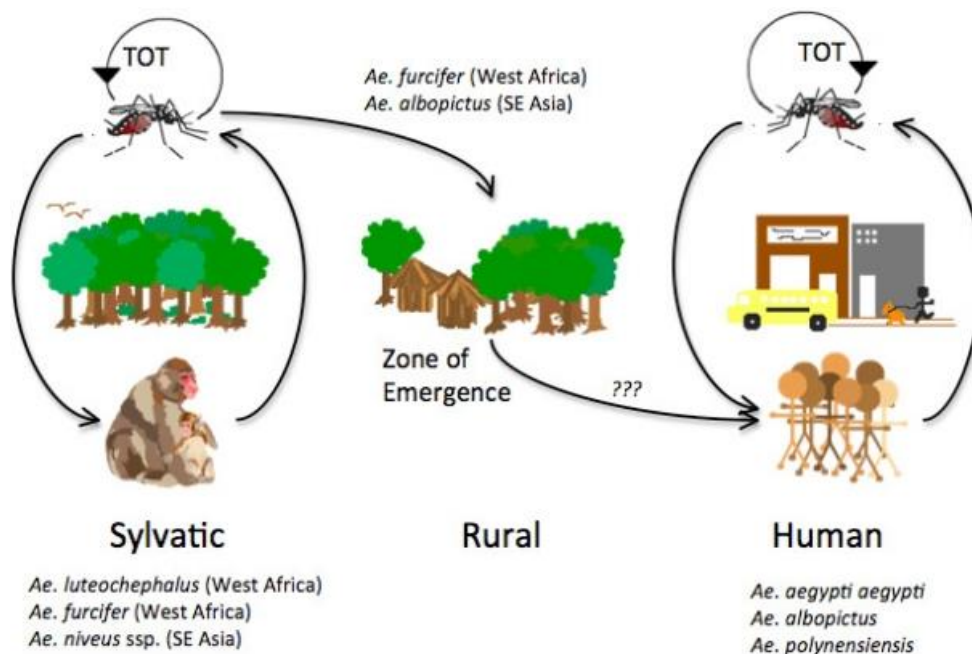
1.1.1.1. Ιστορικά στοιχεία

Ο ιός DENV είναι ίσως τόσο παλαιός όσο και η ανθρωπότητα. Οι πρώτες πιθανές αναφορές βρίσκονται σε μια κινεζική ιατρική εγκυκλοπαίδεια από τη Δυναστεία των Jìn (265-420 μ.Χ.), όπου περιγράφεται η ασθένεια, με επιδημιολογική εξάπλωση, ως «δηλητηριώδες νερό» που συνδέεται με ιπτάμενα έντομα [6, 7]. Περίπου χίλια διακόσια χρόνια αργότερα, τα πρώτα κρούσματα μιας ασθένειας συμβατής με τον κλασικό πυρετό του δάγκειου πυρετού έλαβαν χώρα στην Καραϊβική το 1635 και 1699, πολύ πριν από τις αναφερόμενες ταυτόχρονες επιδημίες του 1779 και 1780 που σημειώθηκαν στην Ασία, την Αφρική και τη Βόρεια Αμερική. Στη συνέχεια, οι πόλεμοι που πραγματοποιήθηκαν στους επόμενους αιώνες σε συνδυασμό με τις οικολογικές μεταβολές που επέφερε η τεχνολογική ανάπτυξη διευκόλυναν την διάδοση του ιού [8]. Έτσι, σήμερα ο DENV αποτελεί ένα ενδημικό είδος στις τροπικές και υποτροπικές χώρες που έχει εξαπλωθεί πολύ γρήγορα, ενώ μπορεί να προκαλέσει επιδημίες όπου υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες. Ο ετήσιος αριθμός κρουσμάτων είναι πάνω από 390 εκατομμύρια σε πάνω από 100 χώρες [9]. Αυτός μπορεί να εξελιχθεί σε σύνδρομο δάγκειου κλονισμού με θνησιμότητα έως 20% [10].

1.1.1.2. Τρόποι μετάδοσης του ιού DENV

Οι ιοί που ανήκουν στο γένος *Flavivirus* μεταδίδονται στα σπονδυλωτά-ξενιστές με κουνούπια, τσιμπούρια, ή με άγνωστο φορέα, ενώ κάποιοι μεταδίδονται μεταξύ αρθροπόδων, χωρίς τη συμμετοχή σπονδυλωτών. Συγκεκριμένα, ο ιός DENV

μεταδίδεται μέσω των κουνουπιών του γένους *Aedes*, με κυριότερους φορείς τα είδη *Ae. Aegypti* και *Ae. Albopictus* (Εικ. 3). Διακρίνονται κυρίως δύο κύκλοι μετάδοσης, ο δασώδης (sylvatic) και ο αστικός (urban). Στο δασώδη κύκλο, ο ιός μεταδίδεται ανάμεσα σε πρωτεύοντα θηλαστικά και είδη κουνουπιών που ζουν στο δάσος και στον αστικό μεταδίδεται μεταξύ ανθρώπων και κουνουπιών. Ο ιός μεταφέρεται στους ανθρώπους από τον δασώδη κύκλο περιστασιακά, από ανθρώπινους πληθυσμούς που ζουν κοντά σε δάση και ζούγκλες [11, 12]. Στις πρώτες μέρες μετά τη μόλυνση παρατηρούνται υψηλά επίπεδα του ιού στο αίμα (ιαιμία), καθιστώντας έτσι εύκολη τη μετάδοση του ιού στο κουνούπι κατά την τροφοληψία [13].



Εικόνα 3: Κύκλος μετάδοσης των ιών του γένους *Flavivirus*. [11]

1.1.1.3. Κλινική εικόνα της μόλυνσης από τον ιό DENV

Έχουν χαρακτηριστεί 4 διαφορετικοί γονότυποι του DENV (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4) και όλοι μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια σε ανθρώπους [9]. Ένας πέμπτος ορότυπος αναφέρθηκε πρόσφατα αλλά η σημασία του ως πιθανός ιογενής παράγοντας δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί [9]. Η μόλυνση με οποιονδήποτε από τους 4 ορότυπους του DENV μπορεί να είναι ασυμπτωματική στην πλειονότητα των περιπτώσεων ή μπορεί να

οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, που κυμαίνονται από ένα ήπιο σύνδρομο τύπου γρίπης γνωστό ως Δάγκειος πυρετός (dengue fever - DF) έως την πιο σοβαρή και πιθανά θανατηφόρα μορφή της νόσου, το Δάγκειο αιμορραγικό πυρετό (Dengue Hemorrhagic Fever - DHF), που χαρακτηρίζεται από αυξημένη αγγειακή ευθραυστότητα και διαπερατότητα και σε μερικούς ασθενείς μπορεί να εξελιχθεί σε σύνδρομο καταπληξίας από Δάγκειο (Dengue Shock Syndrome - DSS) [14]. Συνήθως, το DF είναι μια οξεία εμπύρετη ασθένεια που χαρακτηρίζεται από έντονο πονοκέφαλο, οπισθοφθαλμικό άλγος, πόνο των μυών και των αρθρώσεων, ναυτία, έμετο και εξανθήματα. Η εμπύρετη περίοδος του DF διαρκεί 5-7 ημέρες και μπορεί να υποχωρήσει, αφήνοντας τον ασθενή να νιώθει κουρασμένος για αρκετές ακόμη ημέρες. Το DHF αρχίζει συνήθως με συμπτωματολογία που μοιάζει με το DF, σε συνδυασμό με αιμορραγικές εκδηλώσεις, θρομβοπενία και ενδείξεις αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας. Η θερμοκρασία είναι τυπικά υψηλή (38-40 °C) και συνεχίζεται για 2-7 ημέρες. Τέλος, η εκδήλωση του DSS χαρακτηρίζεται από κυκλοφοριακή ανεπάρκεια, υπόταση ή καταπληξία [15] καθώς και δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (central nervous system, CNS) [16]. Παρόλο που πρόκειται για μία γνωστή ασθένεια, οι κλινικές εκδηλώσεις της συνεχώς μεταβάλλονται. Σήμερα, ένας αυξανόμενος αριθμός περιστατικών παρουσιάζουν βλάβες σε όργανα όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η καρδιά ή τα νεφρά. Αυτές οι αλλαγές οδήγησαν τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) να συμπεριλάβει την οργανική ανεπάρκεια στα διαγνωστικά κριτήρια για τα σοβαρά περιστατικά της ασθένειας ([17]. Νευρολογικές εκδηλώσεις για παράδειγμα μπορεί να είναι παροδικές ή μη αντιστρεπτές [18], και μπορεί να επηρεάζουν τόσο το κεντρικό [19] όσο και το περιφερικό νευρικό σύστημα [20].

1.1.1.4. Συσχέτιση της μόλυνσης με τον ιό DENV με νευρολογικές επιπλοκές

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μόλυνση με τον ιό του Δάγγειου πυρετού μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων εκ των οποίων ολόένα και

μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στις νευρολογικές επιπλοκές. Τα νευρολογικά συμπτώματα προκαλούνται κυρίως από τους DENV2 και DENV3 εφόσον αυτοί οι ορότυποι είναι συνδεδεμένοι με περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας, μηνιγγίτιδας καθώς και μυελίτιδας [21, 22]. Ωστόσο, με περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας έχουν συνδεθεί και οι ορότυποι DENV1 και DENV4 [23]. Παρόλο που οι νευρολογικές εκδηλώσεις θεωρούνται μη συνηθισμένες, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι εκδηλώνονται ολοένα και συχνότερα τόσο στο DF όσο και στο DHF [24, 25] ενώ περίπου το 1-21% των μολυσμένων με DENV ασθενών παρουσιάζουν νευρολογικές ανωμαλίες [21, 26]. Μάλιστα, κατά την διαφοροδιάγνωση πιθανών μολύνσεων του CNS, ο DENV παρατηρήθηκε στο 4-13% των περιπτώσεων [27, 28]. Ο επιπολασμός του DENV μεταξύ ιικών μολύνσεων του CNS αναφέρεται ότι είναι 5-6% στο Βιετνάμ [29, 30], 15% στην Ινδία [31] και 20% στην Ταϊλάνδη [32]. Αντίστοιχα στο Rio de Janeiro, μία ενδημική για τον DENV περιοχή, η μόλυνση με τον ιό ήταν η κυρίαρχη αιτία οξείας ιογενούς εγκεφαλίτιδας (47%) και ο αιτιολογικός παράγοντας για το 10% των περιπτώσεων ιογενούς μηνιγγίτιδας [33].

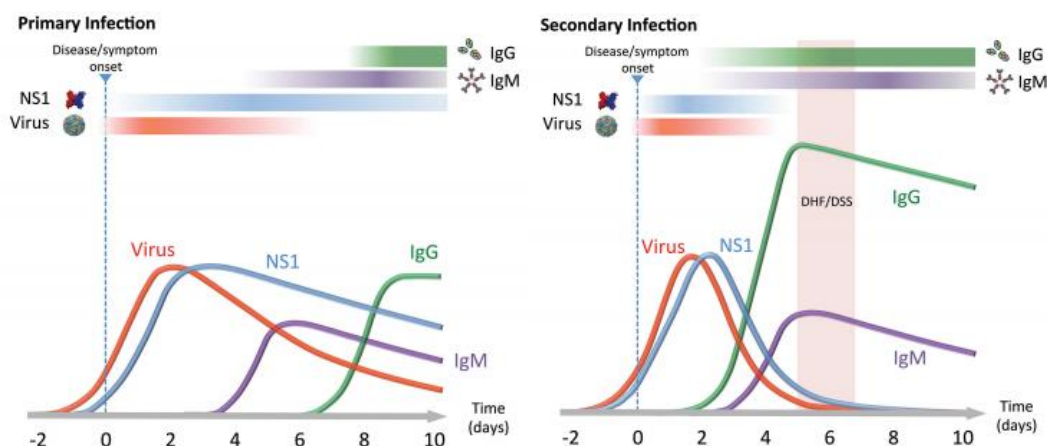
Επομένως, η νευροπαθογένεια που σχετίζεται με την μόλυνση από DENV δεν θεωρείται πλέον ένα σπάνιο γεγονός με την αιτιολογία του φαινομένου αυτού να παραμένει, ωστόσο, άγνωστη. Ιδιαίτερη προσοχή όμως πρέπει να δίνεται στο γεγονός ότι η νευροπαθογένεια δεν σχετίζεται απαραίτητα με την μόλυνση του νευρικού συστήματος αυτού καθαυτού παρόλο που ο νευροτροπισμός του DENV καθώς και η διείσδυση του στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα αποτελούν πλέον μη αμφισβητήσιμα γεγονότα. Οι νευρολογικές επιπλοκές μπορεί να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με ορισμένα κριτήρια όπως τα εξής : α) άμεση μόλυνση του ιστού (εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, μυελίτιδα), β) σημάδια που σχετίζονται με συστηματική ή μεταβολική ανισορροπία (εγκεφαλοπάθεια, εγκεφαλικό επεισόδιο), γ) πρώιμα ή μετέπειτα επακόλουθα της μόλυνσης (Guillain-Barré syndrome – GBS, Οξεία διάσπαρτη εγκεφαλομυελίτιδα) [34].

1.1.1.5. Διάγνωση της μόλυνσης από τον ιό DENV

Η βασική εργαστηριακή διαδικασία που ακολουθείται για αρκετά χρόνια είναι η ανοσολογική μέθοδος ELISA, με την οποία ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες του ιού, ή

αντισώματα έναντι αυτού. Η χρήση μοριακών τεχνικών, όπως η απλή ή η ποσοτική PCR, προσφέρουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, με την ανίχνευση του ιϊκού RNA στον ορό ασθενών [35].

Η επιλογή της κατάλληλης διαγνωστικής τεχνικής, εξαρτάται από το στάδιο της νόσου τη στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η εξέταση. Για παράδειγμα, στη διάγνωση του DENV, το ιϊκό RNA ανιχνεύεται κατά τη φάση της αιμίας, που διαρκεί περίπου 5 μέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Η ανίχνευση μπορεί να γίνει στο αίμα μέχρι και τις 8 ημέρες, ενώ στα ούρα ανιχνεύεται ακόμα και 16 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Κατά την οξεία φάση της νόσου μπορεί να γίνει ανίχνευση της NS1 πρωτεΐνης, η οποία κυκλοφορεί σε μεγάλες ποσότητες στον ορό των ασθενών και μπορεί να ανιχνευτεί εύκολα με ειδικά κιτ, ωστόσο δε μπορεί να διακρίνει μεταξύ των οροτύπων του DENV. Μετά την περίοδο της αιμίας, η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων, όπου η ανίχνευση IgM έναντι IgG, μπορεί να διακρίνει αντίστοιχα την πρωτογενή από τη δευτερογενή μόλυνση, η οποία είναι αρκετά συχνή στις τροπικές περιοχές (**Εικ. 4**) [35].



Εικόνα 4: Εμφάνιση βιοδεικτών του DENV σε ασθενείς με πρωτογενή (αριστερά) και δευτερογενή (δεξιά) μόλυνση.[36]

1.1.1.6. Μέθοδοι πρόληψης της μόλυνσης από τον ιό DENV

Η ύπαρξη των τεσσάρων οροτύπων του DENV καθιστά περίπλοκη την ανάπτυξη ενός εμβολίου, καθώς αυτό θα έπρεπε να προστατεύει και από τους 4 ορότυπους ταυτόχρονα, για να αποφευχθεί η ενίσχυση της μόλυνσης μέσω αντισωμάτων (ADE). Μόλις το 2015 εγκρίθηκε το πρώτο τετραδύναμο εμβόλιο κατά του DENV, το CYD-TVD ή Dengvaxia®, ένα χιμαιρικό εμβόλιο στο οποίο οι πρωτεΐνες prM/E του YFD-17D έχουν αντικατασταθεί με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των τεσσάρων οροτύπων του DENV. Ωστόσο η αποτελεσματικότητά του ποικίλει ανάλογα με τον ορότυπο και αντενδείκνυται η χρήση του σε μικρά παιδιά, λόγω σοβαρών κρουσμάτων Δάγκειου πυρετού σε παιδιά που είχαν προηγουμένα εμβολιαστεί και δεν προστατεύονταν επαρκώς. Για αυτό το λόγο η έρευνα για εμβόλιο έναντι του DENV συνεχίζεται [37].

1.1.2. Δομή και κύκλος ζωής του ιού DENV

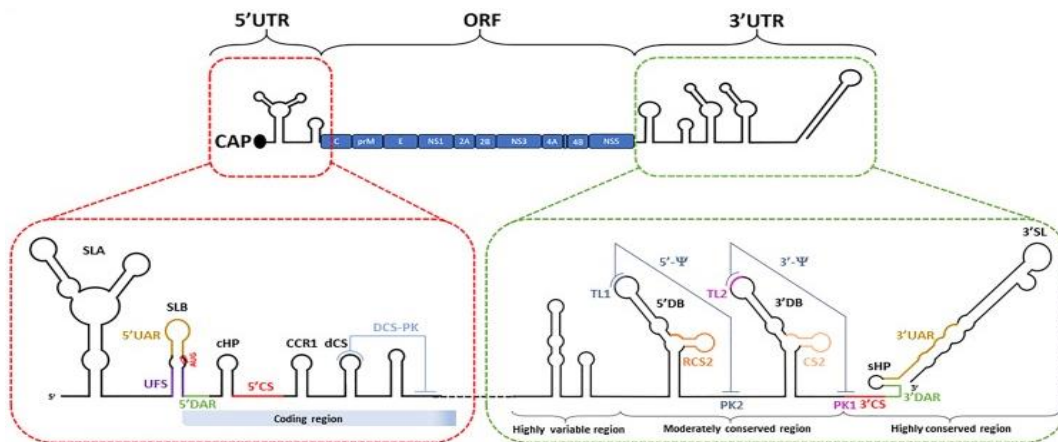
1.1.2.1. Γονιδίωμα του ιού DENV

Οι ιοί του γένους *Flavivirus* φέρουν ως γονιδίωμα ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, μεγέθους περίπου 11 kb, με ιδιαίτερη δομή τύπου καπέλου 1 (m7GpppAmp) στο 5' άκρο και χωρίς πολύ-A ουρά στο 3' άκρο (**Εικ. 5**). Συγκεκριμένα, το μήκος είναι 10,7 kb για τον DENV [38]. Το ιϊκό RNA περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), που κωδικοποιεί για μία πολυπρωτεΐνη και είναι πλαισιωμένο από εξαιρετικά συντηρημένες 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (UTR). Το 5' UTR έχει μήκος περίπου 100 νουκλεοτιδίων, ενώ το 3' UTR κυμαίνεται μεταξύ 350 έως 700 νουκλεοτιδίων. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν είναι οι δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου (C), του φακέλου (E), και η πρόδρομη μεμβρανική πρωτεΐνη (prM) και οι μη δομικές NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5 [39, 40].

Στο 5' UTR υπάρχουν δύο δευτεροταγείς δομές, οι SLA (στέλεχος θηλειάς A - stem-loop A) και SLB (stem-loop B), που διαχωρίζονται από μια ολιγο-U αλληλουχία, με διαφορετικές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιϊκού RNA. Η πρώτη φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ρόλο ως υποκινητής, ενώ η δεύτερη έχει προβλεφθεί *in silico* να σχηματίζει ένα βραχύτερο βρόχο, περιέχοντας μία αλληλουχία μήκους 16 νουκλεοτιδίων,

γνωστή ως 5'-UAR, η οποία είναι συμπληρωματική σε μία περιοχή στο 3' άκρο του ιϊκού γονιδιώματος (3'-UAR). Το γεγονός αυτό βοηθά στην κυκλοποίηση του RNA, μια διαδικασία ιδιαίτερα σημαντική για την αντιγραφή του [41-43].

Το 3' UTR κυμαίνεται σε μήκος από ~ 400 έως 600 βάσεις και δομείται σε περιοχές συντηρημένες μεταξύ των ιών του γένους. Αποτελείται από περιοχές με δευτεροταγή δομή stem-loop (SL) και δύο αλυσίδες. Το μήκος του 3'UTR ποικίλει ανάλογα με το είδος του ιού, αλλά χωρίζεται κυρίως σε τρεις περιοχές: domain 1 αμέσως μετά το κωδικόνιο λήξης που περιέχει 2 δομές SL. Το domain 2 είναι μετρίως συντηρημένο, με δύο δομές DB (dumbbell - DB1 και DB2) και CS2 (CS - conserved sequence). Και το domain 3 είναι εξαιρετικά συντηρημένο μεταξύ των ιών του γένους και περιέχει το CS1, μια μικρή φουρκέτα (sHP - small hairpin) και μια μεγάλη τερματική δομή 3' SL. Το CS1 συμβάλλει στην κυκλοποίηση του RNA κατά την αντιγραφή.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος των ιών του γένους *Flavivirus*.

[40]

1.1.2.2. Οι πρωτεΐνες του ιού DENV

Η μετάφραση του μοναδικού ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης παράγει μία πολυπρωτεΐνη η οποία διασπάται από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες σε 10 πρωτεΐνες με δομικό (C-prM-E) και λειτουργικό ρόλο (NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A- NS4B-NS5) (Εικ. 6) [39, 40].

Καψιδιακή πρωτεΐνη C: Η πρωτεΐνη C είναι μια εξαιρετικά βασική πρωτεΐνη, μεγέθους περίπου 11 kDa και σχηματίζει ομοδιμερή με εξαιρετική συγγένεια τόσο για τα νουκλεϊκά οξέα όσο και για τις λιπιδικές μεμβράνες. Σε συνδυασμό με το ιϊκό RNA, η C δημιουργεί το ιϊκό νουκλεοκαψίδιο [44, 45]. Το κάθε μονομερές περιέχει 26 βασικά αμινοξέα και μόνο 3 όξινα κατάλοιπα, καταδεικνύοντας το άκρως θετικό φορτίο του. Συγκεκριμένα, η αμινοτελική περιοχή έχει υψηλή πυκνότητα θετικών φορτίων (8 λυσίνες ή αργινίνες στα πρώτα 22 αμινοξέα). Δομικές μελέτες έδειξαν επίσης, ότι το μονομερές έχει τέσσερις α-έλικες (α1 έως α4) [44].

prM/M: Η prM πρωτεΐνη βρίσκεται στην επιφάνεια του ιϊκού σωματιδίου και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της εξόδου του ιού από το κύτταρο-ξενιστή. Η πρόδρομη μορφή της, η prM, έχει μήκος 166 αμινοξέα, με τα πρώτα 91 κατάλοιπα να συνιστούν το πρόδρομο πεπτιδίο. Στο Golgi, η πρωτεάση φουρίνη (furin) διασπά την prM, οδηγώντας στην παραγωγή ώριμων ιϊκών σωματιδίων. Η ώριμη πρωτεΐνη M έχει μία αμινοτελική α-ελικοειδή περιοχή και δύο διαμεμβρανικές περιοχές στο καρβοξυτελικό τμήμα. Η M παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύντηξης του ιού και οι μεταλλάξεις στο M έδειξαν ότι μειώνουν τη συγκρότηση και την είσοδο του ιού [46].

E πρωτεΐνη: Η πρωτεΐνη E, μεγέθους ~53 kDa, είναι η κύρια επιφανειακή πρωτεΐνη του ιού. Το αμινοτελικό της άκρο περιλαμβάνει τρεις διακριτές περιοχές (ED - envelope domains) τις EDI, EDII και EDIII, ενώ το καρβοξυτελικό της άκρο περιέχει δύο διαμεμβρανικές α-έλικες. Η E είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση στους υποδοχείς του κυττάρου και τη σύντηξη του ιϊκού φακέλου με τη μεμβράνη του ενδοσώματος, ενώ σχετίζεται με τη συγκρότηση και τον τροπισμό του ιού [47].

NS1: Η NS1 είναι μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη, με μοριακό βάρος να κυμαίνεται μεταξύ 46-55 kDa ανάλογα με το επίπεδο γλυκοζυλίωσής της. Η γλυκοζυλίωση της NS1 είναι σημαντική για αποτελεσματική έκκριση, μολυσματικότητα και ιϊκή αντιγραφή. Η NS1 υπάρχει ως μονομερές, διμερές (πρωτεΐνη συνδεδεμένη με μεμβράνη, mNS1) και εξαμερές (εκκρινόμενη πρωτεΐνη, sNS1). Είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί τις TLRs και αναστέλλει το σύστημα του συμπληρώματος. Η ενδοκυτταρική NS1 είναι απαραίτητη για την ιϊκή αντιγραφή, ενώ η εκκρινόμενη και δεσμευμένη σε μεμβράνη NS1 επάγουν την ανοσολογική απόκριση. Στο καρβοξυτελικό άκρο της NS1

υπάρχει ένα οκταπεπτιδίο (L/M-V-X-S-X-V-X-A), απαραίτητο για τη διάσπαση NS1 από την E, και βρέθηκε να είναι συντηρημένο σε όλους τους ιούς του γένους [48].

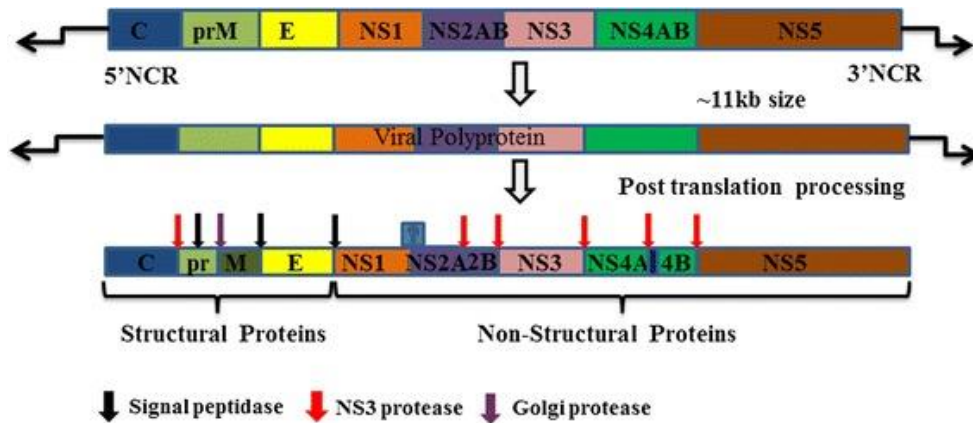
NS2A και NS2B: Τόσο η NS2A όσο και η NS2B είναι μικρού μεγέθους πρωτεΐνες, 22 και 14 kDa αντίστοιχα. Η NS2A αποτελείται από 5 διαμεμβρανικές περιοχές και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού, όπως έχει δείχθει με πειράματα στοχευμένης μεταλλαξογένεσης. Ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός δράσης της δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί [49]. Η NS2B είναι μια μεβρανοεξαρτώμενη πρωτεΐνη και βασικός συμπαραγόντας της NS3 πρωτεάσης [50].

NS3: Η ιϊκή πρωτεΐνη NS3 (μεγέθους 69 kDa) είναι η δεύτερη μεγαλύτερη ιϊκή πρωτεΐνη μετά την NS5 στο γονιδίωμα των ιών του γένους *Flavivirus* και παίζει αρκετούς βασικούς ρόλους στον κύκλο ζωής τους. Αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές, μία περιοχή πρωτεάσης σερίνης στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-167) και μία περιοχή ελικάσης στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 180- 618), οι οποίες ενώνονται με έναν ευέλικτο σύνδεσμο περίπου 10 αμινοξέων. Η περιοχή πρωτεάσης διασπά την ιϊκή πολυπρωτεΐνη και απελευθερώνει τις μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Απαιτεί την NS2B ως συμπαραγόντα για τη δράση της, αλλά και τη σωστή αναδίπλωσή της. Η περιοχή ελικάσης περιέχει ενεργότητες RNA ελικάσης, NTPάσης και RTPάσης, οι οποίες απαιτούν Mg^{2+} για τη λειτουργία τους. Εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιϊκού RNA και τη συγκρότηση του ιϊκού σωματιδίου και μπορεί να χωρισθεί σε 3 λειτουργικές υποπεριοχές. Οι υποπεριοχές 1 και 2 αποτελούνται από οκτώ διατηρημένα μοτίβα απαραίτητα για την πρόσδεση του RNA, την υδρόλυση του ATP και την επικοινωνία μεταξύ των δύο θέσεων πρόσδεσης. Η τρίτη υποπεριοχή σχηματίζει τη σήραγγα πρόσδεσης του RNA, ενώ είναι απαραίτητη και για την αλληλεπίδραση της NS3 με την NS5 [173]. Η ενεργότητα RNA 5' τριφωσφατάσης (RTPάση), καταλύει το πρώτο βήμα για τη δημιουργία της 5' δομής καπέλου του ιϊκού RNA. Πέρα από τον ενζυμικό της ρόλο, η NS3 συντονίζει τη συγκρότηση του ιϊκού συμπλόκου αντιγραφής και αλληλεπιδρά με κυτταρικές πρωτεΐνες, αναστέλλοντας έτσι την ανοσολογική απόκριση του κυττάρου [50].

NS4A και NS4B: Είναι δύο εξαιρετικά υδρόφοβες πρωτεΐνες, μεγέθους 16 και 30 kDa, αντίστοιχα, οι οποίες αν και δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς, φαίνεται να

διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στον κύκλο ζωής των ιών. Η NS4A, σε συνδυασμό με άλλες ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες, προωθεί την αναδιάταξη των μεμβρανών για την δημιουργία των περιοχών ιϊκής αντιγραφής. Η NS4B εμποδίζει το μονοπάτι σηματοδότησης της ιντερφερόνης, ενώ λειτουργεί και ως ρυθμιστής της NS3 ελικάσης [51].

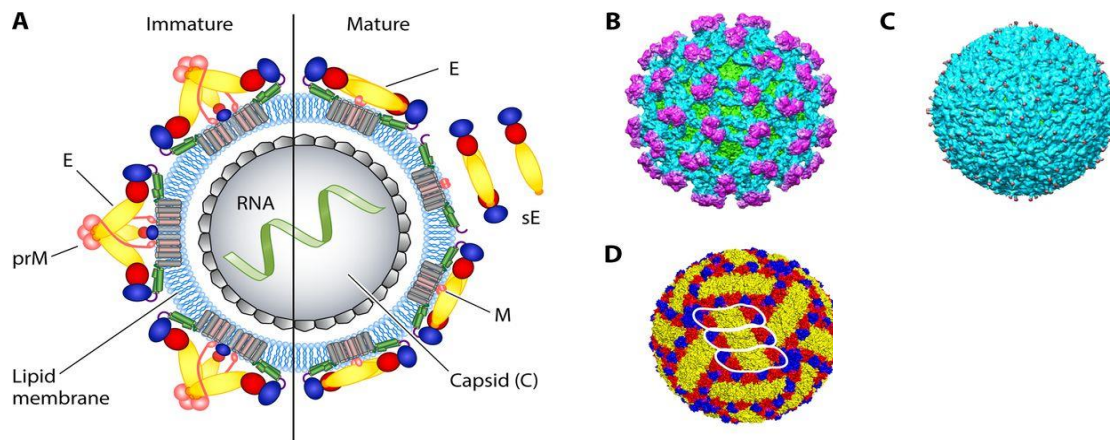
NS5: Η NS5 είναι η μεγαλύτερη ιϊκή πρωτεΐνη του γένους *Flavivirus* (102 kDa). Έχει δύο περιοχές: μία περιοχή μεθυλοτρανσφεράσης (ΜΤάση) στο αμινοτελικό άκρο της και μία RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η περιοχή μεθυλοτρανσφεράσης (αμινοξέα 1-265) είναι υπεύθυνη για την δημιουργία της δομής καπέλου στο 5' άκρο του ιϊκού RNA, το οποίο μοιάζει με την αντίστοιχη δομή των κυτταρικών mRNA, ενισχύει τη μετάφραση στα ριβοσώματα και βοηθάει στη διαφυγή από κυτταρικούς ανιχνευτές παθογόνων, όπως το επαγόμενο από ρετινοϊκό οξύ γονίδιο I (retinoic acid inducible gene I - RIG-I) και την πρωτεΐνη MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5). Για την ενεργότητα ΜΤάσης είναι απαραίτητο ένα ιόν Mg^{2+} . Η περιοχή πολυμεράσης (αμινοξέα 276-900), είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία του αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο χρησιμοποιεί ως μήτρα για τη δημιουργία περίσσειας αντιγράφων RNA θετικής πολικότητας. Όπως οι περισσότερες RdRp, έχει δομή δεξιού χεριού, με περιοχές παλάμης, δακτύλων και αντίχειρα. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή παλάμης και περιέχει δύο κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, που δεσμεύουν τα δύο ιόντα Mg^{2+} και σχηματίζουν το φωσφοδιεστερικό δεσμό. Οι δύο περιοχές της NS5 συνδέονται με ένα ευέλικτο πεπτιδίο (αμινοξέα 266–271), το οποίο επηρεάζει τη στερεοδιάταξη και την ενζυμική λειτουργία της πρωτεΐνης [52]. Ενώ οι RdRp είναι επιρρεπείς σε λάθη, συμβάλλοντας έτσι στην γρήγορη ιϊκή προσαρμογή και εξέλιξη, η RdRp του YFV παρουσιάζει αρκετά υψηλή πιστότητα της αντιγραφής, ερμηνεύοντας έτσι την μικρή ποικιλομορφία του συγκεκριμένου ιού και την αποτελεσματικότητα του υπάρχοντος εμβολίου [53]. Τέλος, εκτός από τον κεντρικό ρόλο της στην ιϊκή αντιγραφή, η NS5 αλληλεπιδρά με κυτταρικές πρωτεΐνες, κυρίως εμποδίζοντας με διάφορους μηχανισμούς τα μονοπάτια σηματοδότησης της ιντερφερόνης, με σκοπό να διαφύγει από την αντι-ιϊκή της δράση [54].



Εικόνα 6: Δομή του γονιδιώματος των ιών του γένους *Flavivirus* και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης σε δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες.[48]

1.1.1.1. Δομή ιϊκών σωματιδίων του ιού DENV

Ο DENV αποτελείται από ένα νουκλεοκαψίδιο, που περιβάλλεται από ιϊκό φάκελο. Το θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA περικλείεται από πολλαπλά αντίγραφα της καψιδιακής πρωτεΐνης C, σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο. Ο λιποπρωτεϊνικός φάκελος έχει εικοσαεδρική συμμετρία και αποτελείται από 180 αντίγραφα τόσο της γλυκοπρωτεΐνης E (~ 500 αμινοξέων) όσο και της μεμβρανικής πρωτεΐνης M (~75 αμινοξέα) αγκυρωμένες σε λιπιδική μεμβράνη. Η επιφάνεια των ανώριμων ιϊκών σωματιδίων αποτελείται από 60 κορυφές που σχηματίζονται από τρία ετεροδιμερή prM-E. Τα ώριμα σωματίδια σχηματίζονται ύστερα από την πέψη της prM και περιέχουν 90 ομοδιμερή της E [55].

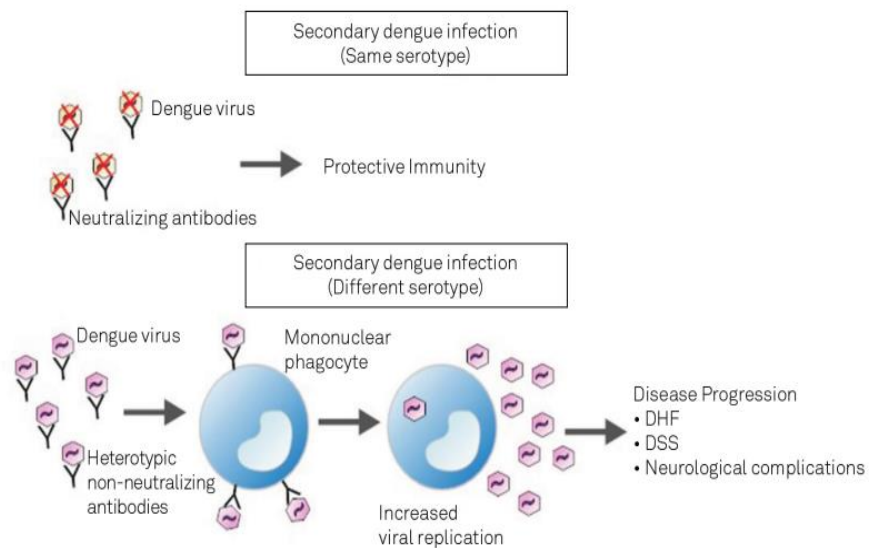


Εικόνα 7: **A.** Δομή ιϊκού σωματιδίου. Σχηματική αναπαράσταση ανώριμου (αριστερά) και ώριμου (δεξιά) σωματιδίου. **B,C.** Δομές Κρυο-ηλεκτρονικού μικροσκοπίου του ανώριμου (B) και ώριμου (C) ιϊκού σωματιδίου του DENV. **D.** Αναπαράσταση της επιφανειακής δομής των διμερών της E στα ώριμα ιϊκά σωματίδια του DENV [56].

1.1.2.3. Κύκλος ζωής του ιού DENV

Οι ιοί του γένους *Flavivirus* που μεταδίδονται μέσω των κουνουπιών ακολουθούν κατά βάση κοινούς μηχανισμούς μόλυνσης, μετάδοσης και πολλαπλασιασμού εντός των κυττάρων-ξενιστών. Ο DENV χρησιμοποιεί για την διάδοση του τα κουνούπια του γένους *Aedes*, τα οποία μολύνονται από ιαμικά άτομα και μπορούν να γίνουν μολυσματικά μέσα σε διάστημα 4 – 12 ημερών [57, 58]. Κατά την τροφοληψία των κουνουπιών, ο ιός μεταφέρεται υποδορίως και πρωταρχικά φαίνεται να μολύνει κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα κύτταρα Langerhans και τα δενδριτικά κύτταρα του δέρματος. Τα μολυσμένα κύτταρα ενεργοποιούνται και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες, όπου ο ιός μολύνει και άλλα κύτταρα, όπως μονοκύτταρα ή μακροφάγα, και στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το λεμφικό σύστημα, μεταφέρεται σε άλλα όργανα [59]. Ο DENV μολύνει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών σειρών, ενώ *in vivo* έχει αναφερθεί πως αντιγόνα του DENV έχουν εντοπιστεί σε λεμφοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, νευρώνες και αστροκύτταρα. Οι αναφορές αυτές συνάδουν με τις παθολογικές εκδηλώσεις του DENV, ωστόσο οι ενδείξεις είναι αντικρουόμενες [59, 60].

Η είσοδος των ιών του γένους *Flavivirus* γίνεται μέσω εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκύττωσης. Δεν είναι πολλά γνωστά για τους υποδοχείς στους οποίους συνδέονται οι ιοί αυτοί. Ωστόσο, έχει αναφερθεί για τον DENV πως χρησιμοποιεί μια ποικιλία υποδοχέων, αναμεσά τους οι heparan sulfate, Hsp90, CD14 και οι υποδοχείς λεκτίνης τύπου C (C-type lectin receptors - CLR), γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τον ευρύ τροπισμό του [60]. Τα ιικά σωματίδια, μετά την πρόσδεση στους υποδοχείς, μεταφέρονται σε θέσεις όπου πραγματοποιείται η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Τα κυστίδια που δημιουργούνται ενώνονται με πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία στη συνέχεια ωριμάζουν σε όψιμα ενδοσώματα. Σε αυτό το στάδιο, το όξινο pH των ενδοσωμάτων προκαλεί αναδιαμόρφωση της δομής της E πρωτεΐνης, η οποία προκαλεί τη σύντηξη των μεμβρανών του ιικού φακέλου και του ενδοσώματος, απελευθερώνοντας το νουκλεοκαψίδιο εντός του κυτταροπλάσματος [60]. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του DENV είναι πως σε περιπτώσεις δευτερογενούς μόλυνσης από ετερόλογο ορότυπο, τα ήδη υπάρχοντα αντισώματα δεν εξουδετερώνουν αποτελεσματικά το δεύτερο ορότυπο, με αποτέλεσμα ο ιός να προσδένεται στους υποδοχείς αντισωμάτων FcR στην επιφάνεια μονοκύτταρων, δενδριτικών και μακροφάγων, ενισχύοντας την είσοδό του σε αυτά τα κύτταρα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ενίσχυση της μόλυνσης μέσω αντισωμάτων (antibody-dependent enhancement of infection - ADE) (**Εικ. 8**) [60].

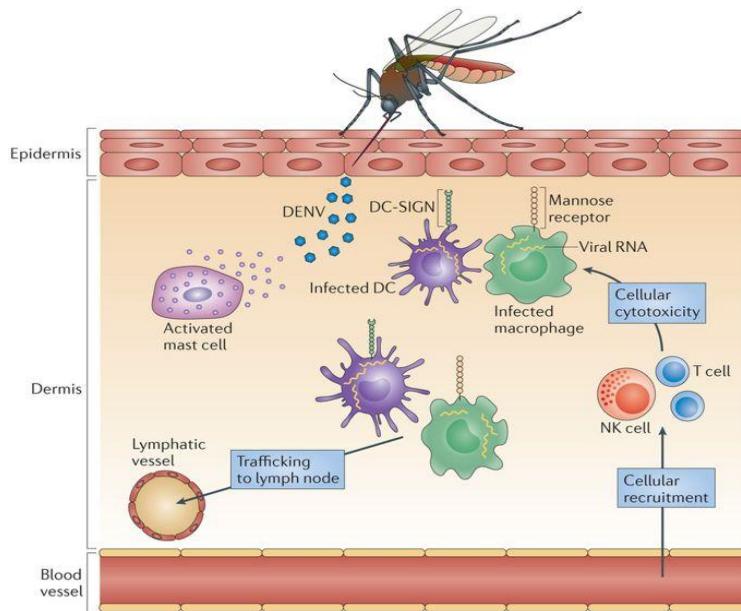


DENV: dengue virus; DHF: dengue severe hemorrhagic syndrome; DSS: dengue severe shock syndrome.

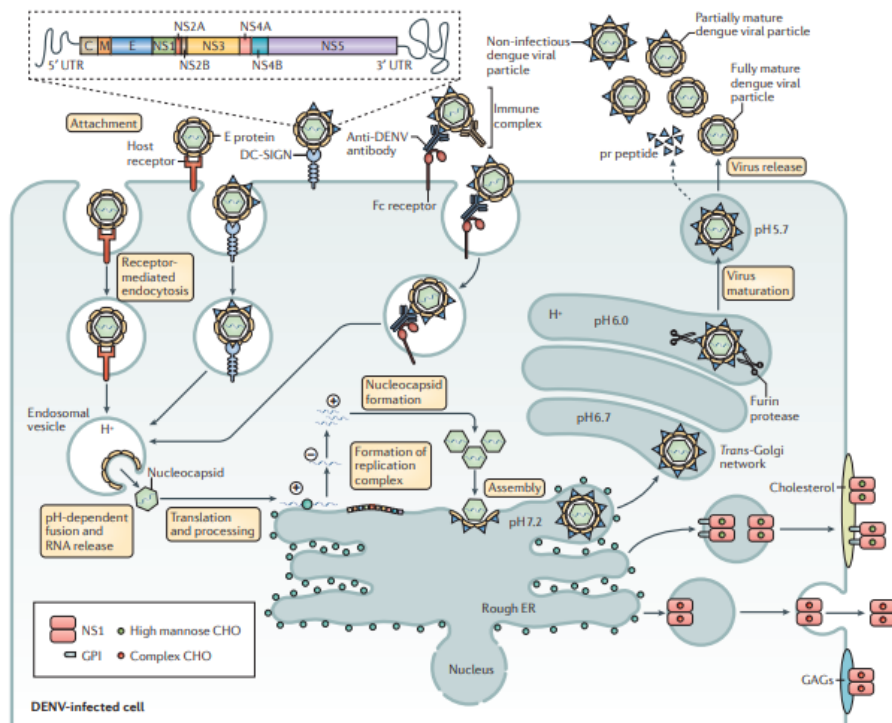
Εικόνα 8: Το φαινόμενο ενίσχυση της μόλυνσης μέσω αντισωμάτων (*antibody-dependent enhancement of infection - ADE*) κατά τη μόλυνση με DENV. Σε περιπτώσεις δευτερογενούς μόλυνσης από ετερόλογο ορότυπο, τα ήδη υπάρχοντα αντισώματα δεν εξουδετερώνουν αποτελεσματικά το δεύτερο ορότυπο, με αποτέλεσμα ο ιός να προσδένεται στους υποδοχείς αντισωμάτων FcR στην επιφάνεια μονοκύτταρων, δενδρικών και μακροφάγων, ενισχύοντας την είσοδό του σε αυτά τα κύτταρα. [16]

Στο κυτταρόπλασμα, το ιϊκό RNA απελευθερώνεται από το νουκλεοκαψίδιο και μεταφράζεται από τα ριβοσώματα στο αδρό ER. Η παραγόμενη πολυπρωτεΐνη διασπάται από πρωτεάσες του ξενιστή και του ιού στις τρεις δομικές πρωτεΐνες (C, prM, και E) και επτά μη δομικές πρωτεΐνες (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5). Στη συνέχεια, οι μη δομικές πρωτεΐνες συντονίζουν την αντιγραφή του ιϊκού γονιδιώματος, η οποία πραγματοποιείται σε μεμβρανώδη κυστίδια που δημιουργούνται από τον ιό στη μεμβράνη του ER. Αυτά τα κυστίδια έχουν μέση διάμετρο <85 nm και μπορούν να περιέχουν θεωρητικά 50 μόρια γονιδιωματικού RNA ανά κυστίδιο. Η αντιγραφή διεκπεραιώνεται κυρίως από την NS5 πολυμεράση που παράγει έναν συμπληρωματικό αρνητικό κλώνο, ο οποίος χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων γονιδιωματικού RNA [61].

Το νεοσυντιθέμενο RNA, στη συνέχεια, περιβάλλεται από την πρωτεΐνη C για να σχηματίσει το νουκλεοκαψίδιο. Οι prM και E πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερή που προσανατολίζονται στον αυλό του ER. Τα ανώριμα σωματίδια που σχηματίζονται στο ER ωριμάζουν καθώς ταξιδεύουν μέσω της εκκριτικής οδού. Η prM ωριμάζει στην M στο δίκτυο trans-Golgi από την κυτταρική πρωτεάση φουρίνη. Θεωρείται πως η prM προστατεύει κατά την έκκριση την πρωτεΐνη E από την αναδιοργάνωση και την πρόωμη σύντηξη λόγω του pH, επομένως το στάδιο της ωρίμανσης είναι απαραίτητο για τη μολυσματικότητα του ιού [59, 60].



Εικόνα 9: Είσοδος του DENV στον οργανισμό. [62]



Εικόνα 10: Κύκλος ζωής του DENV. [63]

1.1.3. Μοριακές τεχνολογίες μελέτης του ιού DENV

Τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευαστεί συστήματα μελέτης του DENV στην κυτταροκαλλιέργεια. Το 1997 κατασκευάστηκε ο πρώτος κλώνος του DENV οροτύπου 2 (στέλεχος 16681), με τον κλωνοποιημένο ιό να είναι ίδιας μολυσματικότητας με τον πατρικό [64]. Στη συνέχεια ακολούθησαν προσπάθειες βελτίωσης της παραγωγής του κλώνου [65], ενώ κατασκευάστηκαν και κλώνοι που φέρουν γονίδια αναφοράς για εύκολη ποσοτικοποίηση της ιϊκής αντιγραφής [66].

Η κατασκευή υπογονιδιωματικών ρεπλικονίων που περιλαμβάνουν την αλληλουχία των μη δομικών πρωτεϊνών και τα 5' και 3' UTR, προσφέρει το πλεονέκτημα πως τα συστήματα αυτά είναι ασφαλή, καθώς η έλλειψη των δομικών πρωτεϊνών τα καθιστά μη μολυσματικά. Επιπλέον, δίνουν την δυνατότητα μελέτης της ιϊκής γονιδιωματικής αντιγραφής ανεξάρτητα από τη συγκρότηση του ιϊκού σωματιδίου [67]. Έχουν κατασκευαστεί υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια που φέρουν κάποιο γονίδιο αναφοράς, όπως η firefly ή *Renilla* λουσιφεράση ή η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), για εύκολη ποσοτικοποίηση των επιπέδων αντιγραφής, τα οποία προσφέρουν τη δυνατότητα εφαρμογής στο μαζικό έλεγχο για ανίχνευση αναστολέων έναντι του DENV [68, 69]. Επιπλέον, υπάρχουν υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια που φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για κατασκευή κυτταρικών σειρών που τα εκφράζουν σταθερά, καθώς και ρεπλικόνια πλήρους αλληλουχίας με γονίδια αναφοράς [70].

Η ανάπτυξη ζωικού μοντέλου που θα υποστηρίζει τη μόλυνση με DENV αποτελεί μακροχρόνια πρόκληση. Το γεγονός ότι τα μόνα σπονδυλωτά που μολύνει ο DENV είναι τα πρωτεύοντα θηλαστικά, αποτέλεσε εμπόδιο στη μελέτη της παθογένειας του DENV και στην ανάπτυξη εμβολίου. Λόγω των μειονεκτημάτων χρήσης των πρωτευόντων, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανάπτυξης μοντέλων ποντικών. Τα μοντέλα αυτά περιλαμβάνουν ποντίκια με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (SCID), ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια που φέρουν ανθρώπινες κυτταρικές σειρές ή λεμφοκύτταρα, καθώς και διαγονιδιακά ποντίκια με ελαττωματικά μονοπάτια σηματοδότησης της ιντερφερόνης [71-73]. Τα επίπεδα μόλυνσης και η εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου ποικίλουν μεταξύ των διάφορων μοντέλων, ωστόσο έχουν προσφέρει σημαντική πληροφορία για τη συμπλήρωση *in vitro* και ανθρώπινων μελετών [74].

1.1.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της λοίμωξης από τον ιό DENV

Παρά την εκτενή έρευνα πάνω στις ασθένειες των αρμποϊών, δεν υπάρχει κάποια εγκεκριμένη εξειδικευμένη θεραπεία για καμία από τις ασθένειες που προκαλούνται από ιούς του γένους *Flavivirus*. Η αντιμετώπιση των σοβαρών περιστατικών περιορίζεται στην υποστηρικτική θεραπεία, που περιλαμβάνει ενδοφλέβια χορήγηση υγρών, διαμονή σε νοσοκομεία, αναπνευστική υποστήριξη και πρόληψη δευτερογενών λοιμώξεων [75]. Ωστόσο, η κατανόηση του κύκλου ζωής αυτών των ιών και η ανάπτυξη συστημάτων μελέτης τους έχει δώσει σημαντική ώθηση στην αναζήτηση νέων αναστολέων για τους ιούς αυτούς.

Μέχρι σήμερα, μόνο 4 μικρομοριακά φάρμακα έναντι του DENV έχουν προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές Φάσης I ή II: τα chloroquine, celgosivir, balapiravir και UV-4B9. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν προχωρήσει λόγω μειωμένης ασφάλειας ή αποτελεσματικότητας, με μόνο μία κλινική δοκιμή να έχει ακόμα αβέβαιο αποτέλεσμα [76]. Επομένως, η ανακάλυψη νέων αναστολέων παραμένει σημαντική ανάγκη. Προς αυτή την κατεύθυνση, οι μελέτες στοχεύουν τις ιϊκές πρωτεΐνες NS3/NS2B πρωτεάση, NS3 ελικάση, πρωτεΐνη E, NS5 μεθυλτρανσφεράση και πολυμεράση, καθώς και πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του DENV.

Συγκεκριμένα, για την παρεμπόδιση της εισόδου του ιού, έχουν χρησιμοποιηθεί πεπτιδία που μιμούνται την πρωτεΐνη E, ωστόσο έχουν το μειονέκτημα της ενδοφλέβιας χορήγησης [77]. Μικρομοριακοί αναστολείς έχει δείχθει να προσδένονται στο διμερές της E πριν την είσοδο του ιού στο κύτταρο, μειώνοντας δραστικά την ιϊκή μολυσματικότητα [78]. Έναντι της NS3/NS2B πρωτεάσης, έχουν αναπτυχθεί πεπτιδικοί και μη πεπτιδικοί αναστολείς. Στους μη πεπτιδικούς, στοχεύεται το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης, ωστόσο έχουν αναφερθεί και αναστολείς που δεσμεύονται σε αλλοστερικές θέσεις, ή στην NS2B [76, 79-82]. Έχουν επίσης βρεθεί αναστολείς που στοχεύουν ειδικά την NS5 μεθυλτρανσφεράση [83] και την NS3 ελικάση [84]. Για την NS5 πολυμεράση έχουν βρεθεί νουκλεοσιδικοί και μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς [85, 86]. Τέλος, εγκεκριμένα αντι-ιϊκά ευρέος φάσματος, όπως η ριμπαβιρίνη, έχει αναφερθεί να καταστέλλει την αντιγραφή του

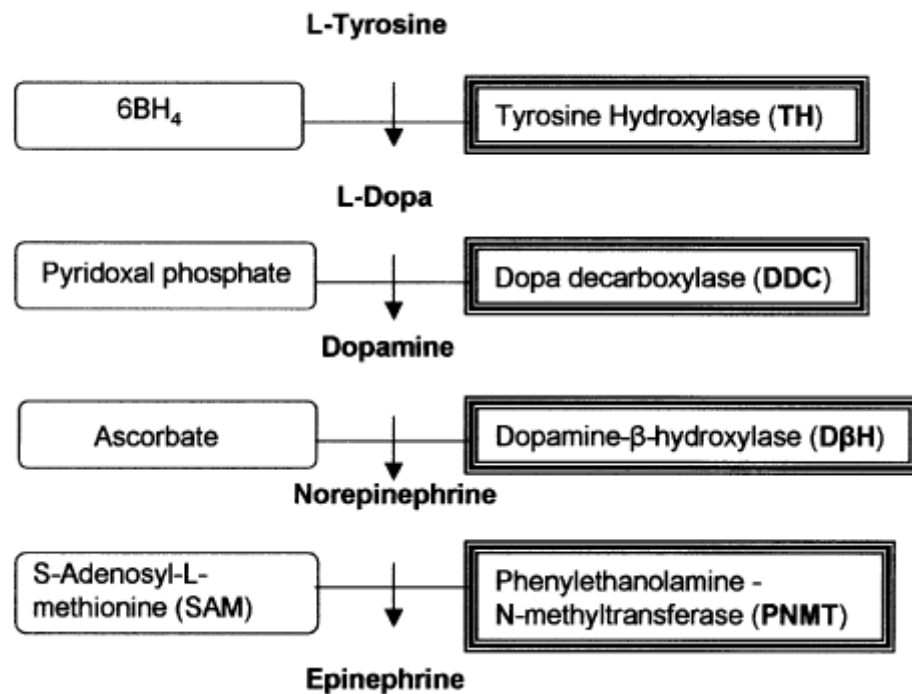
DENV *in vitro* [87], ενώ προϊόντα από φυσικές πηγές έχουν αντι-ϊική δράση έναντι του DENV [88].

1.2. TO ENZYMO DDC (L-DOPA DECARBOXYLASE)

1.2.1. Γενικά στοιχεία για την L-Dopa αποκαρβοξυλάση

Η L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη αποκαρβοξυλάση (L-Dopa αποκαρβοξυλάση, L-Dopa decarboxylase ή DDC), είναι ένα εξαρτώμενο από 5-φωσφορική πυριδοξάλη (Pyridoxal 5-phosphate, PLP) ένζυμο, το οποίο καταλύει την μετατροπή της L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνης (L-Dopa) σε ντοπαμίνη. Η DDC θεωρείται ότι έχει σημαντικό καταλυτικό ρόλο στο βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών [89].

Η μεταβολική αυτή οδός περιλαμβάνει (**Εικ.11**): α) υδροξυλίωση της τυροσίνης σε L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη (L-Dopa) από το ένζυμο υδροξυλάση της τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase ή TH) που είναι το καθοριστικό ένζυμο (rate-limiting) στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης της ντοπαμίνης, β) αποκαρβοξυλίωση της L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνης σε ντοπαμίνη από την αποκαρβοξυλάση της L-Dopa (L-Dopa Decarboxylase ή DDC), γ) υδροξυλίωση της ντοπαμίνης σε νορεπινεφρίνη (ή νοραδρεναλίνη) από την β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (Dopamine β-hydroxylase ή DBH) και δ) μετατροπή της νορεπινεφρίνης σε επινεφρίνη (ή αδρεναλίνη) από το ένζυμο φαινυλαιθανολαμιν-N-μέθυλο-τρανφεράση (phenylethanolamine N-methyltransferase ή PNMT). Η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η επινεφρίνη ανήκουν χημικά στις κατεχολαμίνες.



Εικόνα 11: Ο καταρράκτης βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Η υδροξυλάση τυροσίνης (TH) απαιτεί 6BH₄ (6R-L-ερυθρο-5,6,7,8 τετραϋδοπτερίνη) ως απαραίτητο συμπράγοντα για τη βιοσύνθεση της της L-Dopa η οποία, παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης, μετατρέπεται από την L-Dopa Decarboxylase (DDC) σε ντοπαμίνη. Αυτός ο μεταβολίτης χρησιμοποιείται από τη β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (DβH) παρουσία ασκορβικού για να σχηματιστεί νορεπινεφρίνη. Η μεθυλτρανσφεράση N φαινυλαιθανολαμίνης (Phenylethanolamine N- methyltransferase- PNMT) καταλύει ειδικά την αντίδραση προς επινεφρίνη παρουσία της S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνης (SAM). [90]

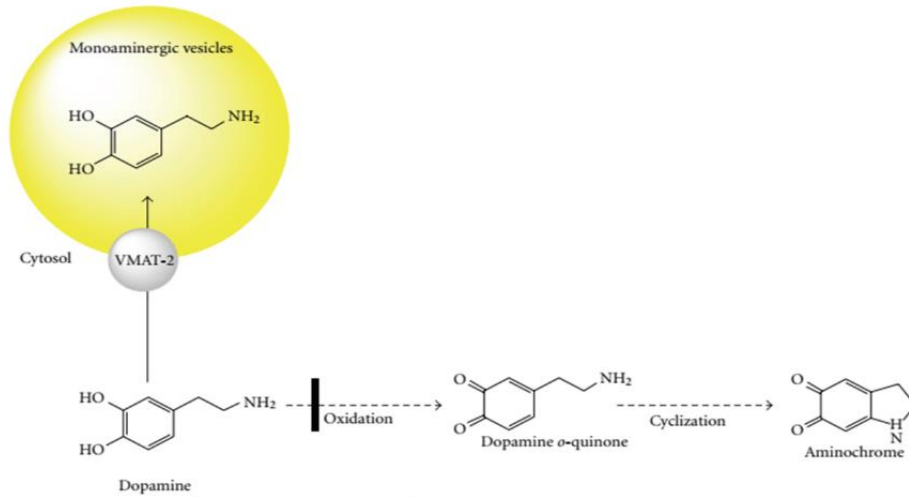
Το ίδιο ένζυμο συμμετέχει και στη βιοσύνθεση της 5-υδροξυ-τροπταμίνης (ή σεροτονίνης, serotonin ή 5-HT) [91, 92]. Η μεταβολική αυτή οδός περιλαμβάνει: α) υδροξυλίωση της τρυπτοφάνης σε 5-υδροξυ-τροπτοφάνη από το ένζυμο υδροξυλάση της τρυπτοφάνης (Tryptophan Hydroxylase) και β) αποκαρβοξυλίωση της 5-υδροξυ-τροπτοφάνης σε 5-υδροξυ-τροπταμίνη από το ένζυμο L-Dopa αποκαρβοξυλάση.

Στα θηλαστικά, το ένζυμο που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa θεωρείται επιπλέον το μόνο ένζυμο που εμπλέκεται στην παραγωγή αμινών μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των αρωματικών L-αμινοξέων L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη και L-τρυπτοφάνη. Οι παραγόμενες αμίνες («αμίνες ίχνη», trace amines) θεωρούνται ενδογενείς παράγοντες ρύθμισης της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) [93-95].

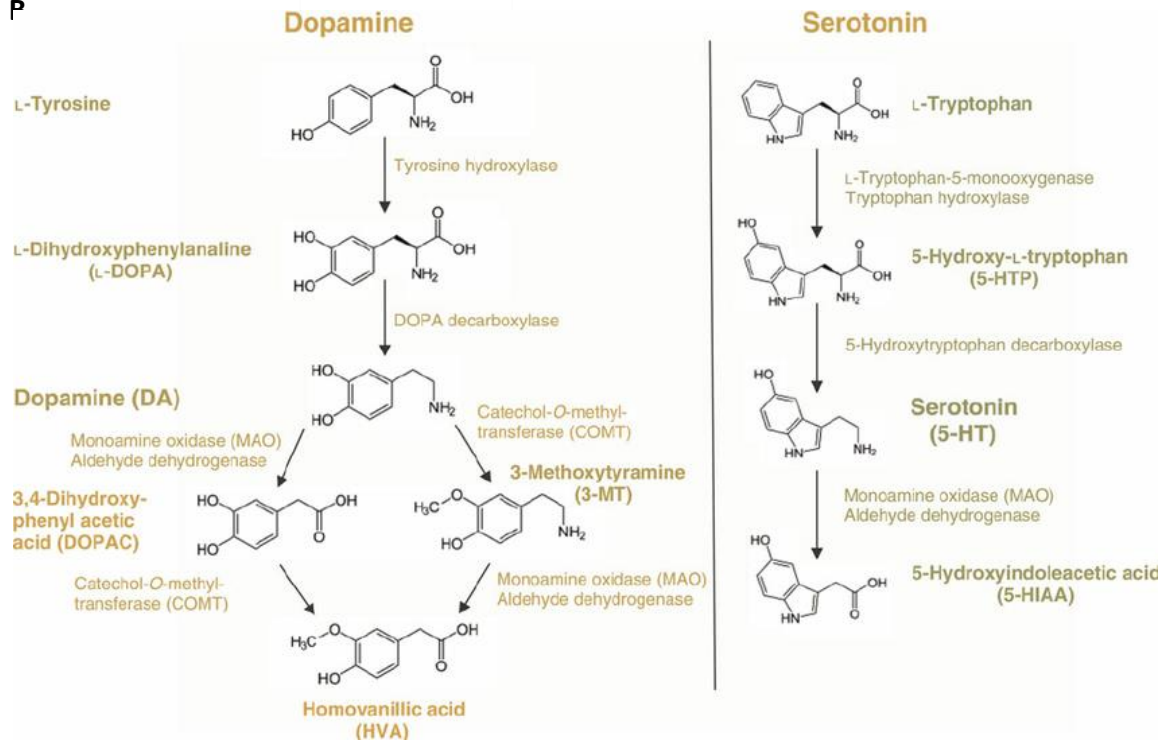
Εκτός των σειριακών αντιδράσεων που αναφέρθηκαν ήδη, τα μονοπάτια σύνθεσης και μεταβολισμού των βιογενών αμινών περιλαμβάνουν τις εκατέρωθεν αντιδράσεις οξειδωσής τους. Τα πρωτόνια από την υδροξυλομάδα της ντοπαμίνης αποσπώνται όταν η ντοπαμίνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε φυσιολογικό pH. Ωστόσο, τα πρωτόνια αυτά είναι σθεναρά προσδεμένα στην ομάδα υδροξυλίου μόνο εφόσον η ντοπαμίνη βρεθεί στο εσωτερικό των συναπτικών κυστιδίων, όπου το pH είναι 2 έως 2,4 μονάδες χαμηλότερο από αυτό του κυτταροπλάσματος [96]. Για τη μεταφορά της ντοπαμίνης στο εσωτερικό του κυστιδίου είναι υπεύθυνος ο μεταφορέας αμινών (vesicular monoaminergic transporter, VMAT) (αναλυτικότερα βλ. 1.3.2). Επομένως, με την απομάκρυνση των πρωτονίων από τις αντίστοιχες υδροξυλομάδες, η κυτταροπλασματική ντοπαμίνη οξειδώνεται αυθόρμητα προς ο-κινόνη ντοπαμίνης, μόριο το οποίο δεν είναι σταθερό στο φυσιολογικό pH του κυτταροπλάσματος και έτσι κυκλοποιείται σχηματίζοντας το τοξικό αμινόχρωμα (**Εικ. 12A**) [97]. Ο VMAT με την απομάκρυνση της κυτταροπλασματικής ντοπαμίνης αποτρέπει την οξειδωση της προς αμινόχρωμα. Τον ίδιο ρόλο κατέχουν και τα ένζυμα οξειδάση μονοαμινών (monoamino oxidase, MAO) και ορθο-μεθυλο-τρανσφεράση κατεχολαμινών (catechol ortho-methyl transferase, COMT). Αναλυτικότερα, οι MAO αποικοδομούν την περίσσεια της ντοπαμίνης καταλύοντας την οξειδωτική απαμίνωση της (αναλυτικότερα βλ. 1.3.1) προς το σχηματισμό 3,4-διυδροξυφαινυλαλδεΐδης η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC) από την αλδεΐδική αφυδρογονάση. Το DOPAC μετατρέπεται σε ομοβανιλινικό οξύ (HVA) από τη COMT. Επιπλέον, η ντοπαμίνη μεθυλιώνεται από τη COMT προς 3-μεθοξυτυραμίνη, η οποία μετατρέπεται τελικά σε ομοβανιλινικό οξύ (HVA) από τη συνδυαστική δράση των MAO και COMT. Αντίστοιχα, τα δύο αυτά ένζυμα είναι υπεύθυνα για την μετατροπή της ελεύθερης

σεροτονίνης σε 5-υδροξυ-ινδολοξικό οξύ (5-Hydroxyindoleacetic Acid, 5-HIAA) (Εικ. 12B).

A.



P



Εικόνα 12:

A. Με την απομάκρυνση των πρωτονίων από τις αντίστοιχες υδροξυλομάδες, η κυτταροπλασματική ντοπαμίνη οξειδώνεται αυθόρμητα προς ο-κινόνη ντοπαμίνης, μόριο το οποίο δεν είναι σταθερό στο φυσιολογικό pH του κυτταροπλάσματος και έτσι κυκλοποιείται σχηματίζοντας το τοξικό αμινόχρωμα. Αναπροσαρμοσμένο από [98].

B. Μονοπάτια σύνθεσης και μεταβολισμού της (αριστερά) ντοπαμίνης (DA) και (δεξιά) σεροτονίνης (5-HT). Τα μονοπάτια αυτά υποδεικνύουν πολλαπλά σημεία στα οποία η ντοπαμινεργική και σεροτονεργική λειτουργία δύναται να επηρεαστεί από πολλαπλούς κυτταρικούς παράγοντες [99].

1.2.2. Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά

Στα θηλαστικά, η DDC εντοπίζεται τόσο σε ιστούς νευρικής προέλευσης, όπου συμμετέχει στη βιοσύνθεση των μονοάμινο νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνη και σεροτονίνη [100] όσο και σε ιστούς μη νευρικής προέλευσης, όπου φαίνεται να έχει ενεργότητα μη ειδικής αποκαρβοξυλάσης και μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστος ο βιολογικός της ρόλος [101]

1.2.2.1. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ

Οι μελέτες για τον εντοπισμό του ενζύμου στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αφορούν κυρίως σε εγκέφαλο ανθρώπου και αρουραίου. Η παρουσία της DDC σε ντοπαμινεργικούς και σεροτονεργικούς νευρώνες έχει επιβεβαιωθεί με διάφορες πειραματικές μεθόδους όπως μέτρηση ενεργότητας [102], *in situ* υβριδοποίηση [103] και ανοσοϊστοχημεία [104]. Η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη στα θηλαστικά διαδραματίζουν ρόλο σε μια σειρά φυσιολογικές διεργασίες. Η δράση της σεροτονίνης σχετίζεται με τη διάθεση, τον πόνο, τον ύπνο, τη μάθηση και τη μνήμη, ενώ η ντοπαμίνη, μεταξύ άλλων, φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς παθογένεσης ψυχιατρικών καταστάσεων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η σχιζοφρένεια [105], η νόσος του Parkinson [106] καθώς και ο εθισμός σε ναρκωτικές ουσίες, όπως η κοκαΐνη [107].

1.2.2.2. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης σε περιφερικούς ιστούς

Υψηλή ενεργότητα της DDC έχει εντοπιστεί περιφερικά και συγκεκριμένα σε ήπαρ, πάγκρεας, νεφρό, πνεύμονες, σπλήνα, στομάχι, σιελογόνους αδένες, καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν αιμοφόρα αγγεία, όπου φαίνεται να χρησιμοποιεί ως υποστρώματα την L-Dopa και την 5-HTP [108-110]. Το ένζυμο εντοπίζεται σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα [111]. Πολλά από αυτά τα κύτταρα της περιφέρειας που περιέχουν DDC ανήκουν στο σύστημα Πρόσληψης και Αποκαρβοξυλίωσης Πρόδρομων Αμινών (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation system, APUD) [112]. Αυτά τα κύτταρα εντοπίζονται στο έντερο και άλλα όργανα και παράγουν πεπτιδικές ορμόνες και αμίνες. Προσλαμβάνουν πρόδρομα μόρια βιογενών αμινών, όπως την L-Dopa και την 5-HTP, τις αποκαρβοξυλιώνουν και αποθηκεύουν τα προϊόντα σε εκκριτικά κυστίδια. Η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία της DDC και ενός μεταφορέα μονοαμινών, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά της ντοπαμίνης και τη σεροτονίνης σε εκκριτικά κυστίδια [113].

Η υψηλότερη ενεργότητα και παρουσία του ενζύμου, σε σχέση με τους υπόλοιπους περιφερικούς ιστούς, εντοπίζεται στο ήπαρ και στον νεφρό, ωστόσο η φυσιολογική σημασία του ενζύμου σε αυτούς τους ιστούς δεν είναι γνωστή [110].

1.2.3. Χαρακτηριστικά του ενζύμου

1.2.3.1. Προσδιορισμός της μοριακής μάζας του ενζύμου

Γενικά υπήρξε μία σύγχυση στον προσδιορισμό της μοριακής μάζας του ενζύμου και μία σειρά από αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αρχικά, η DDC που απομονώθηκε από νεφρό χοίρου θεωρήθηκε ότι αποτελείται από τρεις υπομονάδες με μοριακές μάζες 57.000, 40.000 και 21.000 Da [92]. Δεδομένα με τα οποία συμφώνησαν και άλλοι ερευνητές [114]. Δύο διαφορετικές ομάδες ωστόσο [91, 115], μελετώντας το ένζυμο από νεφρό χοίρου, θεώρησαν ότι αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακής

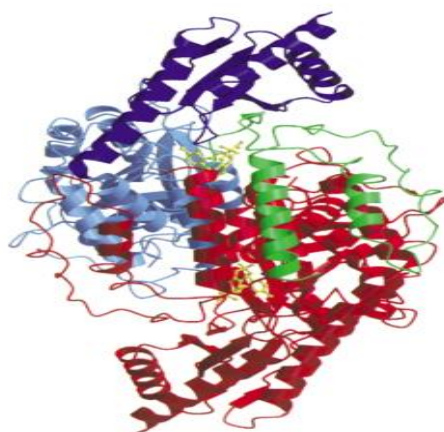
μάζας 50.000 και 40.000 Da. Νεότερες εργασίες υποστηρίζουν ότι το μόριο είναι ομοδιμερές, καθώς το ένζυμο που απομονώθηκε από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [116, 117] και νεφρό [118] παρουσίασε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μια πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα περίπου 50.000 Da. Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε σε ένζυμο που απομονώθηκε από ήπαρ και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου [119] και η μοριακή μάζα της υπομονάδας προσδιορίστηκε στα 50.000 Da. Απομόνωση της DDC από εγκέφαλο βοός με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος, επίσης, παρουσίασε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μία πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα 50.000 Da [120]. Η μοριακή μάζα της υπομονάδας του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό αρουραίου προσδιορίστηκε στα 48.000 Da [121], ενώ της υπομονάδας του ενζύμου που απομονώθηκε από ιστούς βοός προσδιορίστηκε στα 56.000 Da [122] και στα 50.000 Da [123].

Άλλοι ερευνητές [124, 125], αναλύοντας την αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό χοίρου, υπολόγισαν τη μοριακή μάζα της υπομονάδας στα 53.858 Da και 54.000 Da, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη μοριακή μάζα που αναμένεται από την αμινοξική αλληλουχία που δίνουν τα cDNA που έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς.

Η DDC σήμερα θεωρείται ότι αποτελεί ένα ομοδιμερές μόριο με μοριακή μάζα υπομονάδας 50.000 - 55.000 Da (μοριακή μάζα ολοενζύμου 100.000 - 110.000 Da). Τα παλαιότερα αποτελέσματα που οδήγησαν σε ασυμφωνία έχουν αποδοθεί σε ατελή καθαρισμό ή/και παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης του ενζύμου. Μελέτες κρυσταλλογραφίας σε ανασυνδυασμένη ενζυμική πρωτεΐνη επιβεβαίωσαν τη συγκρότηση του ενζύμου ως ομοδιμερές και επέτρεψαν την περαιτέρω μελέτη των δομικών του χαρακτηριστικών [126]. Συμπερασματικά το ένζυμο DDC είναι δομικά και λειτουργικά διμερές ενώ το μονομερές της αποτελεί την ανενεργή μορφή του ενζύμου [127].

1.2.3.2. Δομή του ενζύμου

Δομικά, η DDC είναι ένα α2-διμερές και ανήκει στις α-αμινομεταφοράσες (τρανσαμινάσες) και συγκεκριμένα στις α-αποκαρβοξυλάσες. Η χημεία καθώς και ο μηχανισμός αντίδρασης των εν λόγω ενζύμων εξαρτώνται από τις χημικές ιδιότητες του συνενζύμου 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal-5'-phosphate, PLP) [128]. Κάθε μονομερές, αποτελείται από τρεις διακριτές επικράτειες (**Εικ. 13**): τη μεγάλη επικράτεια που περιλαμβάνει το σημείο πρόσδεσης στο PLP, τη μικρή επικράτεια στο καρβοξυτελικό άκρο καθώς και μία επικράτεια στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 1-85) που είναι χαρακτηριστική μόνο για την DDC.



Εικόνα 13: 3D σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής δομής της DDC. Το ένα μονομερές είναι κόκκινο, ενώ το άλλο είναι πράσινο (N-τελική επικράτεια), γαλάζιο (μεγάλη επικράτεια) και μπλε (μικρή επικράτεια). Ο συμπαραγοντας PLP εμφανίζεται με κίτρινο [126].

1.2.3.3. Υποστρωματική εξειδίκευση του ενζύμου

Σύμφωνα με τα δεδομένα αρκετών ερευνητικών ομάδων, το ένζυμο που απομονώνεται από ιστούς θηλαστικών αποκαρβοξυλιώνει τόσο την L-Dopa, όσο και την 5-υδροξυ-τροπτοφάνη, παράγοντας ντοπαμίνη και σεροτονίνη, αντίστοιχα [91, 129].

Μέχρι και σήμερα η επιστημονική κοινότητα διαφωνεί σχετικά με τη μοναδικότητα του ενζύμου που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa και την 5-HTP. Πολλοί ερευνητές

υποστηρίζουν ότι είναι διαφορετικά τα ένζυμα που καταλύουν την αποκαρβοξυλίωση των δύο υποστρωμάτων. Σε πειράματα διαπίδωσης ομογενοποιημένου εγκεφάλου που έγιναν παρουσία και απουσία πυριδοξίνης, ενώ η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της 5-HTP χάνεται ολοκληρωτικά ή σχεδόν ολοκληρωτικά, η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa παραμένει αμετάβλητη. Αυτό υποδεικνύει μία διαφορετική ευαισθησία στην έλλειψη πυριδοξίνης [130]. Αντιθέτως, άλλη ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι στους ίδιους ιστούς η ενεργότητα της L-Dopa αποκαρβοξυλίωσης ήταν πιο επιρρεπής στην έλλειψη 5-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) από ό,τι η ενεργότητα της 5-HTP αποκαρβοξυλίωσης [131]. Εάν ισχύει η υπόθεση της ύπαρξης ενός μοναδικού ενζύμου, τότε η αναλογία των ενζυμικών ενεργοτήτων ως προς την L-Dopa και την 5-HTP θα έπρεπε να είναι παρεμφερής σε όλους τους ιστούς. Επιπρόσθετα, στον εγκέφαλο η ενεργότητα του ενζύμου ως προς την αποκαρβοξυλίωση της 5-HTP είναι εξίσου κατανεμημένη μεταξύ του διαλυτού και σωματιδιακού (particulate) κλάσματος, σε αντίθεση με την αποκαρβοξυλίωση ως προς την L-Dopa, η οποία είναι κυρίως διαλυτή [132]. Αυτή η ανόμοια υποκυτταρική κατανομή της ενεργότητας αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και 5-HTP επιβεβαιώνει την ύπαρξη ισοενζύμων της DDC στον εγκέφαλο [131, 133].

Στο παρελθόν έχει προταθεί, σε αντίθεση με τις παραπάνω παρατηρήσεις, ότι υπάρχει ένα μοναδικό ένζυμο με ένα μόνο καταλυτικό κέντρο, αλλά με διακριτές θέσεις δέσμευσης των δύο υποστρωμάτων [134]. Επιπλέον, τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς, όπως νεφρό χοίρου [91], νεφρό ινδικού χοιριδίου [135], νεφρό αρουραίου [136], ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [129] και εγκέφαλο βοός [120] μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν και τα δύο αυτά υποστρώματα.

Έμμεσες ενδείξεις που υποστήριζαν περαιτέρω την υπόθεση του «μοναδικού ενζύμου» προέρχονται από *in vivo* μελέτες δύο ερευνητικών ομάδων [137, 138]. Οι Dairman *et al.* (1975) έδειξαν ότι στον εγκέφαλο γάτας, αγωγή με 6-υδροξυνοτοπαμίνη, φαρμακευτική ουσία η οποία καταστρέφει επιλεκτικά κατεχολαμινεργικούς νευρώνες, έχει ως αποτέλεσμα την σχετικά αντίστοιχη μείωση των ενεργοτήτων αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP. Αντίστοιχη απώλεια των ενζυμικών ενεργοτήτων παρατηρήθηκε, επίσης, στο νωτιαίο μυελό αρουραίων που υποβλήθηκαν σε ενδοεγκεφαλική αγωγή με την σεροτονική νευροτοξίνη 5,7-διυδροξυ-τροπταμίνη [138].

Ενδείξεις που υποστήριζαν περαιτέρω την ύπαρξη ενός μοναδικού ενζύμου, προέρχονται από έρευνες χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας. Πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση cDNA ιχνηθέτη συμπληρωματικού ως προς το mRNA της DDC του επινεφριδίου βοός, υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μοναδικού mRNA στο ήπαρ, νεφρό και επινεφρίδιο βοός, στο ήπαρ, εγκέφαλο και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου, καθώς και σε ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [139]. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη DDC αποκαρβοξυλιώνει τόσο την 5-HTP σε σεροτονίνη όσο και την L-Dopa σε ντοπαμίνη, που αποτελεί ένδειξη ότι ένα μοναδικό ένζυμο μπορεί να αποκαρβοξυλιώνει και τα δύο υποστρώματα [140]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για το ανασυνδυασμένο ένζυμο από αρουραίο [141]. Η ανάλυση με τη χρήση ιχνηθετών που αντιστοιχούν στην πλήρη κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA της DDC από φαιοχρωμοκύτωμα (S1 mapping analysis), έδειξε ότι η πρωτοταγής αλληλουχία της DDC σε νευρικούς και μη-νευρικούς ιστούς είναι πανομοιότυπη [142]. Το πλήρους μήκους ανθρώπινο cDNA που κωδικοποιεί τη DDC απομονώθηκε από ανθρώπινο πλακούντα και κλωνοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένου ανθρώπινου ενζύμου [143]. Η ενεργότητα της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης DDC ως προς την L-Dopa αναστέλλεται από την 5-HTP, που αποτελεί ένδειξη ότι η ανασυνδυασμένη DDC την χρησιμοποιεί ως εναλλακτικό υπόστρωμα. Επομένως, τα δεδομένα αυτά αποτελούν σαφείς ενδείξεις ότι η ενζυμική αποκαρβοξυλίωση και των δύο υποστρωμάτων πραγματοποιείται από μία πρωτεΐνη που εκφράζεται από ένα γονίδιο και ένα μήνυμα.

1.2.3.4. Χημικές ουσίες που επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου

Η ενεργότητα της DDC αναστέλλεται από ουσίες όπως η καρβιντόπα (carbidopa), η οποία χορηγείται ευρέως παράλληλα με την L-Dopa κατά της ασθένειας του Parkinson, το L-3-(3,4 διυδροξυφαινυλ)-2-υδραζινο-μεθυλο-προπιονικό οξύ (α -MDH) που είναι συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου [144], η 3-υδροξυ-βενζυλο-υδραζίνη (NSD-1015) [145], η α -μονο-φθορο-μέθυλ-Dopa (MFMD) [146], η ουσία βενσεραζίδη (benzerazide), η οποία διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [147]

και η α-μεθυλ-Dora (AMD) [148]. Τελευταία έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες από πράσινο τσάι αναστέλλουν την DDC με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο επώασης και από τη συγκέντρωσή τους [149].

1.2.4. Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dora αποκαρβοξυλάσης

Η πλήρης αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dora αποκαρβοξυλάσης έχει καθοριστεί από νευρικού τύπου ιστό, και συγκεκριμένα φαιοχρωμοκύτωμα [150], καθώς και από μη-νευρικού τύπου ιστό, από ανθρώπινο ήπαρ [116]. Το ανθρώπινο γονίδιο της DDC αποτελείται από 15 εξώνια και 14 ενδιάμεσα εσώνια ενώ καταλαμβάνει έκταση 85 kb [150]. Υπάρχει σε ένα αντίγραφο στο απλοειδές γονιδίωμα και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 [151] στη χρωμοσωμική ζώνη 7p12.1 – p12.3, κοντά στην περιοχή που εδράζεται το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Η θέση αυτή έχει επιβεβαιωθεί με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης [152], ενώ οι Scherer *et al.* (1992) [153], με αντίστοιχα πειράματα, εντόπισαν το γονίδιο στο χρωμόσωμα 7, στη θέση p11 [153]. Το μήκος των εξωνίων κυμαίνεται από 20 bp ως 400 bp, ενώ το μήκος των εσωνίων από 1 kb ως 17,7 kb.

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

Το ανθρώπινο γονίδιο που εκφράζει την DDC έχει απομονωθεί, κλωνοποιηθεί και η αλληλουχία του έχει προσδιοριστεί πλήρως [154]. Όπως αναφέρθηκε, αποτελείται από 15 εξώνια, όπου το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο δεύτερο εξώνιο, ενώ το σημείο λήξης στο δέκατο τέταρτο εξώνιο. Στο συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίστηκαν ορισμένες διαφορές στην 5' UTR (μη μεταφραζόμενη περιοχή) [116], οι οποίες φαίνεται να προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Η εναλλακτική αυτή συρραφή επάγεται από την επίδραση διαφορετικών υποκινητών και οδηγεί στη δημιουργία δύο εναλλακτικών μεταγράφων. Το πρώτο εξώνιο διαφέρει ανάλογα με τον ιστό και διαφοροποιεί το μετάγραφο του γονιδίου σε μη-νευρικού τύπου (εναλλακτικό μετάγραφο 1) και νευρικού τύπου (εναλλακτικό μετάγραφο 2) [116].

Συγκεκριμένα, το νευρικού τύπου μετάγραφο φέρει ως πρώτο εξώνιο το N1, που απέχει 17,7 kb από το δεύτερο εξώνιο, ενώ το μη-νευρικού τύπου μετάγραφο φέρει ως πρώτο εξώνιο το L1, που απέχει 22 kb από το δεύτερο εξώνιο. Το N1 έχει μήκος 58 bp, ενώ το L1 έχει μήκος 173 bp. Ο μηχανισμός αυτός είχεδειχθεί ότι είναι υπεύθυνος για την ιστοειδική έκφραση του γονιδίου, με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης [155]. Ωστόσο, το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο εξώνιο 2 και επομένως τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη [116].

Έχει θεωρηθεί ότι η κατανομή των δύο τύπων mRNA, λόγω εναλλακτικής συρραφής στην 5'UTR και χρήση διαφορετικού υποκινητή, ακολουθεί ένα πρότυπο ιστοειδικότητας. Ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει το γεγονός ότι στο νεφρό και στον πλακούντα συνυπάρχουν τα δύο είδη mRNA, ενώ η αιτιολογία αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμα γνωστή [116, 143]. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι σε περιφερικά ανθρώπινα λευκοκύτταρα [156] καθώς και στο ήπαρ [157] εκφράζονται τα νευρικού και μη νευρικού τύπου μετάγραφα της DDC. Οι παρατηρήσεις αυτές δημιουργούν ερωτήματα για τη λειτουργική σημασία της ταυτόχρονης έκφρασης των δύο μεταγράφων, ενώ φαίνεται ότι η έκφραση των δύο τύπων mRNA της DDC δεν είναι αλληλοαποκλειόμενη [143, 156, 158, 159], όπως εθεωρείτο.

Εκτεταμένες μελέτες πάνω στο ανθρώπινο γονίδιο της DDC αποκάλυψαν πως γίνεται εναλλακτική συρραφή και εντός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου. Μέχρι πρόσφατα, εκτός από τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα που προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή στο 5' UTR, είχαν καταγραφεί επιπλέον πέντε που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος στην κωδικοποιούσα περιοχή. Οι O'Malley et al (1995) [160] ανέφεραν ότι δύο ισομορφές ενζύμου μπορούν να δημιουργηθούν στον ανθρώπινο οργανισμό με εναλλακτική συρραφή εντός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου: μία που προκύπτει από το πλήρες μετάγραφο, έχει ενζυμική ενεργότητα ως προς την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa και της 5-HTP και συμβολίζεται ως DDC₄₈₀, και μία ισομορφή που προκύπτει από τη μετάφραση του μεταγράφου που του λείπει το εξώνιο 3, δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα και συμβολίζεται ως DDC₄₄₂, όπου 480 και 442 καταδεικνύουν τον αριθμό των αμινοξέων

των δύο αυτών ισομορφών του ενζύμου, αντιστοίχως [160]. Οι Chang *et al.* (1996) [161] αναφέρουν τον εντοπισμό δύο τύπων μεταγράφων της DDC σε νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς. Το ένα μετάγραφο κωδικοποιεί το πλήρους μήκους ένζυμο, ενώ το μικρότερο μετάγραφο, από το οποίο έχει απαλειφθεί το εξώνιο 3, οδηγεί στη σύνθεση μίας ανενεργής ισομορφής, λόγω διαφορετικής υποστρωματικής εξειδίκευσης ή συγγένειας για συμπαράγοντα [161]. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δεν επαληθεύουν την παρατήρηση αυτή, καθώς αποκάλυψαν την έκφραση του νευρικού τύπου μεταγράφου της DDC στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 (human histiocyte lymphoma), από την οποία απουσίαζε το εξώνιο 3 και κωδικοποιούσε την παραγωγή ενεργής πρωτεϊνικής ισομορφής. Η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε στα 4,2 mUnits/mg [162]. Το νευρικού τύπου μετάγραφο από το οποίο απουσιάζει το εξώνιο 3 (εναλλακτικό μετάγραφο 3) έχει εντοπιστεί και στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα και ο ρόλος του πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανοσοβιολογικής απόκρισης [156]. Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος έχουν εντοπιστεί και στο πάγκρεας και έχουν συσχετιστεί με το Αυτοάνοσο Πολυενδοκρινικό Σύνδρομο τύπου I (APS I) [163].

Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκαν τα εναλλακτικά μετάγραφα 4 (απουσιάζει το εξώνιο 6), 5 (απουσιάζουν τα εξώνια 3 και 4) και 6 (απουσιάζουν τα εξώνια 5 και 6) [164]. Ακολούθησε η ανακάλυψη ενός μικρότερου μεταγράφου του ενζύμου στον ανθρώπινο πλακούντα, μήκους 1,8 kb. Κλωνοποίηση αυτού του εναλλακτικού μεταγράφου έδειξε ότι δεν περιέχει τα εξώνια 10 έως 15, ενώ περιλαμβάνει ένα εναλλακτικό εξώνιο 10 που εντοπίζεται μέσα στο εσώνιο 9. Το μετάγραφο αυτό περιέχει το νευρικού τύπου εξώνιο 1 και κωδικοποιεί ένα μικρότερο πολυπεπτίδιο από τη DDC, 338 αμινοξέων, εκ των οποίων τα πρώτα 315 είναι ταυτόσημα με αυτά της αποκαρβοξυλάσης της L-Dopa. Η ισομορφή αυτή (εναλλακτικό μετάγραφο 7) ονομάστηκε Alt-DDC και εντοπίστηκε σε ανθρώπινο νεφρό, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα ενεργότητας [158]. Επιπλέον, πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ύπαρξη 8 νέων εναλλακτικών μεταγράφων που περιλαμβάνουν το εξώνιο L1 (μετάγραφο 8-15) και 6 νέων εναλλακτικών μεταγράφων που περιλαμβάνουν το εξώνιο N1 (μετάγραφο 16-21), τα οποία διαφέρουν μόνο στο 5' UTR και επομένως κωδικοποιούν για την νέα ίδια ισομορφή του ενζύμου [164].

Μία πληθώρα παραγόντων έχουν δείχθει ότι μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του mRNA της DDC, μολονότι δεν είναι γνωστό ακόμα εάν αυτή η ιδιότητά τους είναι ιστοειδική. Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της DDC επιτελείται από αναστολείς των MAO (Monoamine oxidase inhibitors) [165]. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς MAO τύπου Β, όπως το (-)-διπρενύλιο, η παργουλίνη και ο MDL 72,974 A [165, 166], η διξαμεθασόνη [167], η ιντερλευκίνη-1β και η προσταγλανδίνη E2 (PGE2) [168], ο NSD-1015 [169], ανταγωνιστές των ντοπαμινεργικών υποδοχέων [170], η διζοκιλπίνη [171], η ρεσερπίνη [172], και η αντι-ϊική ουσία αμανταδίνη [173] φαίνεται να αυξάνουν τα επίπεδα του mRNA της DDC. Από την άλλη πλευρά, οι αμφεταμίνες και η βιγκαμπατρίνη [174], όπως και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) [175] αναστέλλουν την έκφραση του mRNA της DDC. Επιπλέον, αναστολείς της DDC [176], ανάμεσα τους και η carbidopa [157], φαίνεται να αυξάνουν τα επίπεδα mRNA του ενζύμου αλλά και των πρωτεϊνικών μορφών όπως αυτές εμφανίζονται σε ανοσοσύτρωμα western.

Ως κύριος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της DDC έχει προταθεί η φωσφορυλίωση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε από μια σειρά παρατηρήσεων. Η πρώτη παρατήρηση αφορά στον εντοπισμό στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μιας σειράς μοτίβων φωσφορυλίωσης από cAMP-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (PKA), από πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), από ασβέστιο-καλμοντουλίνη εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες II (Ca-CM PK II) και από κατευθυνόμενες από προλίνη πρωτεϊνικές κινάσες (proline-directed protein kinases) [177, 178]. Επίσης, έχει δείχθει ότι αύξηση της φωσφορυλίωσης του ενζύμου προκαλεί αύξηση της ενζυμικής του ενεργότητας, ενώ αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν πως η PKA φωσφορυλιώνει περισσότερες από μία θέσεις της DDC [179]. Χορήγηση φορσκολίνης (Forskoline), που ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση και αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP), καθώς και χορήγηση 8-Bromo-cAMP, ενός ενεργοποιητή της PKA, αυξάνουν την ενεργότητα της DDC στον εγκέφαλο ποντικού [180]. Επόμενες μελέτες παρουσίασαν άμεσες ενδείξεις ότι η PKA φωσφορυλιώνει και ακολούθως ενεργοποιεί την DDC που εντοπίζεται στο ραβδωτό σώμα και τον μεσεγκέφαλο [181]. Επίσης, χορήγηση φορβολικών εστέρων που

ενεργοποιούν την PKC, όπως το φορβολ 12-μυριστικό 13-οξικό (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), αυξάνουν παροδικά τη δραστικότητα του ενζύμου [182].

Η φωσφορυλίωση της PKA, που προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της DDC, ρυθμίζεται από τους D2 προσυναπτικούς υποδοχείς της ντοπαμίνης. Όταν ανταγωνιστές δεσμευτούν στους D2 υποδοχείς, επάγεται άρση της καταστολής της αδενυλικής κυκλάσης και αύξηση των επιπέδων cAMP. Το cAMP προκαλεί τη φωσφορυλίωση της PKA που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την DDC αυξάνοντας την ενεργότητά της [183].

1.2.5. Ο ρόλος της DDC στις ιογενείς λοιμώξεις

1.2.5.1. Συσχέτιση της μεταβολικής και σηματοδοτικής οδού της ντοπαμίνης με ιικές μολύνσεις

Η ντοπαμίνη που εκφράζεται σε περιφερικούς ιστούς έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την εξέλιξη ορισμένων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) [184-187]. Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η ισταμίνη παίζει ρόλο στην είσοδο του ιού HCV [188] και ο υποδοχέας της σεροτονίνης 2A έχει αναγνωριστεί ως παράγοντας εισόδου HCV [189]. Επιπλέον, στην περίπτωση του ιού DENV, η σύνδεση και η είσοδος βρέθηκε να αναστέλλεται από ανταγωνιστές των υποδοχέων ντοπαμίνης D2 ή D4. Πιο συγκεκριμένα για τον DENV, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως μία ομάδα μικρομοριακών ενώσεων, οι διϋδροβενζοθειεπίνες (dihydrodibenzothiepienes-DHBTs), που μοιάζουν δομικά με γνωστούς ανταγωνιστές ντοπαμινεργικών και σεροτονεργικών υποδοχέων, έχει αναφερθεί ότι έχουν αντι-ιική δραστηριότητα και μάλιστα επηρεάζουν το στάδιο της εισόδου του ιού μέσω ανταγωνισμού της σηματοδότησης από τον υποδοχέα ντοπαμίνης D4 και επακόλουθης αναστολής της σηματοδότησης μέσω ERK [190]. Επίσης, η προχλωροπρομαζίνη (PCZ), ένας ανταγωνιστής του D2 υποδοχέα και εγκεκριμένο φάρμακο εναντίον της ναυτίας, του πονοκέφαλου και του εμετού που αποτελούν συχνά συμπτώματα σε ασθενείς μολυσμένους με τον DENV [191], έχει αναφερθεί να έχει αντι-ιική δράση τόσο σε επίπεδο *in vitro* όσο και σε επίπεδο *in vivo*. Η αποτελεσματικότητά της στηρίζεται στην αναστολή της μεσολαβούμενης από κλαθρίνη

ενδοκύττωσης του ιού [192]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η PCZ, έχει αποδειχθεί δραστική και έναντι του HCV στοχεύοντας την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωσή του [193].

Μία άλλη συσχέτιση ανάμεσα στους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae* και της μεταβολικής οδού της ντοπαμίνης εμφανίζεται μέσω των micro-RNAs και συγκεκριμένα μέσω του miR491 που έχει δειχθεί αφενός ότι ενισχύει την αντιγραφή του HCV και αφετέρου ότι μειώνει την έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) [194] [195]. Όπως έχει παρατηρηθεί, το miRNA 491 καταστέλλοντας το μονοπάτι PI3K/AKT ενισχύει την αντιγραφή του HCV [194]. Δεδομένα μάλιστα αναφέρουν ότι το miR 491 προκαλεί μία αξιοσημείωτη μείωση στην έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση των εξωκυττάρων επιπέδων της ντοπαμίνης [195], δρώντας στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και επηρεάζοντας έτσι τη νευρωνική μεταβίβαση της ντοπαμίνης [196].

1.2.5.2. Επίδραση των ιϊκών μολύνσεων στην έκφραση της DDC

Μέχρι πρότινος, η πιθανή επίδραση της ιϊκής μόλυνσης στην έκφραση της DDC δεν είχε μελετηθεί. Εντούτοις, από πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστήριου [197] διαπιστώνεται ότι η αποκαρβοξυλάση της L-Dopa είναι καθοριστικός παράγοντας του κύκλου ζωής των ιών DENV και HCV, που ανήκουν στην οικογένεια *Flaviviridae*, ενώ αντίστοιχα, η έκφραση του ενζύμου ρυθμίζεται αρνητικά από την ιϊκή μόλυνση.

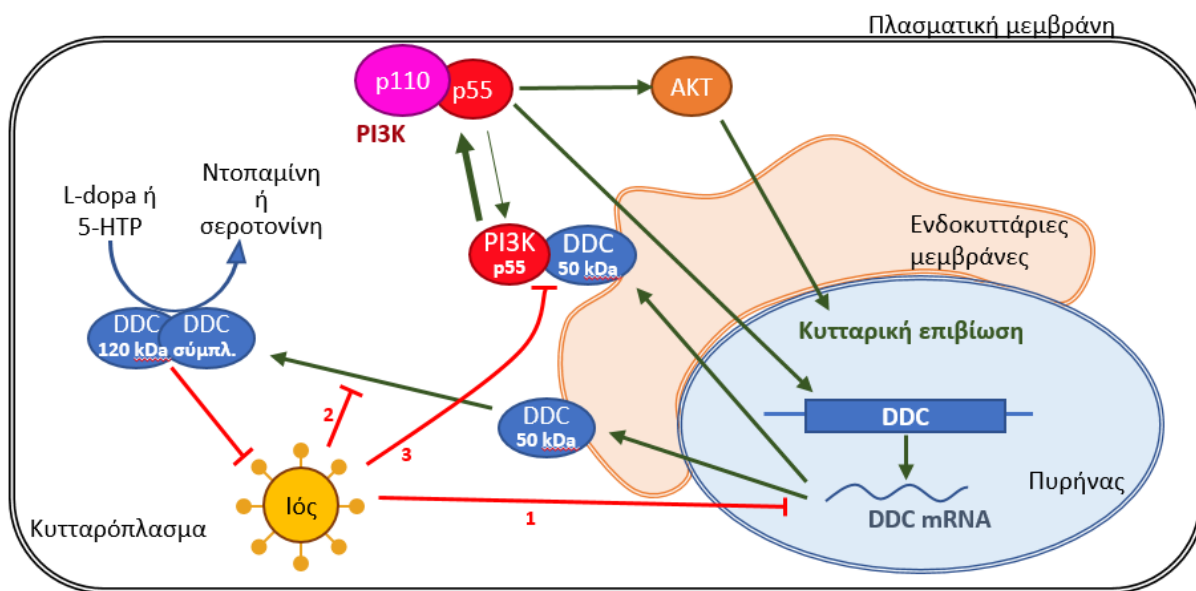
Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα του ολικού mRNA της DDC (RTqPCR) κατά τη μόλυνση με HCV ή DENV σε κύτταρα Huh7.5 ή Huh7, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του DENV, αυτή η αρνητική επίδραση ήταν ήδη εμφανής στα 24 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ στην περίπτωση του HCV, η επίδραση της μόλυνσης στο mRNA της DDC ήταν ανιχνεύσιμη μόνο σε μετέπειτα στάδια της μόλυνσης (96 ώρες). Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου, η ιϊκή μόλυνση φαίνεται να προκαλεί συσσώρευση μίας ισομορφής της DDC που εμφανίζεται στα 50kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το ανενεργό μονομερές του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα μειώνει τα επίπεδα ενός υδρόφοβου και ανθεκτικού στο SDS συμπλόκου που

εμφανίζεται στα 120kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το λειτουργικό διμερές ένζυμο [127]. Αντιθέτως, η ιϊκή μόλυνση δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα άλλων ανθεκτικών στο SDS ισομορφών με μοριακή μάζα μεταξύ 60 και 80kDa τα οποία έχουν αναφερθεί στο παρελθόν [157] και πιθανώς αντιπροσωπεύουν προϊόντα από μη χαρακτηρισμένα εναλλακτικά μετάγραφα της πρωτεΐνης, μετα-μεταφραστικά τροποποιημένες ισομορφές ή/και ανθεκτικά στο SDS πρωτεϊνικά σύμπλοκα της DDC.

Επιπλέον, από πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης των κυτταροπλασματικών, μεμβρανικών πυρηνικών και μετα-πυρηνικών κλασμάτων, με τη χρήση μιας μεθόδου που βασίζεται στη χρήση λυτικών διαλυμάτων με απορρυπαντικά αυξανόμενης ισχύος [198] φάνηκε ότι η ιϊκή μόλυνση δεν επηρεάζει την τοπολογία της DDC. Συγκεκριμένα, το 120kDa ανθεκτικό στο SDS σύμπλοκο εξακολουθεί να βρίσκεται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα ενώ το 50kDa μονομερές εντοπίζεται στις μεμβράνες. Θερμοεπαγόμενος διαχωρισμός πρωτεϊνών με Triton X-114 Huh7 κυτάρων μολυσμένων με DENV φανέρωσε ότι η υδροφοβικότητα των DDC ισομορφών, ένα από τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, φαίνεται να μην επηρεάζεται από την ιϊκή μόλυνση ενώ ανοσοϊστοχημική χρώση μολυσμένων κυτάρων έδειξε ότι τοπολογικά η DDC δεν συνεντοπίζεται με τα σημεία αντιγραφής των ιών. Τα *in vitro* αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν *in vivo* καθώς αναλύσεις δειγμάτων βιοψίας ήπατος που προέρχονται από ασθενείς με HCV με ηπατική ίνωση λόγω χρόνιας μόλυνσης, έδειξαν μια σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του mRNA της DDC και του γονιδιώματος του HCV. Αντίθετα, αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της DDC με carbidopa ενίσχυσε σημαντικά την αντιγραφή του RNA και τη μολυσματικότητα και των δύο ιών .

Είναι ενδιαφέρον ότι ο DENV επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα των συμπλόκων PI3K-DDC. Η άμεση αλληλεπίδραση της DDC με τη PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) περιεγράφηκε πρόσφατα [157]. Η PI3K είναι κύριος ενδοκυτταρίος διαμεσολαβητής μεταγωγής σήματος στο μονοπάτι PI3K/AKT, η ενεργότητα του οποίου είναι γνωστό ότι συμβάλλει στην εγκαθίδρυση της οξείας/αποπρωτικής μόλυνσης με DENV και της χρόνιας/εμμένουσας μόλυνσης με HCV [199-204] ενώ αποδείχθηκε σημαντική και για την επίδραση των ιών στο μονομερές της DDC των 50 kDa και στο mRNA της DDC.

Λαμβάνοντας υπόψη τα *in vitro* και *in vivo* δεδομένα (**Εικ. 14**), φαίνεται πως η μόλυνση με DENV ή HCV ρυθμίζει αρνητικά την DDC σε τρία διαφορετικά επίπεδα: (1) καταστέλλει τα επίπεδα mRNA της DDC, (2) μειώνει την απελευθέρωση της μονομερούς DDC 50 kDa από τις ενδοκυτταρικές μεμβράνες και τον επακόλουθο σχηματισμό του διμερούς συμπλόκου 120 kDa, το οποίο πιθανά αντιπροσωπεύει την καταλυτικά ενεργή μορφή της DDC και (3) διαταράσσει την αλληλεπίδραση μεταξύ του μονομερούς της DDC 50 kDa και της p55 υπομονάδας της PI3K, αφήνοντας ελεύθερη έτσι την PI3K p55 να αλληλοεπιδράσει με την PI3K p110. Έτσι αυξάνεται η ενεργότητα του μονοπατιού PI3K/AKT υπέρ της κυτταρικής επιβίωσης και της αντιγραφής του ιού σε όλα τα στάδια της μόλυνσης με HCV και στα αρχικά στάδια της μόλυνσης με DENV. Με τη σειρά της, η ενζυμική ενεργότητα της DDC μειώνει τον πολλαπλασιασμό των DENV και HCV.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου μηχανισμού για τη σχέση μεταξύ ιϊκής μόλυνσης, DDC και μονοπατιού PI3K/AKT. [197]

1.3.ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ ΕΚΑΤΕΡΩΘΕΝ ΤΗΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥΣ

1.3.1. Οι οξειδάσες των μονοαμινών (MAO A και B)

Οι οξειδάσες των μονοαμινών (Monoamine oxidases A and B, MAO A and B) είναι φλαβοένζυμα των θηλαστικών με κυρίαρχο ρόλο στον μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών. Η αρχική ανακάλυψή τους έγινε το 1928 όταν η Hare [205] παρατήρησε την οξειδωση τρυπταμίνης στο ήπαρ κουνελιού. Το ίδιο ένζυμο φάνηκε να είναι υπεύθυνο για την οξειδωτική αποικοδόμηση νευρολογικά σημαντικών αμινικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων της ντοπαμίνης, νερεπινεφρίνης, επινεφρίνης, σεροτονίνης και φαινεθυλαμίνης (phenethylamine, PEA) και έτσι αναγνωρίστηκε ως οξειδάση μονοαμινών.

Λόγω της διαφορετικής αναστολής του ενζύμου από τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς clorgyline και deprenyl [206], θεωρήθηκε αρχικά ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά ένζυμα που εμφανίζουν διαφορετική υποστρωματική εξειδίκευση, τα MAO A και MAO B. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με την ανακάλυψή και την αλληλούχιση δύο διαφορετικών γονιδίων που κωδικοποιούν για δύο ένζυμα [207]. Αναλυτικότερα, η MAO A καταλύει κατά προτίμηση την οξειδωση σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης ενώ η MAO B την οξειδωση φαινεθυλαμίνης και βενζυλαμίνης ενώ μεταβολίζει με αργό ρυθμό την σεροτονίνη και την νορεπινεφρίνη [206]. Η MAO B μεταβολίζει επίσης την 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) σχηματίζοντας την νευροτοξίνη 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP+), ενός παράγοντα που συνδέεται με την ασθένεια του Parkinson [208]. Παρόλο που στον άνθρωπο η DA οξειδώνεται από την MAO B [209] και στα τρωκτικά από την MAO A [210, 211], στα περισσότερα είδη η DA δύναται να οξειδωθεί και από τις δύο μορφές του ενζύμου [212]. Υπάρχουν, ωστόσο, εξαιρέσεις αυτού του κανόνα καθώς η ειδικότητα της οξειδάσης για το υπόστρωμα εξαρτάται από την συγκέντρωση, την συγγένεια και το ρυθμό ανακύκλωσης του υποστρώματος καθώς και την συγκέντρωση του ενζύμου [213].

1.3.1.1. Ιστοειδικός εντοπισμός των MAO A και B

Στον εγκέφαλο, η MAO A εντοπίζεται κυρίως σε κατεχολαμινεργικούς νευρώνες ενώ η MAO B σε σεροτονεργικούς και ισταμινεργικούς νευρώνες αλλά και σε νευρογλοιακά κύτταρα [214-219]. Στους περιφερικούς ιστούς, η κατανομή των MAO ποικίλει μέσα στον ίδιο οργανισμό. Ιστοί όπως τα ανθρώπινα αιμοπετάλια και το βοδινό ήπαρ εκφράζουν κυρίως MAO B [220-222] ενώ άλλοι ιστοί όπως ο ανθρώπινος πλακούντας και ο βοδινός θυροειδής εκφράζουν κυρίως MAO A [223, 224]. Σε κάθε περίπτωση, η παρουσία των MAO στους περισσότερους ιστούς φαίνεται να αντικατοπτρίζει μία λειτουργική ανάγκη. Ωστόσο, σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, οι MAO και τα υποστρώματά τους δεν εντοπίζονται στους ίδιους νευρώνες. Για παράδειγμα, η MAO A που μεταβολίζει κυρίως 5-HT δεν εντοπίζεται σε σεροτονεργικούς νευρώνες ενώ η MAO B με κύριο μεταβολικό υπόστρωμα τη PEA εντοπίζεται σε σεροτονεργικούς νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα. Ο ρόλος των MAO σε αυτές τις περιοχές φαίνεται να είναι η προστασία των νευρώνων από μη επιθυμητή διέγερση λόγω οξειδωσης εξωγενών αμινών που θα λειτουργήσουν ως λανθασμένοι νευροδιαβιβαστές [219, 225]. Επιπλέον, η έκφραση των MAO φαίνεται να επηρεάζεται και από την ηλικία. Συγκεκριμένα, η έκφραση της MAO B στους νευρωνικούς ιστούς αυξάνεται 3-4 φορές κατά την γήρανση [226] ενώ η έκφραση της MAO A στα καρδιακά κύτταρα αυξάνεται έως και 6 φορές [227]. Οι παρατηρήσεις αυτές συνιστούν ότι οι ασθένειες που συνδέονται με την γήρανση ίσως σχετίζονται με την αυξημένη έκφραση των MAO.

1.3.1.2. Γονιδίωμα των ενζύμων

Η ανακάλυψη των δύο ισομορφών των MAO το 1968 [211] έθεσε το εξής ερώτημα: οι MAO A και B είναι διαφορετικές πρωτεΐνες ή είναι η ίδια πρωτεΐνη με διαφορετική μετα-μεταφραστική τροποποίηση; Απάντηση δόθηκε το 1988 με την κλωνοποίηση δύο πλήρους μεγέθους μορίων cDNA που κωδικοποιούν για τις ανθρώπινες ηπατικές οξειδάσες των μονοαμινών A και B [207]. Κατόπιν, τα μόρια cDNA χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων θηλαστικών και φάνηκε

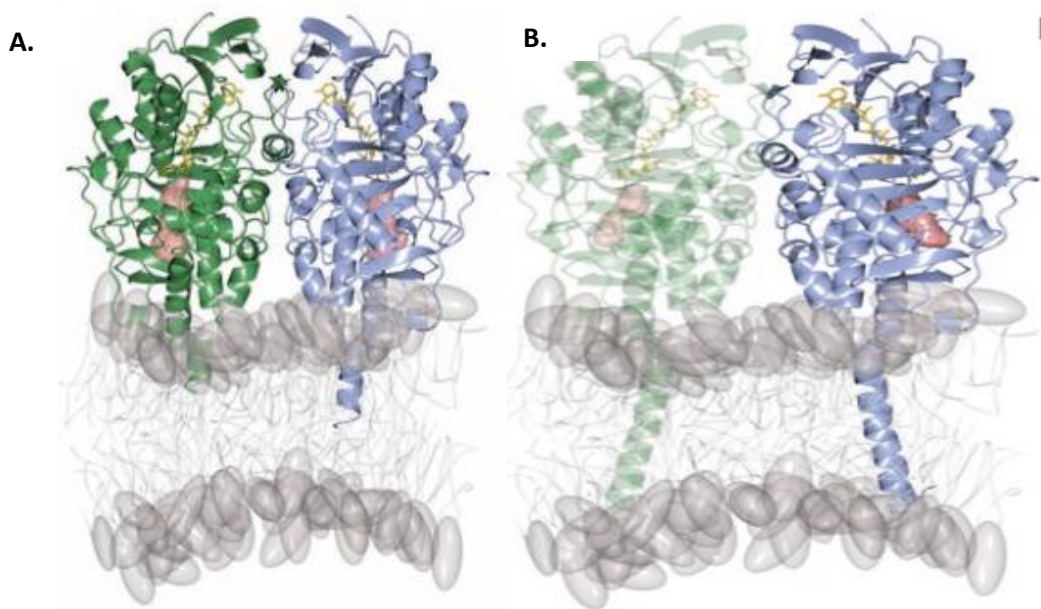
να παρουσιάζουν την ίδια υποστρωματική εξειδίκευση αλλά και την ίδια ευαισθησία στους αναστολείς με αυτή που είχε παρατηρηθεί στις ενδογενείς οξειδάσες A και B [228]. Τα πειράματα αυτά αποτέλεσαν αιτία για την ομόφωνη παραδοχή ότι τα δύο ισοένζυμα προέρχονται από δύο διαφορετικά πολυπεπτίδια.

Οι MAO A και B του ανθρώπου [229, 230] και του ποντικού [231] εντοπίζονται στο X-χρωμόσωμα και συγκεκριμένα χαρτογραφήθηκαν σε διπλανές περιοχές στη θέση Χρ11.23 [229, 232]. Απαλοιφή των γονιδίων παρατηρείται σε άτομα με την νόσο του Norrie, μία φυλοσύνδετη υπολειπομένη νευρολογική πάθηση που χαρακτηρίζεται από απώλεια όρασης, ακοής καθώς και πνευματική καθυστέρηση [233, 234]. Τα δύο αυτά γονίδια αποτελούνται από 15 εξώνια ενώ η γενικότερη οργάνωση τους αναφορικά με τα ιντρόνια και τα εξώνια είναι πανομοιότυπη [235], γεγονός που υποδεικνύει ότι προήλθαν από τον διπλασιασμό ενός κοινού αρχέγονου γονιδίου. Αυτό που διαφέρει, ωστόσο, είναι η οργάνωση των υποκινητών τους η οποία πιθανώς αποτελεί αιτία της διαφορετικής ιστοειδικής και κυτταρικής έκφρασης των δύο ενζύμων [236, 237]. Επιπλέον, η ιδιαίτερα υψηλή συντήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας του κάθε ισοενζύμου μεταξύ των θηλαστικών αντικατοπτρίζει την εξελικτική πίεση που ασκείται προκειμένου να διατηρηθεί μία συγκεκριμένη φυσιολογική λειτουργία για την κάθε οξειδάση.

1.3.1.3. Δομικές και μοριακές ιδιότητες των ενζύμων

Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των MAO φέρουν παρόμοιες δομές με υψηλά συντηρημένες περιοχές πρόσδεσης ενός φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (flavin adenine dinucleotide, FAD) αλλά με ποικίλες θέσεις πρόσδεσης των υποστρωμάτων (**Εικ. 15**) [238, 239]. Αναλυτικότερα, όλες οι οξειδάσες των μονοαμινών αποτελούνται από μία περιοχή πρόσδεσης του FAD, μία περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος καθώς και μία περιοχή πρόσδεσης στην μιτοχονδριακή μεμβράνη [240, 241]. Αποτελέσματα από μελέτες φασματοσκοπίας παλλόμενου ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (pulsed electron paramagnetic resonance, EPR) έδειξαν ότι οι δύο μορφές των MAO στον άνθρωπο και στον αρουραίο υπάρχουν ως διμερή σε διάλυμα [242]. Παρόλα αυτά η MAO

Α κρυσταλλώνεται ως μονομερές [243]. Η πρόσδεση στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων πραγματοποιείται με μία α-έλικα στην καρβοξυτελική περιοχή και των δύο μορφών ενώ η πρόσδεση αυτή ενισχύεται με επιπρόσθετες μεμβρανικές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται με άλλα υδρόφοβα κατάλοιπα [240, 241, 244]. Οι θέσεις πρόσδεσης των υποστρωμάτων είναι υδρόφοβες κοιλότητες που περιβάλλονται κατά κύριο λόγο από αρωματικά και αλειφατικά κατάλοιπα [240, 241].



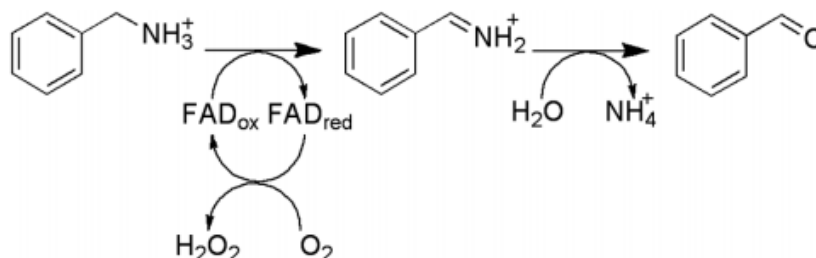
Εικόνα 15:

A. Συνολική κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης MAO B [245] αναπαρίσταται ως μοντέλο του πρωτεϊνικού διμερούς που εισχωρεί την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα (γκρι). Τα δύο μονομερή παρουσιάζονται ως μπλε και πράσινο αντίστοιχα, με κίτρινο εμφανίζεται ο FAD συμπαράγοντας ενώ με ροζ η κοιλότητα του ενεργού κέντρου.

B. Συνολική κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης MAO A [246] η οποία κρυσταλλώνεται ως μονομερές (μπλε) παρόλο που προσδένεται στην μεμβράνη ως διμερές (FAD συμπαράγοντας με κίτρινο, κοιλότητα ενεργού κέντρου με ροζ).

1.3.1.4. Χημική αντίδραση

Οι οξειδάσες των μονοαμινών A και B καταλύουν την οξείδωση πρωτοταγών, δευτεροταγών και τριτοταγών αμινών, συμπεριλαμβανομένων πολλαπλών νευροδιαβιβαστών, στις αντίστοιχες μίμνες. Όντας φλαβινοπρωτεϊνικές οξειδάσες, οι MAO καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος μέσω δύο ημι-αντιδράσεων (**Εικ. 16**). Στην ημι-αντίδραση αναγωγής, με την χρήση οξυγόνου αφαιρείται μία αμινομάδα και το γειτονικό της άτομο υδρογόνου (υδρίδιο) από το υπόστρωμα με αποτέλεσμα ο φλαβινικός συμπάροντας του ενζύμου να ανάγεται όταν δέχεται το υδρίδιο. Στην ημι-αντίδραση οξείδωσης ο φλαβινικός παράγοντας επαναοξειδώνεται από μοριακό οξυγόνο οδηγώντας στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Τα οξειδωμένα προϊόντα υδρολύονται μη ενζυματικά στις αντίστοιχες αλδεΐδες ή κετόνες [247].



Εικόνα 16: Η αντίδραση που καταλύεται από τις MAO. Ο φλαβινικός συμπάροντας ανάγεται (FAD_{red}) και οξειδώνεται εκ νέου (FAD_{ox}) από μοριακό οξυγόνο για την παραγωγή H₂O₂. [248]

1.3.1.5. Χημικές ουσίες που αναστέλλουν την δράση των ενζύμων

Όντας πιστοποιημένοι φαρμακευτικοί στόχοι, οι MAO έχουν υπάρξει στο επίκεντρο πολλαπλών ερευνών για την ανάπτυξη αναστολέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά για την αντιμετώπιση νευρολογικών παθολογιών [249]. Μάλιστα, η αναστολή της MAO B έχει εγκαθιδρυθεί στην θεραπεία κατά της νόσου του Parkinson λόγω του καθοριστικού ρόλου που κατέχει στον μεταβολισμό της ντοπαμίνης στους νευρώνες της

μέλαινας ουσίας που εκφυλίζονται [250]. Εντούτοις, είναι γνωστό ότι οι αναστολείς των MAO επιδρούν και σε άλλους στόχους [251] με αποτέλεσμα να επικρατεί μία κοινή γνώμη ότι τα μόρια αυτά ίσως έχουν μία γενική νευροπροστατευτική δράση που προκύπτει από κυτταρικούς μηχανισμούς εκτός την εξαρτώμενης από τους MAO αποικοδόμησης των νευροδιαβιβαστών.

Έχουν περιγραφεί τέσσερις τύποι αναστολέων των MAO, βάση του τρόπου δράσης τους. Ο πρώτος περιλαμβάνει μη αντιστρεπτές και μη επιλεκτικές ουσίες που καταστέλλουν τη δράση των ενζύμων. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται η *rhenelzine*, η *tranylcypromine* και η *isocarboxazid*, οι τρεις πρώτοι αναστολείς που περιεγράφηκαν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς που προσδένονται ομοιοπολικά στους MAO και αναστέλλουν μόνιμα την λειτουργία τους. Η μεταβολική δραστηριότητα επανέρχεται τοπικά μόνο κατόπιν σύνθεσης νέου ενζύμου [252]. Ο δεύτερος τύπος αναστολέων περιλαμβάνει ουσίες που αναστέλλουν την λειτουργία των MAO A με αντιστρεπτό και επιλεκτικό τρόπο. Η διάρκεια της αναστολής των MAO A από τις ουσίες αυτές είναι μικρότερη (16-24 ώρες) σε σχέση με την διάρκεια αναστολής από τους κλασσικούς, μη επιλεκτικούς αναστολείς των MAO (τουλάχιστον 10 ημέρες) [253]. Η Τρίτη κατηγορία αναστολέων περιλαμβάνει μη αντιστρεπτούς, επιλεκτικούς αναστολείς των MAO B όπως η *selegiline* and *rasagiline* [252] ενώ η τελευταία κατηγορία τους αντιστρεπτούς, επιλεκτικούς αναστολείς των MAO B όπως η *safinamide* [252, 254]. Γενικότερα, η αναστολή μόνο της μίας ισομορφής των ενζύμων είναι δυνατή μόνο με την χορήγηση της ανασταλτικής ουσίας σε ένα περιορισμένο εύρος συγκέντρωσης και η ειδικότητα αυτή χάνεται με τη χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων όπου και πραγματοποιείται ολική αναστολή των οξειδασών [252, 255]. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί και άλλες ουσίες με δυνατότητα αναστολής των MAO, οι πιο μελετημένες εκ των οποίων είναι οι αμφεταμίνες [256, 257].

Σε κάθε περίπτωση, οι αναστολείς των MAO έχουν μελετηθεί ως προς την επίδραση τους στην έκφραση του γονιδίου της DDC. Αναλυτικότερα, σε κύτταρα PC12 οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς των MAO B όπως η (-)-*deprenyl* και η *pargyline*

επάγουν την έκφραση του γονιδίου ενώ η clorgyline, ο αντιστρεπτός αναστολέας των MAO A, και ο Ro 19-6327, ο αντιστρεπτός αναστολέας των MAO B, δεν φαίνεται να την επηρεάζουν [258].

1.3.2. Οι κυστιδιακοί μεταφορείς μονοαμινών (VMATs)

Ο ρόλος των μονοαμινών ως νευροδιαβιβαστές είναι καθόλα χαρακτηρισμένος και η νευροδιαβιβαστική λειτουργία τους πραγματοποιείται μέσω εκκριτικών κυστιδίων. Η αποθήκευση των μονοαμινών σε κυστίδια πραγματοποιείται από τους κυστιδιακούς μεταφορείς μονοαμινών (vesicular amine transporters, VATs). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι κυστιδιακοί μεταφορείς ακετυλοχολίνης (vesicular acetylcholine transporter, VAChT; solute carrier family, SLC18A3), μονοαμινών (vesicular monoamine transporters VMAT1 και VMAT2; SLC18A1 και SLC18A2) [259-261] και ο νεοανακαλυφθής κυστιδιακός μεταφορέας πολυαμινών (vesicular polyamine transporter, VPAT; SLC18B1) [262]. Οι μεταφορείς αυτοί είναι απαραίτητοι για την αποθήκευση των νευροδιαβιβαστών σε κυστίδια καθώς και για την απελευθέρωση τους στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωκυττάρωσης.

Οι VMATs αποτελούν μέρος μίας εκτενέστερης οικογένειας μεταφορέων που αναφέρονται ως TEXANs (*toxin-extruding antiporter system*) και είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση τοξινών [263]. Οι μεταφορείς αυτοί είναι απαραίτητοι για την συνάθροιση και αποθήκευση των μονοαμινών στα εκκριτικά κυστίδια προκειμένου, όχι μόνο να τις καθιστούν διαθέσιμες για την εξωκυττάρια έκκριση τους, αλλά και για να τις δεσμεύσουν και να τις εξωθήσουν εκτός κυτταροπλάσματος καθώς στο κυτταρόπλασμα τα οξειδωμένα προϊόντα τους είναι ζημιογόνα για το κύτταρο [96]. Οι VMAT1 και VMAT2 διαφέρουν ως προς το πρότυπο έκφρασης και την υποστρωματική εξειδίκευση. Ο VMAT1 εκφράζεται κυρίως σε νευροενδοκρινή κύτταρα ενώ νευρώνες του κεντρικού, περιφερικού και εντερικού συστήματος εκφράζουν αποκλειστικά VMAT2 [264]. Οι VMAT1 και VMAT2 εκφράζονται ταυτόχρονα στα χρωμαφινικά κύτταρα των επινεφριδίων [265]. Αναφορικά με το ήπαρ, από πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε ανθρώπινους ιστούς, φαίνεται ένας μικρός αριθμός κυττάρων που εκφράζουν VMAT2 στα πυλαία κανάλια και στους ημιτονοειδείς αυλούς του ήπατος ενώ Real time RT-PCR ανάλυση επιβεβαίωσε την

παρουσία mRNA των VMAT2 στους εν λόγω ιστούς [266]. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε ντοπαεργικούς ('DOPAergic') νευρώνες, δηλαδή σε νευρώνες που εκφράζουν TH για την σύνθεση της L-DOPA αλλά δεν εκφράζουν DDC για την σύνθεση ντοπαμίνης, δεν παρατηρούνται ανιχνεύσιμα επίπεδα πρωτεΐνης VMAT2 [267]. Όσον αφορά την υποστρωματική εξειδίκευση, ο VMAT2 χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τα διάφορα υποστρώματα (ντοπαμίνη, επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη και 5-υδροξυτρυπταμίνη) ενώ είναι η μόνη ισομορφή με την ικανότητα να μεταφέρει ισταμίνη [264, 268]. Επιπρόσθετα των ενδογενών υποστρωμάτων, οι VMATs δεσμεύουν και μεταφέρουν τη μη φυσική νευροτοξίνη N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) [269, 270] και την acriflavine [271].

Η καθοριστική διαφορά μεταξύ της απελευθέρωσης κατεχολαμινών από ενδοκρινείς αδένες και από νευρώνες του ΚΝΣ είναι ο τύπος των εκκριτικών κυστιδίων που συμμετέχουν στις βιολογικές αυτές διαδικασίες. Σε μυελώδη επινεφριδικά κύτταρα, τα μεγάλα (150-300nm σε διάμετρο) 'χρωμαφινικά κυστίδια' υψηλής πυκνότητας (large dense-core vesicles, LDCVs) που συσσωρεύουν κατεχολαμίνες [272, 273] συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη για την εξωκυττάρωση του νευροδιαβιβαστή, αλλά δεν ανακυκλώνονται τοπικά για την δημιουργία νέων αποθηκευτικών κυστιδίων. Αντίθετα, τα μικρά συναπτικά κυστίδια (40-50nm) (small synaptic vesicles, SSVs) [274] που συσσωρεύονται στις νευρικές απολήξεις, ενδοκυτταρώνονται και επαναδημιουργούνται κατόπιν απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών στον εξωκυττάριο χώρο [275, 276].

Οι VMATs είναι όξινης γλυκοπρωτεΐνης με προβλεπόμενη μοριακή μάζα ~70kDa [269, 277, 278]. Δομικά και μηχανιστικά, η οικογένεια SLC18 αποτελεί μέρος της υπεροικογένειας MFS (major facilitator superfamily), της μεγαλύτερης οικογένειας ενεργών μεμβρανικών μεταφορέων, τα μέλη των οποίων είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλα τα βασίλεια της ζωής και μεταφέρουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων [279]. Όλοι οι MFS μεταφορείς αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικές (transmembrane, TM) α-έλικες [280] με τις TM1, 2, 7 και 8 να φέρουν χαρακτηριστικά μοτίβα που πιθανώς συνδέονται με την ολική αναδίπλωση και λειτουργία τους (**Εικ. 24 A**) [281]. Ειδικότερα

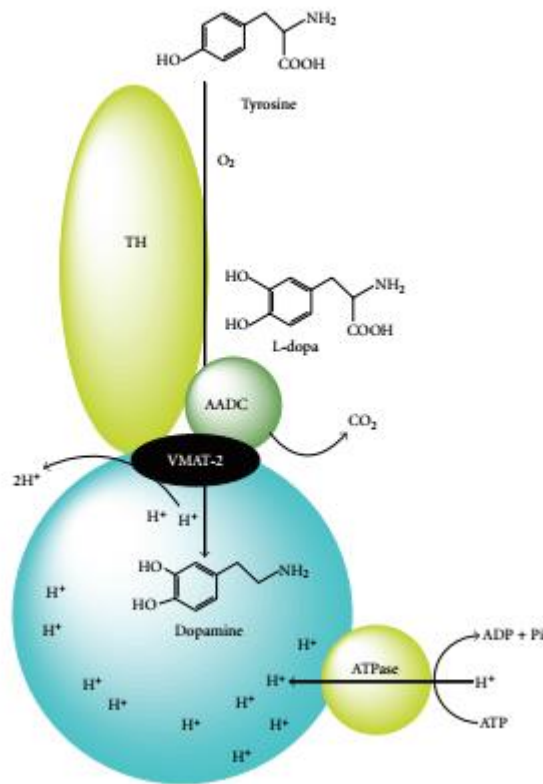
για τους VMATs, το αμινοτελικό καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο τους βρίσκονται στο κυτταροπλασματικό μέρος του κυστιδίου [277].

1.3.2.1. Ρύθμιση της λειτουργίας των μεταφορέων

Στην νευροδιαβίβαση, η μεταφορά μονοαμινών μέσω των VMAT2 ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά και εξαρτάται από πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις αλλά και τον προσυναπτικό εντοπισμό των κυστιδίων. Στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συγκαταλέγονται η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση. Ο VMAT2 φωσφορυλιώνεται στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο και το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι απαραίτητο για την πρόσληψη των μονοαμινών και πιθανώς για την έξοδο αυτών από το κυστίδιο κατόπιν διέγερσης [282, 283]. Οι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου κινάσες δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί αν και βάση της δομής των VMAT2, οι πιο πιθανές υποψήφιες κινάσες φαίνεται να είναι η πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A, PKA) και η πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C, PKC). Η φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου από τις κινάσες καζεΐνης I και II (casein kinases I και II) είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό των VMAT2 στα μεγάλα υψηλής πυκνότητας κυστίδια [284, 285]. Επιπλέον, N-γλυκοζυλίωση στο καρβοξυτελικό άκρο αλλά και στην περιοχή σύνδεσης μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης TM είναι υπεύθυνη για την κυστιδιακή στόχευση των VMAT2. Ο VMAT2 συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, γλυκοζυλιώνεται στο δίκτυο δια-Golgi (trans-Golgi) και κατατάσσεται σε κυστίδια του συντηρητικού εκκριτικού μονοπατιού ή σε μεγάλα υψηλής πυκνότητας κυστίδια με τρόπο εξαρτώμενο από την γλυκοζυλίωση [286-288]. Συγκεκριμένα, για την κατανομή του στα υψηλής πυκνότητας κυστίδια είναι απαραίτητη η γλυκοζυλίωση τόσο του αμινοτελικού όσο και του καρβοξυτελικού άκρου του μεταφορέα [289]. Σε περίπτωση απουσίας γλυκοζυλίωσης του καρβοξυτελικού άκρου, ο VMAT2 κατανέμεται σε μικρά συναπτικά κυστίδια [289].

Ελάχιστες είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των VMAT2 και άλλων πρωτεϊνών που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Ανάμεσα σε αυτές είναι η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ VMAT2, TH και DDC σε συναπτικά κυστίδια που έχουν απομονωθεί από ντοπαμινεργικές

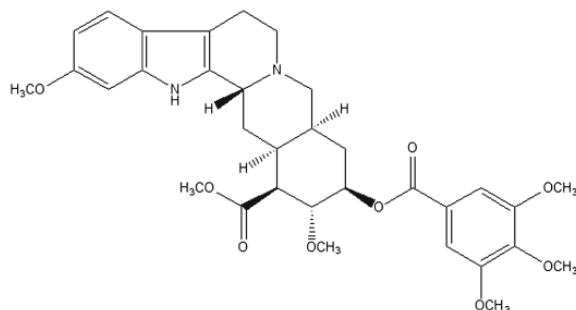
περιοχές εγκεφάλου αρουραίου [290]. Τα σύμπλοκα αυτά υποδεικνύουν ότι η αποθήκευση των βιογενών αμινών έπεται άμεσα της σύνθεσης τους εφόσον η παραμονή τους στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην δημιουργία ελευθέρων ριζών που είναι τοξικές για το κύτταρο. Επομένως, η σύνθεση, στην προκειμένη περίπτωση, της ντοπαμίνης από την TH και την DDC, αλλά πιθανώς γενικότερα των βιογενών αμινών, και στη συνέχεια η αποθήκευση τους από τους VMAT2 είναι διαδικασίες αλληλένδετες οι οποίες φαίνεται να συνεντοπίζονται χωρικά και χρονικά (**Εικ. 17**). Επιπλέον, ο VMAT2 αλληλοεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ των 70kDa (heat shock chaperone 70, Hsc70) με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση στην πρόσληψη μονοαμινών όπως αυτή έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργεια κυττάρων αλλά και σε μοντέλα απομονωμένων συναπτικών άκρων από νευρώνες [291]. Η λειτουργία του μεταφορέα φαίνεται να καθορίζεται και από τον εντοπισμό του στους διάφορους πληθυσμούς συναπτικών κυστιδίων. Μάλιστα, έχουν καταγραφεί ψυχοδιεγερτικά φάρμακα που προκαλούν διαφορική ανακατανομή των VMAT2 μεταξύ συναπτικών κυστιδίων και μείωση της πρόσληψης αμινών χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρο εάν η ανακατανομή είναι αιτία ή επακόλουθο της μειωμένης πρόσληψης [268, 292-294].



Εικόνα 17: Η σύνθεση της ντοπαμίνης καταλύεται από την TH και την DDC, ένζυμα που αλληλοεπιδρούν με τους VMAT-2 για την άμεση αποθήκευση της στα κυστίδια. [98]

Στην περίπτωση των VMAT2, έχουν μελετηθεί εκτενώς φαρμακευτικές ουσίες που λειτουργούν ως αναστολείς της λειτουργίας των εν λόγω μεταφορέων και οδηγούν σε εξάντληση των αποθηκευμένων κατεχολαμινών. Στην κατηγορία των κλασικών αναστολέων των VMAT2 ανήκουν η Tetrabenazine (TBZ) και η Reserpine [295], ουσίες που εμποδίζουν την μεταφορά των αμινών στο κυστίδιο. Η χορήγηση TBZ είναι εγκεκριμένη από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration, FDA) θεραπεία για την νόσο του Huntington καθώς η ασθένεια αυτή χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης [296]. Η Reserpine (**Εικ. 18**), ένα αλκαλοειδές που απομονώνεται από τις ρίζες του φυτού *Rauwolfia serpentina*, έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την αντιμετώπιση της

υπέρτασης αλλά και ως ηρεμιστικό φάρμακο [297]. Η Reserpine προσδένεται μη αντιστρεπτά στον VMAT2 και επομένως έχει μακροχρόνια επίδραση που μπορεί να διαρκέσει έως και εβδομάδες. Επιπλέον, η Reserpine και η TBZ αναστέλλουν την αποθήκευση τόσο των κατεχολαμινών όσο και της σεροτονίνης με αποτέλεσμα η χορήγηση τους να προκαλεί συμπτώματα όπως γαστρεντερικό πόνο, κατάθλιψη και κούραση [295] και για το λόγο αυτό η κλινική τους χρήση είναι πλέον περιορισμένη. Η κύρια διαφορά των δύο αυτών κλασικών αναστολέων των VMAT2 είναι ότι η reserpine είναι ανταγωνιστικός αναστολέας του μεταφορέα και η πρόσδεση της εξαρτάται από τη δράση της H⁺-ATPάσης και την εγκαθίδρυση διαφοράς δυναμικού στην μεμβράνη του κυστιδίου [298-300], ενώ η πρόσδεση της TBZ, του μη ανταγωνιστικού αναστολέα των VMAT2, είναι ανεξάρτητη της διαφοράς δυναμικού [263]. Τέλος, η TBZ είναι αποκλειστικός αναστολέας των VMAT2 καθώς δεν προσδένεται στους VMAT1[301] ενώ η reserpine αναστέλλει την λειτουργία και των δύο ισομορφών του μεταφορέα.

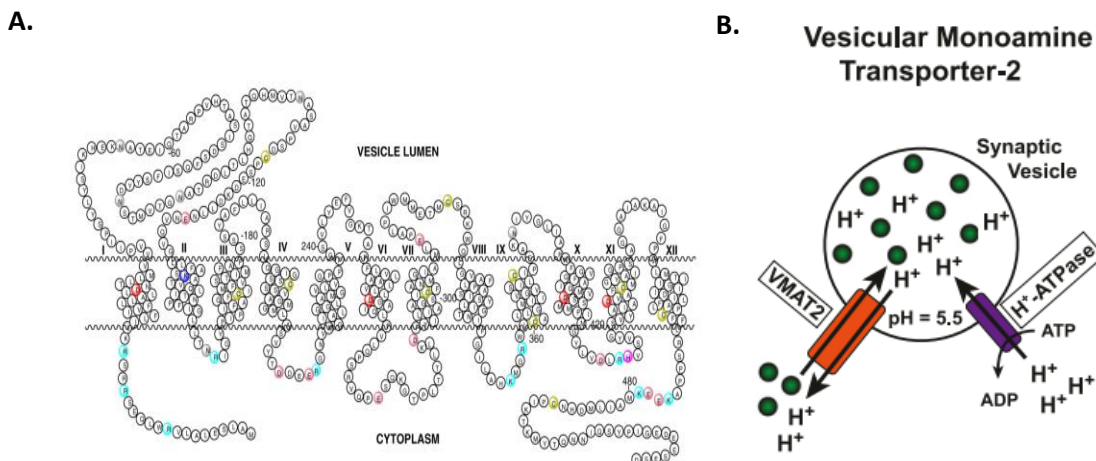


Εικόνα 18: Χημική δομή της Reserpine [302].

1.3.2.2. Λειτουργία των VMAT2

Τα αδρενεργικά χρωμαφινικά κυστίδια καθώς και τα συναπτικά κυστίδια διατηρούν μία υψηλή συγκέντρωση βιογενών αμινών μέχρι και 0,5M ξεπερνώντας δηλαδή μέχρι και 10000 φορές την συγκέντρωση αυτών στο κυτταρόπλασμα [303]. Επομένως, η ενεργή μεταφορά κυτταροπλασματικών, θετικά φορισμένων μονοαμινών ενάντια σε μία υψηλή διαβάθμιση συγκέντρωσης πραγματοποιείται χάρη

στην δράση της αντλίας H^+ -ATPάσης που εντοπίζεται στην κυστιδιακή μεμβράνη (**Εικ. 19B**). Συγκεκριμένα, η H^+ -ATPάση είναι υπεύθυνη για την εγκαθίδρυση της απαραίτητης διαφοράς δυναμικού αλλά και του κατάλληλου διαμεμβρανικού pH, ο συνδυασμός των οποίων έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο δύο πρωτονίων από το εσωτερικό του κυστιδίου προς το κυτταρόπλασμα με κάθε μόριο αμίνης που μεταφέρεται στο εσωτερικό αυτού [303-306].



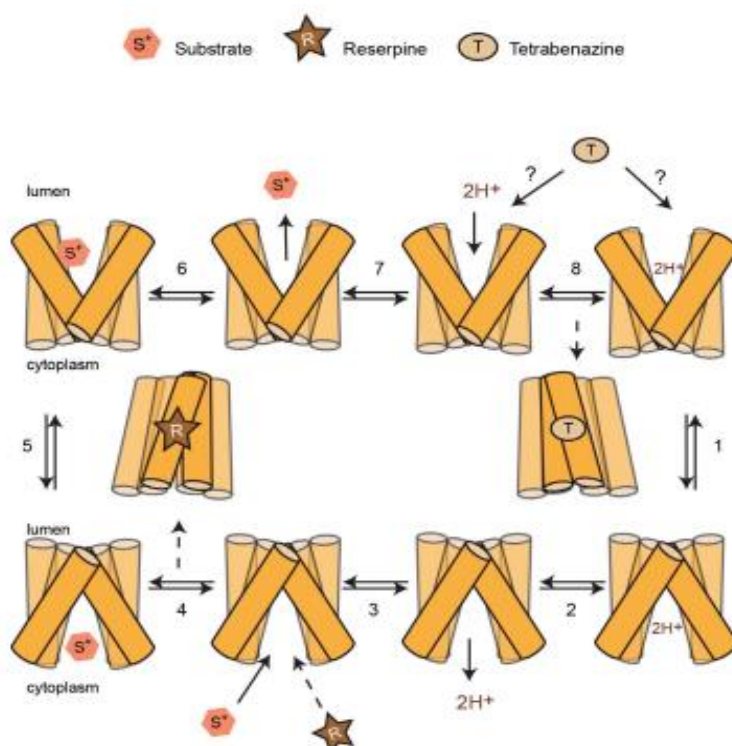
Εικόνα 19:

A. Προβλεπόμενη δευτερογενής δομή του hVMAT2 [265]

B. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του VMAT2 . Η μεταφορά των μονοαμινών στα κυστίδια μέσω των VMAT2 διευκολύνεται από την δράση της H^+ -ATPάσης.

Σύμφωνα με το μοντέλο λειτουργίας των VMAT που έχει προταθεί (**Εικ. 20**) [307], σε απουσία κλίσης δυναμικού, η 'ακίνητη' διάταξη του μεταφορέα αντιστοιχεί στην ανοιχτή προς το εσωτερικό του κυστιδίου διάταξη εφόσον είναι δυνατή η πρόσδεση της TBZ αλλά όχι της reserpine. Η αλλαγή προς την αντίθετη, δηλαδή την ανοικτή προς το κυτταρόπλασμα, διάταξη είναι εξαιρετικά αργή. Πτώση του pH στο εσωτερικό του κυστιδίου μέσω της δράσης της H^+ -ATPάσης, έχει ως αποτέλεσμα την ένωση μορίων H^+ με δύο κατάλοιπα-κλειδιά του μεταφορέα (D33 στην TM1 και E313 στην TM7), γεγονός

που διευκολύνει την μετάβαση προς την ανοικτή στο κυτταρόπλασμα διάταξη. Μεταφορά πρωτονίων προς την βασική μεριά της μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας του σημείου πρόσδεσης προς το υποστρώμα ή την reserpine. Πρόσδεση του υποστρώματος επάγει μία δεύτερη μετάβαση στην ανοικτή προς το κυστίδιο διάταξη όπου και πραγματοποιείται η απελευθέρωση του. Αυτή η διάταξη εκθέτει το σημείο αλληλεπίδρασης με την tetrabenazine, η πρόσδεση της οποίας οδηγεί σε μία αδιέξοδη διάταξη.



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου λειτουργίας των VMAT. Ο κύκλος θεωρείται ότι περιλαμβάνει οκτώ στάδια (αριθμημένα). Απουσία κλίσης δυναμικού, κυριαρχεί η διάταξη με τον μεταφορέα ‘ανοικτό’ προς το εσωτερικό του κυστιδίου. Πρόσδεση πρωτονίων επάγει αλλαγή διάταξης του μεταφορέα στην ‘ανοικτή’ προς το κυτταρόπλασμα μορφή (1) και κατόπιν πρόσδεση υποστρώματος επαναφέρει τον μεταφορέα στην αρχική κατάσταση (5) με επακόλουθη την απελευθέρωση του υποστρώματος στο εσωτερικό του κυστιδίου. Πρόσδεση TBZ δεσμεύει τον μεταφορέα σε μία κατάσταση ασύμβατη με την πρόσδεση υποστρώματος

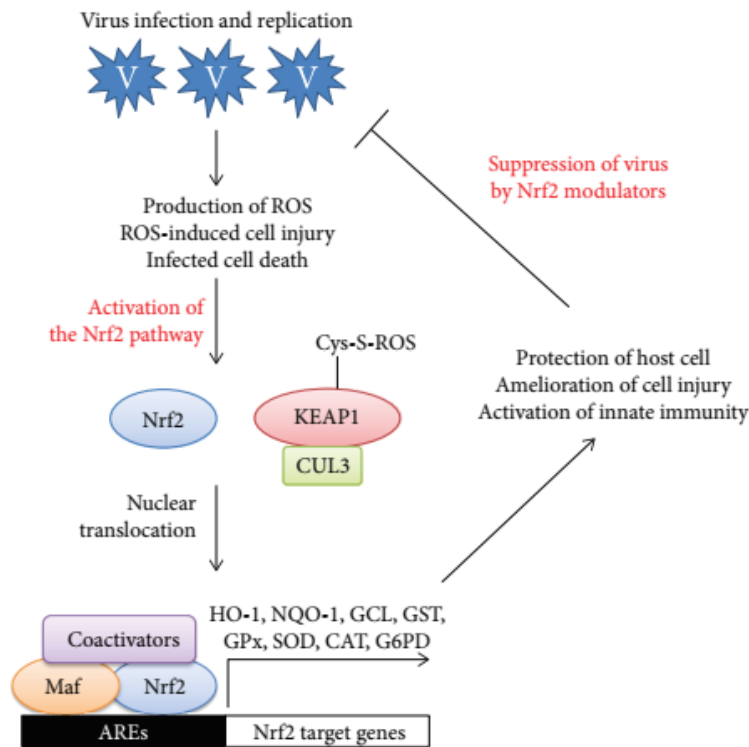
(8). Η reserpine ανταγωνίζεται το υπόστρωμα για τη θέση δέσμευσης στον μεταφορέα (4). Αναπροσαρμοσμένο από [308].

1.4. ΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗΝ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ DENV ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ NRF2

Η αξιοποίηση του οξυγόνου ως τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων στον μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου οδηγεί σε αναπόφευκτη παραγωγή οξειδωμένων παραπροϊόντων. Εξαιτίας της υψηλής δραστηρότητας τους, τα παραπροϊόντα αυτά συχνά αναφέρονται ως 'Δραστικές Μορφές Οξυγόνου' ("Reactive Oxygen Species", ROS). Κλασσικά παραδείγματα ROS αποτελούν το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) καθώς και η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) [309]. Γενικότερα, τα περισσότερα ROS θεωρούνται επιβλαβή λόγω των κυτταροτοξικών επιδράσεων τους και για το λόγο αυτό το κύτταρο έχει αναπτύξει πολλαπλούς κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας με στόχο τον έλεγχο και τον περιορισμό αυτών. Το οξειδωτικό στρες περιγράφεται ως μία ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Μία από τις κυριότερες αιτίες υπέρμετρης συγκέντρωσης ROS και επαγωγής οξειδωτικού στρες φαίνεται να είναι η μικροβιακή μόλυνση, συμπεριλαμβανομένης και της ιικής [310-313]. Μάλιστα, το επαγόμενο από τη μόλυνση οξειδωτικό στρες συμβάλλει στην ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας και την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών [314, 315].

Προκειμένου να εξουδετερώσουν τις καταστροφικές παρενέργειες του οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτύξει ένα ιδιαίτερο αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό. Ο μηχανισμός αυτός είναι απενεργοποιημένος υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες, ένα ευαίσθητο στην οξειδοαναγωγική ανισορροπία μόριο ενεργοποιείται και επάγει μεταγραφικά μία σειρά κυτταροπροστατευτικών γονιδίων υπεύθυνων για την αποτοξίνωση του κυττάρου. Ο πυρηνικός παράγοντας Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2p45-related factor 2, Nrf2) ανήκει στην κατηγορία των εν λόγω μορίων και αποτελεί έναν από τους πιο καλά μελετημένους αντιοξειδωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες ο οποίος επάγεται από τις μεταβολές του οξειδωτικού στρες ή της συγκέντρωσης ηλεκτροφίλων (electrophile stress) [316].

Ο Nrf2 ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων που αναφέρονται ως «φερμουάρ» λευκίνης (basic region leucine zipper transcription factors, bZIP) [317]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο Nrf2 συνδέεται με την πρωτεΐνη KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1), με αποτέλεσμα αφενός να παραμένει παγιδευμένος στο κυτταρόπλασμα και να μη μεταφέρεται στον πυρήνα και αφετέρου να ευνοείται η αποδόμησή του στο σύστημα ουμπικιουΐνης-πρωτεοσώματος [318, 319]. Αναφορικά με τον ευαίσθητο στο οξειδωτικό στρες μηχανισμό που ενεργοποιεί το μονοπάτι, κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να κατέχουν οι σουλφυδρυλικές ομάδες της πρωτεΐνης KEAP1 [320]. Αναλυτικότερα, αυτά τα κατάλοιπα κυστεΐνης αντιδρούν με οξειδωτικούς παράγοντες και ηλεκτρόφιλα με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η ουμπικιτινίωση του Nrf2 [321], ο οποίος απελευθερώνεται και μεταναστεύει στον πυρήνα όπου σχηματίζει ετεροδιμερή με τις μικρές Maf (small Maf, sMaf) πρωτεΐνες και άλλους συν-παράγοντες. Στη συνέχεια, τα παραπάνω ετεροδιμερή συνδέονται σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA γνωστή ως το στοιχείο απόκρισης ηλεκτροφίλων ή στοιχείο απόκρισης αντιοξειδωτικών (electrophile response element ή antioxidant response element, ErRE ή ARE) που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων του αμυντικού, αντιοξειδωτικού συστήματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων στόχων του Nrf2 περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την οξυγενάση της αίμης 1 (HO1), την NAD(P)H: οξειδοαναγωγή (NQO1), τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), τη τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSH-S-transferase) καθώς και ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεση της γλουταθειόνης [322-325] (**Εικ. 21**).



Εικόνα 21: Επαγωγή του οξειδωτικού στρες από την ιϊκή μόλυνση και την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού. Επακόλουθη ενεργοποίηση του Nrf2 και μεταγραφή των γονιδίων στόχων που συμμετέχουν τον κυτταροπροστατευτικό μηχανισμό και την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας [326].

Η κατανόηση της αμοιβαίας αλληλεπίδρασης μεταξύ του ξενιστή και του ιού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών αντιϊκών στρατηγικών για τον έλεγχο της ιϊκής μόλυνσης. Λόγω του περιορισμένου γονιδιακού μεγέθους του, είναι γνωστό ότι ο ιός δύναται να αξιοποιήσει πλήρως το κυτταρικό περιβάλλον του ξενιστή προς όφελος του. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι όλες οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την επιτυχημένη ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού ικανοποιούνται σε βάρος ποικίλων μεταβολικών διεργασιών του κυττάρου ξενιστή, υπό ένα αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο έτσι ώστε να περιοριστούν οι δυνητικά καταστροφικές παρενέργειες στην συνολική ευημερία του μολυσμένου κυττάρου ξενιστή. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ένα

πλήθος ιών φαίνεται να επάγουν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες προκειμένου να διευκολύνουν την αντιγραφή τους [327-333]. Αυτό το επαγόμενο από τον ιό οξειδωτικό στρες και η ορθή διαχείριση του από το κύτταρο ξενιστή αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Πολλαπλά αντίικά μονοπάτια όπως το μονοπάτι του Toll-like υποδοχέα και της ιντερφερόνης (interferon, IFN) ενεργοποιούνται από το επαγόμενο από τη μόλυνση οξειδωτικό στρες [334, 335]. Αντίθετα, μη αποτελεσματική συντήρηση της απαραίτητης οξεοδοαναγωγικής ισορροπίας από το κύτταρο έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στην ιϊκή παθογένεια και οδηγεί στην επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες απόπτωση [336-338]. Για τον έλεγχο των επιπέδων των ROS, ο ιός φαίνεται να έχει αναπτύξει μηχανισμούς διαχείρισης του Nrf2 παράγοντα προς όφελος του. Πολλές μελέτες αναφέρουν την επαγωγή του Nrf2 σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω επαγόμενου από τον ιό οξειδωτικού στρες [339-345] ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου παρατηρείται καταστολή του Nrf2 παρουσία ιϊκής μόλυνσης [340, 346-351].

Όσον αφορά τον ιό του Δάγκειου πυρετού, μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη μίας αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην παραγωγή οξειδωτικού στρες και στην ανοσοπαθογένεια της ασθένειας. Μάλιστα, σύμφωνα με ανάλυση ολικού μεταγραφώματος δενδριτικών κυττάρων που προήλθαν από ανθρώπινα πρωτογενή μονοκύτταρα φάνηκε η επιλεκτική ενεργοποίηση του Nrf2 μονοπατιού κατόπιν μόλυνσης με DENV [352]. Συγκεκριμένα, η μόλυνση φαίνεται να επάγει την ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων NADPH οξειδασών NOX (NADPH-oxidase, NOX) και η επακόλουθη συσσώρευση ROS αποδεικνύεται απαραίτητη για την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού [352]. Τα γονίδια στόχοι του Nrf2 που ενεργοποιούνται από την μόλυνση με DENV περιλαμβάνουν τα HO-1, NQO1, SOD2, GCLM και GCLC [352]. Η ενεργοποίηση του Nrf2 από τον ιό έχει παρατηρηθεί και σε μονοπύρνα φαγοκύτταρα [344]. Στην περίπτωση αυτή η ιϊκή πρωτεΐνη NS2B φάνηκε να συμμετέχει στην επαγωγή του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, την ενεργοποίηση του Nrf2 και την τελική έκκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor- (TNF-) α , TNF- α) [344]. Επιπλέον, η επαγωγή της HO-1 με παράγοντες όπως η πρωτοπορφυρίνη κοβαλτίου

(cobalt protoporphyrin, CoPP), το ανδρογραφολίδιο (andrographolide) και η lucidone, καταστέλλει την αντιγραφή του DENV και καθυστερεί την επαγόμενη από τον DENV απόπτωση σε μοντέλα ποντικών μέσω ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μορίων και καταστολής της NS2B/NS3 πρωτεάσης [353, 354]. Η NS2B/NS3 πρωτεάση είναι υπεύθυνη για την πέψη του ενδιάμεσου μορίου για την ενεργοποίηση της IRF3 (mediator of IRF3 activation, MITA) καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του RIG-I και της IRF3, εν ολίγοις του IFN τύπου I μονοπατιού του κυττάρου ξενιστή [355]. Επομένως, η επαγωγή της HO-1 είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της μεσολαβούμενης από την IFN αντιϊκής απάντησης [353, 354]. Εντούτοις, πειράματα καταστολής του Nrf2 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης με μεθόδους RNA αποσιώπησης (RNA interference, RNAi) οδήγησαν σε καταστολή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων και παρόλο που παρατηρήθηκε ελάχιστη συσσώρευση του RNA του DENV, η οξειδοαναγωγική ανισορροπία ήταν εμφανής λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS [352]. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε επιπλέον επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την αντιφλεγμονώδη και αποπτωτική απόκριση του κυττάρου [352].

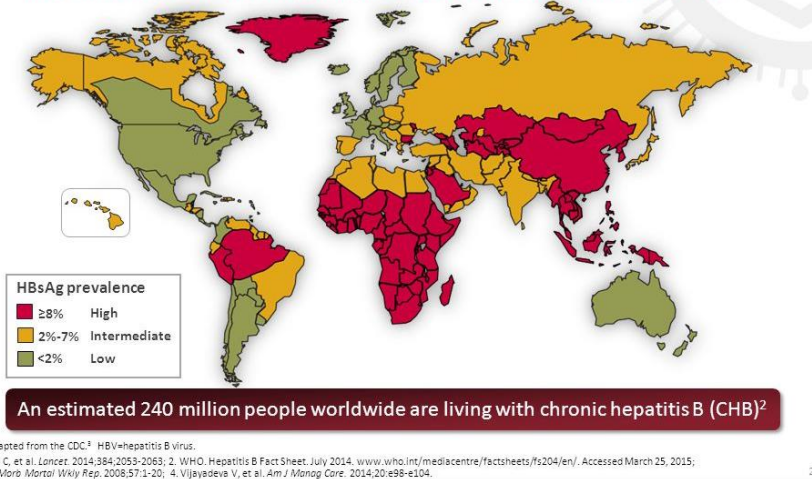
1.5. Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β (HBV)

1.5.1. Γενικά στοιχεία

Ο ιός της Ηπατίτιδας Β (Hepatitis B virus - HBV) ανήκει στο γένος *Orthohepnavirus* της οικογένειας *Hepadnaviridae* και εξαιτίας της ιατρικής του σπουδαιότητας αποτελεί το πιο βασικό και αντιπροσωπευτικό μέλος της [356]. Εξελικτικά δεν έχει συγγένεια με τον HCV και τους άλλους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae*, ωστόσο ο HBV και ο HCV μολύνουν και οι δύο το ήπαρ, προκαλώντας νόσο με παρόμοια συμπτωματολογία, ενώ πολύ συχνά εμφανίζονται σε συμμόλυνση [357]. Ο HBV είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου, με 257 εκατομμύρια ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και 500.000-600.000 θανάτους/έτος λόγω οξείας ηπατίτιδας, κίρρωσης ή ηπατοκυτταρικού καρκίνου [358].

Chronic Hepatitis B Is a Global Health Problem

HBV infection is the most common chronic viral infection in the world¹



Εικόνα 22: Ο HBV είναι παγκοσμίως η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ιογενούς νόσου.

1.5.1.1. Ιστορικά στοιχεία - Κλινική εικόνα λοίμωξης - Τρόποι Μετάδοσης

Η ανακάλυψη του HBV έγινε το 1963, όταν ο γενετιστής Baruch Blumberg ταυτοποίησε το αντιγόνο επιφανείας του ιού, HBsAg (Hepatitis B surface antigen). Κατά τη διάρκεια ενός ανοσολογικού ελέγχου, ο Blumberg κατά τύχη ανακάλυψε το HBsAg στο αίμα ενός Αυστραλού γηγενή και το ονόμασε «Αυστραλιανό αντιγόνο» [359].

Η μόλυνση με HBV μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική λοίμωξη, οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, αλλά και οξείας μορφής ηπατίτιδα που απαιτεί επείγουσα μεταμόσχευση ήπατος. Επιπρόσθετα, μπορεί να αναπτυχθεί χρόνια HBV λοίμωξη, που να οδηγήσει σε κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο [360].

Η οξεία ηπατίτιδα απαντάται κυρίως σε ενήλικες ασθενείς, αφού ο ιός μεταφέρεται μέσω σεξουαλικής επαφής ή μέσω μολυσμένης βελόνας για τους χρήστες τοξικών ουσιών [361]. Μετά την έκθεση στον HBV, ακολουθεί μία περίοδος επώασης, χωρίς συμπτώματα και με φυσιολογικές τιμές ηπατικών ενζύμων [362]. Στη συνέχεια, το άτομο εμφανίζει γενικά συμπτώματα, όπως ναυτία, τάση για εμετό, ανορεξία και κοιλιακό άλγος, με αποτέλεσμα η διάγνωση της ιογενούς λοίμωξης να γίνεται σπανίως [363]. Μόλις το 30% των ασθενών, λόγω εμφάνισης ίκτερου, αναζητά θεραπεία. Στο 95% των περιπτώσεων, τα συμπτώματα υποχωρούν και τα παραγμένα αντισωμάτων έναντι του HBsAg, αποτρέπουν νέα μόλυνση από τον ιό [361]. Η αδυναμία αντιμετώπισης του HBV από το ανοσοποιητικό σύστημα οδηγεί σε εγκαθίδρυση χρόνιας νόσου. Από χρόνια ηπατίτιδα συνήθως πάσχουν άτομα τα οποία μολύνθηκαν κατά την περιγεννητική περίοδο ή παιδιά ηλικίας 3-5 ετών, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα τους δεν ήταν πλήρως ανεπτυγμένο για αντιμετώπιση της μόλυνσης [364]. Διακρίνεται σε δύο μορφές: τη χρόνια εμμένουσα ηπατίτιδα και τη χρόνια ενεργό μορφή ηπατίτιδας [365].

1.5.1.2. Επιδημιολογία-Γονότυποι του HBV

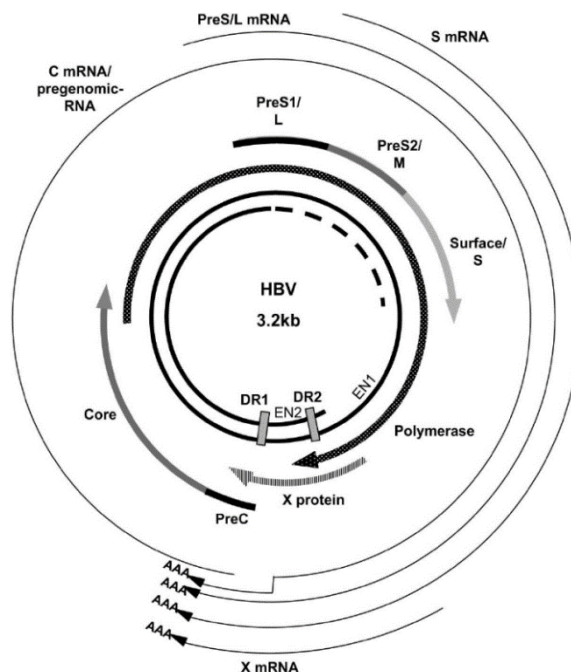
Το γονιδίωμα του HBV παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και έτσι διακρίνεται σε οκτώ γονότυπους, τους A-H [356]. Κάθε γονότυπος διαφέρει τουλάχιστον κατά 8% στην αλληλουχία του γονιδιώματός του και εμφανίζει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή [366]. Στοιχεία όσον αφορά τον επιπολασμό κάθε γονότυπου είναι σημαντικά διότι οι διαφοροποιήσεις αυτές στο γονιδίωμα έχουν άμεση σχέση με την εξέλιξη της νόσου, την κλινική έκβαση και την απόκριση στη θεραπεία [367]. Οι γονότυποι μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος του γονιδιώματος λόγω προσθήκης ή διαγραφής γενετικών τόπων, έτσι οι γονότυποι B, C, F και H έχουν μήκος 3215 νουκλεοτίδια, ο G 3248 και ο D 3182 [368].

1.5.2. Δομή και κύκλος ζωής του HBV

1.5.2.1. Γονιδίωμα του ιού HBV

Ο HBV είναι DNA ιός και το γονιδίωμά του εντοπίζεται στο εσωτερικό του νουκλεοκαψιδίου (**Εικ. 23**). Έχει μορφή κυκλικού, μερικώς δίκλωνου DNA (relaxed-circular DNA - rcDNA) με μέγεθος περίπου 3.200 ζεύγη βάσεων. Στο 5' άκρο της μιας αλυσίδας είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η ιϊκή πολυμεράση [369]. Η μία αλυσίδα είναι πλήρης με μήκος 3020-3320 νουκλεοτίδια, ενώ η δεύτερη ελλιπής, με μήκος 1700-2800 νουκλεοτίδια, δημιουργώντας ένα κενό σημείο, το οποίο συμπληρώνεται *in vivo*, μετά την είσοδο του ιού στο ηπατοκύτταρο [370]. Η αντιγραφή του γονιδιώματος γίνεται μέσω ενδιάμεσου RNA με αντίστροφη μεταγραφή.

Το γονιδίωμα του HBV διαθέτει τέσσερα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF) που αλληλεπικαλύπτονται και εκφράζουν τις πρωτεΐνες του ιού [371]. Περιλαμβάνει το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη δομική πυρηνική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου HBcAg και τη μη δομική, εκκρινόμενη πρωτεΐνη HBeAg. Επίσης, το γονίδιο P, το οποίο εκφράζει την ιϊκή DNA πολυμεράση, τα PreS1/L, PreS2/M και S-γονίδια, που κωδικοποιούν για τις τρεις λιποπρωτεΐνες του φακέλου και τέλος το γονίδιο X, υπεύθυνο για την έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης X. Λόγω του μικρού του μεγέθους, το ιϊκό γονιδίωμα εκφράζει περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, η καθεμία με σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα και την αναπαραγωγή.



Εικόνα 23: Το γονιδίωμα του HBV.[372]

1.5.2.2. Οι πρωτεΐνες του ιού HBV

HBsAg (Hepatitis B surface antigen): Το αντιγόνο επιφάνειας του ιού, γνωστό και ως Αυστραλιανό αντιγόνο. Περιλαμβάνει τρεις γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθος και το στάδιο γλυκοζυλίωσής τους σε μικρή (SHBs-small), μεσαία (MHBs-large middle) και μεγάλη (LHBs-large) [373]. Το καρβοξυτελικό τμήμα που περιέχει την SHBs υφίσταται σε όλες τις επιφανειακές πρωτεΐνες, η preS1 αμινοτελική επέκταση περιέχει μόνο την LHBs ενώ η preS2 τις LHBs και MHBs [362]. Η σύνθεση τους λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μπορεί να παράγονται ποσότητες πέραν του αναγκαίου για την ιϊκή συγκρότηση. Αυτές πολυμερίζονται και δημιουργούν σφαιρικά ή νηματοειδή υποϊικά σωματίδια (subviral particles-SVP) που δεν είναι λοιμογόνα, εμφανίζονται όμως σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τα μολυσματικά σωματίδια, πιθανόν για να προάγουν την ανοσολογική ανοχή [374, 375].

HBcAg (Hepatitis B core antigen): Είναι μια μικρή πρωτεΐνη 21 kDa που συγκροτεί το ιϊκό καψίδιο του HBV, μέσα στο οποίο εγκλείεται το γονιδίωμα του ιού. Συνεπώς, ο ρόλος της είναι κυρίως δομικός, έχει όμως και πολλές άλλες σημαντικές λειτουργίες. Είναι σημαντική πρωτεΐνη σχεδόν για κάθε στάδιο του κύκλου ζωής του ιού όπως για υποκυτταρικές μεταφορές, απελευθέρωση του HBV γονιδιώματος, μεταβολισμό του RNA, συγκρότηση και μεταφορά του καψιδίου και αντίστροφη μεταγραφή [376]. Οι HBcAg και HBeAg κωδικοποιούνται από το ίδιο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ωστόσο η HBcAg δεν εκκρίνεται και δεν συναντάται ελεύθερη στην κυκλοφορία του αίματος.

HBeAg (Hepatitis B envelope antigen): Είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται μεταξύ του εικοσαεδρικού νουκλεοκαψιδίου και του φακέλου του ιού. Η HBeAg ανήκει στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την HBcAg και παράγεται όταν μεταφράζονται στη σειρά τα γονίδια Pre-core και Core. Ο ρόλος της είναι ασαφής, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στην «διαφυγή» του ιοσωματίου από το ανοσοποιητικό σύστημα. Θεωρείται εκκρινόμενη πρωτεΐνη και συγκεντρώνεται στον ορό σαν χαρακτηριστικό ανοσολογικό αντιγόνο. Η ανίχνευσή της σε ασθενή σημαίνει ότι υπάρχει ενεργός ιϊκή αντιγραφή και το άτομο είναι μολυσματικό [377].

HBx (Hepatitis B X antigen): Το μικρότερο από τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 154 αμινοξέων, την HBx. Παράγεται σε μικρές ποσότητες και εντοπίζεται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων [378]. Η πρωτεΐνη X έχει διάφορες λειτουργίες, με πιο βασικές τη μεταγωγή σήματος μέσω σύνδεσης της σε ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες και τις επιδιορθώσεις σφαλμάτων του DNA. Επιπλέον, συμμετέχει σε ακετυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις και δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, η βιολογική σημασία των οποίων παραμένει άγνωστη [379]. Τέλος, έχει συσχετιστεί με την ογκογενή ιδιότητα του HBV, αφού αποσιωπεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 [380].

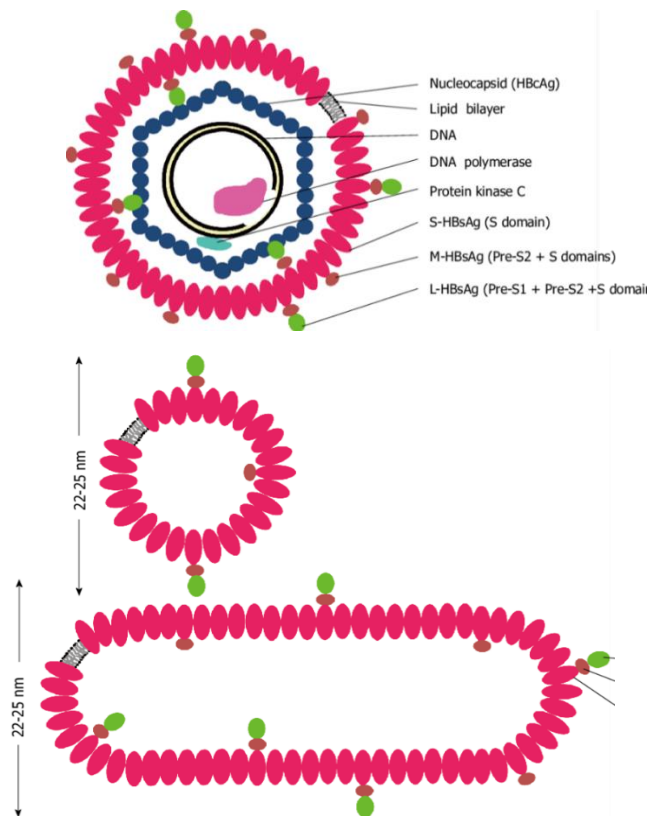
DNA πολυμεράση: Το μεγαλύτερο πλαίσιο ανάγνωσης του ιϊκού γονιδιώματος κωδικοποιεί τη DNA πολυμεράση του HBV, η οποία εντοπίζεται στο ιϊκό σωματίδιο προσδεδεμένη στο καρβοξυτελικό άκρο του DNA. Έχει ρόλο αντίστροφη

μεταγραφάσης, για τη σύνθεση του DNA γονιδιώματος με μήτρα το προγονιδιωματικό RNA (pregenomic RNA - pgRNA), DNA-εξαρτώμενης-DNA-πολυμεράσης, για τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου του DNA και την παραγωγή του rcDNA, καθώς και RNAάσης, για την αποικοδόμηση του pgRNA. Τέλος, παίζει ρόλο στην εγκαψιδίωση του γονιδιώματος [381].

1.5.2.3. Δομή του ιϊκού σωματιδίου

Το ιϊκό σωματίδιο του HBV είναι σφαιρικό, με διάμετρο 42 nm. Το εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο που σχηματίζεται από ομοδιμερή της HBcAg περιβάλλεται από τον ιϊκό φάκελο, που περιλαμβάνει το αντιγόνο επιφανείας HBsAg. Στο νουκλεοκαψίδιο εσωκλείονται το rcDNA και η DNA πολυμεράση, ενώ περιλαμβάνει επίσης την HBeAg **(Εικ. 24)** [374].

Έχουν βρεθεί δύο ακόμη μορφές του HBV, μικρά σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 25 nm και νηματοειδή σωματίδια διαμέτρου 22 nm με διάφορα μήκη. Οι δομές αυτές δεν περιέχουν ιϊκό DNA και άρα δεν είναι μολυσματικές [382]. Δημιουργούνται από το αντιγόνο επιφανείας του ιού και κάποια λιπίδια του ξενιστή. Παράγονται σε περίσσεια σε σχέση με τα μολυσματικά σωματίδια, γι' αυτό και ο εντοπισμός τους στο πλάσμα των ασθενών τα συνιστά διαγνωστικό δείκτη μεγάλης ευαισθησίας, ακόμα και όταν τα επίπεδα του DNA του HBV στο πλάσμα είναι χαμηλά. Δεν έχει διευκρινιστεί ο ρόλος τους, όμως πιθανολογείται ότι λειτουργούν σαν αντιπερισπασμός για το ανοσοποιητικό του ξενιστή, βοηθώντας στην εγκαθίδρυση της χρόνιας λοίμωξης [383].



Εικόνα 24: Η δομή του ιϊκού σωματιδίου του HBV και τα υπο-ϊικά σωματίδια. [384]

1.5.2.4. Κύκλος ζωής του ιού HBV

Στο ήπαρ, το ιϊκό σωματίδιο του HBV προσκολλάται αρχικά στις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (Heparan Sulfate Proteoglycans - HSPG) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη (**Εικ. 25**). Η σύνδεση είναι αναστρέψιμη και μη ειδική, ωστόσο είναι αναγκαία καθώς φέρνει τα ιϊκά σωματίδια κοντά στον ειδικό υποδοχέα του HBV, τον συµμεταφορέα ταυροχολικού νατρίου (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide - NTCP) [377, 385]. Ο υποδοχέας NTCP είναι μια διαµεµβρανική γλυκοπρωτεΐνη υπεύθυνη για την νάτριο-εξαρτώµενη επαναπρόσληψη των χολικών οξέων από το αίµα και εκφράζεται σε αυξηµένη ποσότητα στη µεµβράνη των ηπατικών κυττάρων, εξηγώντας την ειδικότητα του ιού για τον συγκεκριµένο ιστό [386]. Ο HBV συνδέεται ισχυρά στον υποδοχέα µέσω της pre-S1 περιοχής της LHBsAg πρωτεΐνης του φακέλου. Ο ακριβής µηχανισµός εισόδου του ιού στο

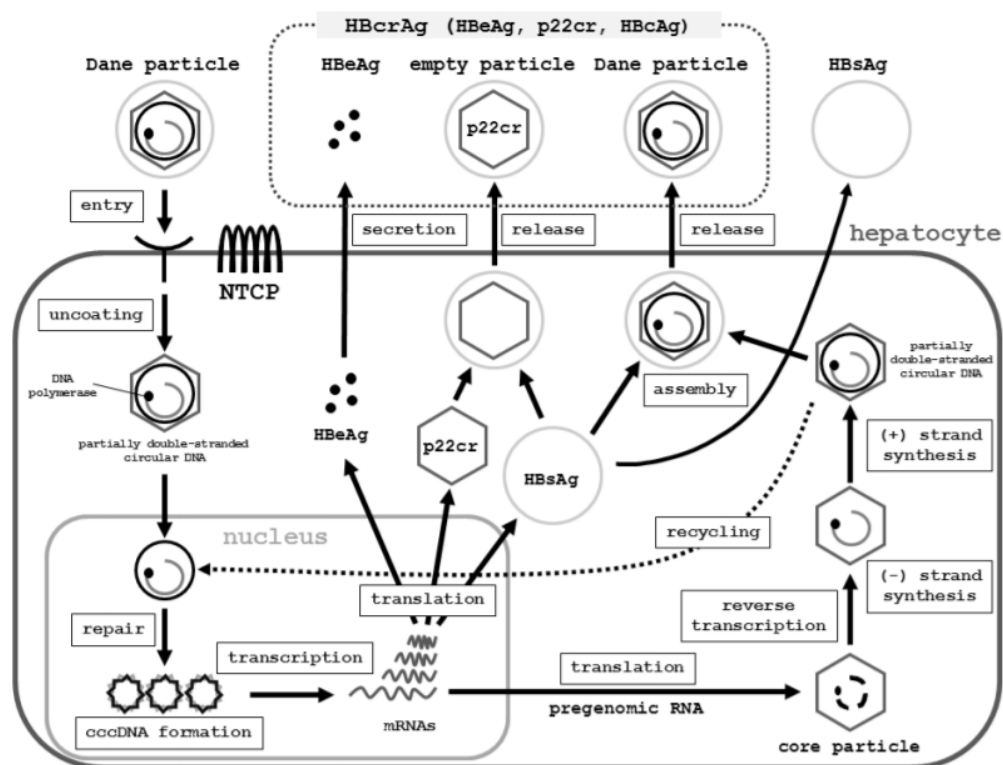
κύτταρο-ξενιστή παραμένει ασαφής, ωστόσο πιθανότατα ακολουθεί ενδοκύττωση και το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρεται στον πυρήνα μέσω κυστιδίων και του δικτύου των μικροσωληνίσκων [387].

Ακολουθεί η είσοδος του rcDNA, μέσω του πυρηνικού πόρου, στο πυρηνόπλασμα, όπου πραγματοποιείται η επιδιόρθωση του γονιδιώματος. Αρχικά, η ημιτελής θετική έλικα του rcDNA συμπληρώνεται από την ιϊκή πολυμεράση κι ακολουθεί απομάκρυνση της πολυμεράσης και των εκκινητών RNA από κυτταρικά ένζυμα. Τελικά, έπειτα από ομοιοπολική σύνδεση των δύο άκρων, δημιουργείται το ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (covalently closed circular DNA-cccDNA), το οποίο οργανώνεται σε δομή χρωματίνης με ιστόνες και σχηματίζει ένα μικροχρωμόσωμα [388, 389].

Το cccDNA λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τη μεταγραφή όλων των ιϊκών RNA, με χρήση του μηχανισμού μεταγραφής των κυττάρων. Συγκεκριμένα, η κυτταρική RNA-πολυμεράση II δημιουργεί από το cccDNA το pgRNA και αρκετά υπογονιδιωματικά μετάγραφα, τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση [390]. Το pgRNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για την αντιγραφή του γονιδιώματος με αντίστροφη μεταγραφή αλλά και σαν mRNA για σύνθεση των πρωτεϊνών Core, Precore και της πολυμεράσης. Από τα υπογονιδιωματικά RNA κωδικοποιούνται η HBx και οι τρεις πρωτεΐνες του φακέλου [391].

Με το τέλος της μετάφρασης, η ιϊκή πολυμεράση προσδένεται σε μία δομή στο 5'-άκρο του pgRNA, που ονομάζεται δομή έψιλον (ϵ), προκαλώντας την αυτόματη συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου. Επιπλέον, η περιοχή ϵ περιέχει τον εκκινητή της αντίστροφης μεταγραφής. Η DNA πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου και στη δεύτερη φάση της αντίστροφης μεταγραφής σχηματίζεται ο θετικής πολικότητας κλώνος DNA. Παράλληλα, ενεργοποιείται η RNAαση H, που διασπά το pgRNA, αφήνοντας μόνο 18 νουκλεοτίδια, που χρησιμοποιούνται σαν RNA-εκκινητής και μεταφέρονται σε διαφορετική θέση του νεοσυντιθέμενου DNA, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό του rcDNA. Στη συνέχεια, η διαδικασία ωρίμανσης του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα ολοκληρώνεται.

Σε ένα μικρό αριθμό νουκλεοκαψιδίων παράγεται δίκλωνο, γραμμικό DNA (double stranded linear DNA, dsIDNA), το οποίο σχηματίζεται έπειτα από αποτυχημένη μετατόπιση του RNA-εκκινητή, που οδηγεί σε αδυναμία σχηματισμού κυκλικού γονιδιώματος. Ωστόσο, το dsIDNA μπορεί είτε να σχηματίσει cccDNA, μετά από μεταφορά του στον πυρήνα, είτε να ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή, κάτι που συνδέεται άμεσα με την ηπατική καρκινογένεση του ιού [392].



Εικόνα 25: Ο κύκλος ζωής του HBV [393]. Συνοπτικά, ο HBV μολύνει τα ηπατοκύτταρα μέσω δέσμευσης στον κυτταρικό υποδοχέα NTCP και εισέρχεται μέσω ενδοκύτωσης. Μετά την είσοδο στο κυτταρόπλασμα, το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρει το ιϊκό rcDNA στον πυρήνα όπου μετατρέπεται σε cccDNA. Το cccDNA χρησιμοποιείται ως μεταγραφική μήτρα για την παραγωγή όλων των ιϊκών RNAs, τα οποία μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου και μεταφράζονται για την παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών. Το pgRNA ενσωματώνεται στο νέο νουκλεοκαψίδιο όπου και

μεταγράφεται αντίστροφα προς *rcDNA*. Επιπλέον, μπορεί να δημιουργηθούν κενά καψίδια που δεν φέρουν *DNA/RNA*. Τα ώριμα νουκλεοκαψίδια που περιέχουν *rcDNA* μπορούν να αποκτήσουν τον φάκελο και να εξέλθουν ως ιϊκό λοιμογόνοι παράγοντες μέσω των πολυκυστιδιακών σωματίων (*multi-vesicle bodies, MVB*) ενώ τα *rgRNA* νουκλεοκαψίδια καθώς και τα κενά καψίδια μπορούν να αποκτήσουν φάκελο και να εξέλθουν ως σωματίδια που παρομοιάζουν ιϊκούς λοιμογόνους παράγοντες.

1.5.3. Μοριακές τεχνολογίες μελέτης του ιού HBV

Η μελέτη του HBV *in vitro* παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες, λόγω των χαμηλών επιπέδων αντιγραφής και της αδυναμίας, μέχρι πρόσφατα, αναπαραγωγής ολόκληρου του κύκλου ζωής του ιού στην κυτταροκαλλιέργεια [394]. Τα πιο κοινά συστήματα μελέτης βασίζονται στις ηπατοκαρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2 και Huh7, οι οποίες δεν μολύνονται από τον HBV, αλλά υποστηρίζουν τη ιϊκή αντιγραφή ύστερα από την εισαγωγή του γονιδιώματος του ιού σε αυτά με επιμόλυνση (*transfection*) [395, 396]. Τα HepaRG είναι μια κυτταρική σειρά, η οποία περιέχει πρόγονα ηπατοκύτταρα που μπορούν να μολυνθούν με τον HBV έπειτα από διαφοροποίησή τους με DMSO [396]. Ωστόσο, απαιτούν πολύπλοκες συνθήκες διαφοροποίησης και τα επίπεδα μόλυνσης είναι χαμηλά [397]. Η κυτταρική σειρά HepAD38 βασίζεται στην HepG2 και φέρει σταθερά το ιϊκό γονιδίωμα, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από την τετρακυκλίνη [398]. Η μελέτη όλων των σταδίων του κύκλου ζωής κατέστη δυνατή με την υπερέκφραση του NTCP υποδοχέα στην κυτταροσειρά HepG2 και χρήση ιϊκών σωματιδίων που παράγονται από την κυτταρική σειρά HepAD38 [399].

Μία πρόκληση κατά τη μελέτη του HBV είναι ο περιορισμένος αριθμός ειδών ζώων που μολύνονται από τον ιό. Το ζωικό μοντέλο που προσομοιάζει περισσότερο στη μόλυνση με HBV στον άνθρωπο, είναι ο χιμπατζής [400]. Η ανοσολογική απόκριση στην ιϊκή μόλυνση μελετήθηκε σε αυτό το μοντέλο και έχει συνεισφέρει κατά πολύ στην κατανόηση της παθογένειας του ιού. Ωστόσο, το υψηλό κόστος και οι περιορισμοί της χρήσης πρωτεύοντων σαν μοντέλα περιορίσαν τη χρήση τους [401].

Τα ποντίκια αποτελούν το καλύτερο *in vivo* σύστημα μελέτης του HBV. Ωστόσο, τα ηπατικά τους κύτταρα δεν είναι δεκτικά στην είσοδο του ιού και δεν υποστηρίζουν την ιϊκή αντιγραφή και τον σχηματισμό cccDNA [402]. Επομένως έχουν καθιερωθεί μοντέλα ποντικών, μεταξύ των οποίων διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν αντιγόνα του HBV (core, envelope, surface), ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια στα οποία επιτρέπεται η ανάπτυξη χρόνιας ηπατικής νόσου που προσομοιάζει με αυτή του ανθρώπου, καθώς και χιμαιρικά ποντίκια με ανθρωποποιημένο ήπαρ, που επιτρέπουν την εμμένουσα μόλυνση με HBV [403, 404].

1.5.4. Θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι της λοίμωξης από τον ιό HBV

1.5.4.1. Εμβολιασμός

Παρότι οι βάσεις τέθηκαν τη δεκαετία του '60, το πρώτο εμβόλιο κατά του HBV εγκρίθηκε το 1981 και το 1991 εντάχθηκε σε όλα τα εθνικά προγράμματα ανοσοποίησης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας [405]. Το εμβόλιο πλέον παρασκευάζεται με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, που εκφράζει μόνο το αντιγόνο επιφανείας HBsAg από τη ζύμη *S.cerevisiae*. Τα προγράμματα ανοσοποίησης έχουν ελαττώσει κατά πολύ τον επιπολασμό της μόλυνσης με HBV σε έμβρυα, παιδιά και εφήβους σε πολλές χώρες. Η χρήση του εμβολίου μπορεί να έχει μετριάσει την εμφάνιση νέων λοιμώξεων, ωστόσο δεν είναι δυνατή η εξάλειψη της νόσου σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη. Επομένως τα επίπεδα χρόνιας ηπατίτιδας Β σε χρήστες τοξικών ουσιών, άτομα αυξημένου κινδύνου λόγω σεξουαλικών δραστηριοτήτων και μετανάστες από χώρες με υψηλή συχνότητα εμφάνισης της νόσου, παραμένουν υψηλά στις αναπτυσσόμενες χώρες [406].

1.5.4.2. Αντι-HBV θεραπείες

Για την αντιμετώπιση της χρόνιας μορφής της νόσου, οι κύριοι στόχοι της θεραπείας είναι τόσο η μείωση του ιϊκού φορτίου όσο και η βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, με σκοπό την παρεμπόδιση ή την επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου

σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο [407]. Οι κυριότερες στρατηγικές αντιμετώπισης του ιού ανάλογα με τον χρόνο θεραπείας για τους χρόνια μολυσμένους ασθενείς είναι δύο: (1) Οι θεραπείες με προκαθορισμένη χρονική διάρκεια που περιλαμβάνουν ανοσορρυθμιστές με τα αντίστοιχα φάρμακα τις ιντερφερόνες και (2) Τις μεγαλύτερης διάρκειας θεραπείες με ανάλογα νουκλεοτιδίων (nucleos(t)ide analogues, NUCs).

Οι ιντερφερόνες κατά του HBV περιλαμβάνουν την ιντερφερόνη α (IFN-α) και την πεγκυλιωμένη της μορφή (peg-IFNα). Η IFN-α αποτελεί πλειοτροπική κυτοκίνη με αντιϊκή, αντιπολλαπλασιαστική και ανοσορρυθμιστική δράση. Αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδιώματος του HBV, τη συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου αλλά και την έξοδο των ιικών mRNA από τον πυρήνα. Επιπλέον, προάγει την απόκριση των NK κυττάρων και των CD8+ T-λεμφοκυττάρων [408]. Η IFN-α εγκρίθηκε ως θεραπεία στις αρχές της δεκαετίας του '90, με πλεονεκτήματα τη μικρή διάρκεια θεραπείας (6-12 μήνες) και την απουσία ανθεκτικών στελεχών και μειονεκτήματα τη συχνή παρεντερική χορήγηση (3 φορές εβδομαδιαίως) και ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ημικρανία και μυαλγία, γαστρεντερικές διαταραχές και κατάθλιψη [409]. Η peg-IFNα φέρει αναβαθμισμένες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, καθώς η πεγκυλίωση, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής του φαρμάκου στο πλάσμα των ασθενών, παρέχει τη δυνατότητα λιγότερο συχνού δοσολογικού σχήματος (μία φορά την εβδομάδα υποδορίως) [410].

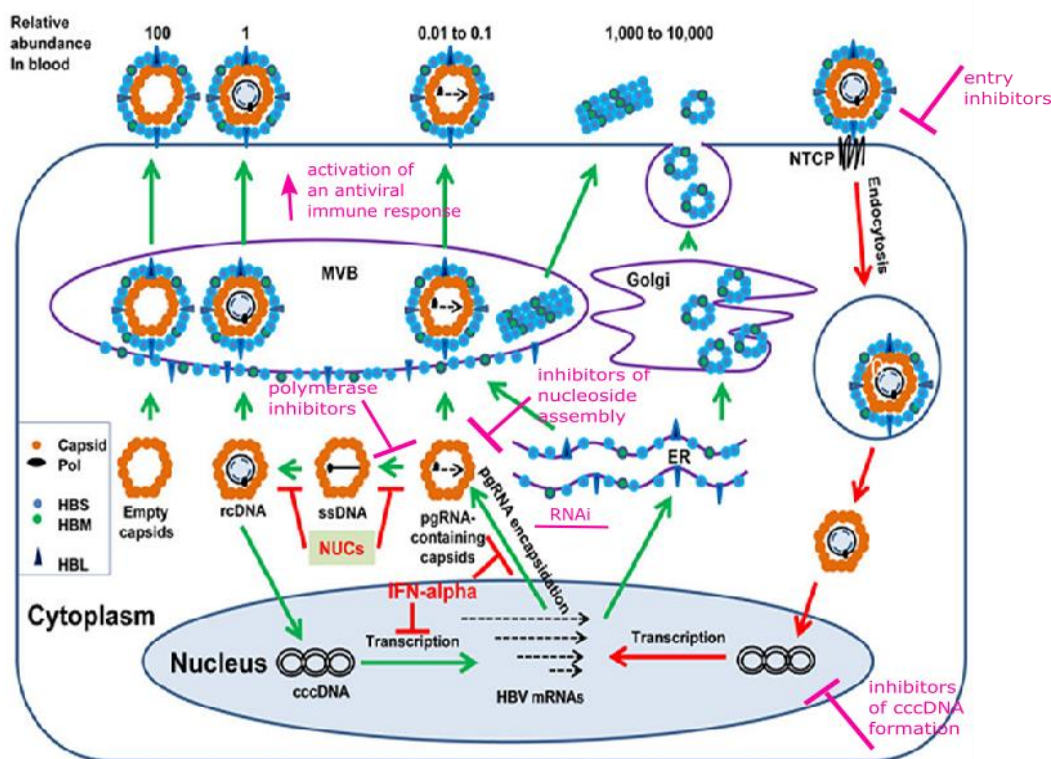
Οι νουκλεοτιδικοί αναστολείς έναντι του HBV είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους με τα φάρμακα tenofovir disoproxil fumarate (TDF), tenofovir alafenamide fumarate (TAF) και entecavir (ETV) [411]. να είναι εγκεκριμένα για χρήση από την U.S. Food and Drug Administration (FDA) και να βρίσκονται στην πρώτη γραμμή αντιϊκής θεραπείας. Μοιάζουν με τα φυσικά νουκλεοτίδια κι έτσι ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA προκαλώντας τερματισμό της επιμήκυνσης και άρα καταστολή του πολλαπλασιασμού του ιού στο στάδιο της της σύνθεσης του rcDNA. [412] Το βασικότερο μειονέκτημα των αναστολέων αυτών είναι η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών που φέρουν μεταλλάξεις κυρίως στην την περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης της DNA πολυμεράσης, κάτι που περιορίζει την κλινική τους χρησιμότητα [413]. Ωστόσο, η αποτυχία των φαρμάκων αυτών να εξαλείψουν πλήρως τον ιό οφείλεται στο γεγονός ότι οι αναστολείς της ιϊκής

πολυμεράσης δεν μειώνουν την ποσότητα του cccDNA, την πυρηνική μορφή του HBV γονιδιώματος που συντίθεται από το rcDNA και υπάρχει ως ένα μικροχρωμόσωμα για την μεταγραφή των ιϊκών mRNAs [414-416]. Επιπλέον, παρά την ικανή καταστολή της αντιγραφής του HBV στο ήπαρ των ασθενών, η δυσλειτουργία της αντιϊκής ανοσολογικής απάντησης παραμένει. Αυτή η αδυναμία του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίσει τα κύτταρα που φέρουν τον HBV και να θεραπεύσει ή να καταστρέψει αυτά που παράγουν τον ιό, λόγω της εξάντλησης των δραστικών T κυττάρων, είναι η κύρια αιτία για την χρόνια HBV λοίμωξη και η μεγαλύτερη πρόκληση στην ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων [417].

Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σε ποικίλες τάξεις μη νουκλεοσιδικών παραγώγων (nonnucleoside, NNUCs) τα οποία μελετώνται ενεργά [418] με στόχο την ανακάλυψη καινοτόμων, ασφαλών και αποτελεσματικών αντιϊκών παραγόντων. Τα παράγωγα αυτά στοχεύουν πολλαπλούς ιϊκούς στόχους εκτός της HBV πολυμεράσης και μπορεί να αποτελέσουν λύση στα προβλήματα που σχετίζονται με την αναπτυσσόμενη ανθεκτικότητα έναντι των NUCs [419]. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε να συνδυαστικά σχήματα με γνωστούς αναστολείς με αποτέλεσμα την βελτιωμένη απόκριση στις τωρινές θεραπείες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και εμβόλια για την πρόληψη της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Β με τα ENGERIX-B, Recombinax HB και HEPLISAV-B να έχουν εγκριθεί από την FDA [420] ενώ άλλα να βρίσκονται σε προκλινικές ή κλινικές δοκιμές [421]. Εντούτοις, η ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων με στόχο την πλήρη εξάλειψη του ιού σε μολυσμένους ασθενείς παραμένει. Οι νέες στρατηγικές περιλαμβάνουν την ανάπτυξη αντι-ιϊκών παραγόντων που στοχεύουν διάφορα ιϊκά στοιχεία (**Εικ.26**). Συγκεκριμένα, αναπτύσσονται αναστολείς της HBV αντιγραφής που στοχεύουν στην είσοδο του ιού στα ηπατοκύτταρα (π.χ. myrcludex B [422]), στην HBV πολυμεράση [423] αλλά και στην σύνθεση του νουκλεοκασιδίου (π.χ. GLS4, NVR 3-778 και AB-423 [424, 425]). Ένας εξαιρετικά σημαντικός στόχος στην αντι-HBV έρευνα είναι η εξάλειψη ή αναστολή λειτουργίας του cccDNA μέσω άμεσης στόχευσης του ίδιου του μικροχρωμοσώματος ή μέσω στόχευσης των HBV

πρωτεϊνών καψιδίου και της HBx [423]. Τέλος, το πλέον λειτουργικό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών είναι το φυσικό μονοπάτι της RNAi αποσιώπησης, η αξιοποίηση του οποίου μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη εκκαθάριση του επιφανειακού αντιγόνου HBsAg από την κυκλοφορία των ασθενών. Το παγκόσμιο πρόγραμμα νεογνικού εμβολιασμού είναι διαθέσιμο στις περισσότερες χώρες και δύναται να συμβάλει στην εξάλειψη του HBV στα επόμενα 80-100 χρόνια . Η ανάπτυξη μίας HBV θεραπείας θα επιταχύνει την παγκόσμια εξουδετέρωση του ιού και θα αποτρέψει πολλούς σχετιζόμενους με τον HBV θανάτους.



Εικόνα 26: Οι στόχοι των εγκεκριμένων αντιϊκών θεραπειών και των πειραματικών στρατηγικών. Φαίνεται χαρακτηριστικά με κόκκινο χρώμα η δράση των εγκεκριμένων θεραπειών με την IFN-α να συμβάλλει στην καταστολή της μεταγραφής του cccDNA καθώς και στην αναστολή της ενδοκαψιδίωσης του pgRNA ενώ τα NUCs στην καταστολή της HBV DNA πολυμεράσης. Με ροζ χρώμα απεικονίζονται οι σύγχρονες στρατηγικές

αναστολής του HBV και συγκεκριμένα οι ειδικοί αναστολείς της εισόδου, της σύνθεσης του cccDNA, της ιϊκής πολυμεράσης, της σύνθεσης του νουκλεοκαψιδίου καθώς και το RNAi και η ενεργοποίηση μίας αντιϊκής ανοσοαπόκρισης (Αναπροσαρμογή από [423]).

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μόλυνση με τον ιό του Δάγγειου πυρετού είναι μία άκρως απειλητική για τη ζωή λοίμωξη στις τροπικές χώρες. Η έρευνα για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου που θα προστατεύει ικανοποιητικά και από τους 4 ορότυπους με ελάχιστες παρενέργειες στον άνθρωπο, συνεχίζεται. Είναι γνωστό ότι μόλυνση με DENV μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων εκ των οποίων ολόένα και μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στις, μέχρι πρότινος, μη συνηθισμένες νευρολογικές επιπλοκές με την αιτιολογία του φαινομένου αυτού να παραμένει, ωστόσο, άγνωστη. Πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ ανέδειξαν την αλληλεπίδραση μεταξύ της L-Dora αποκαρβοξυλάσης (DDC) και της ιϊκής μόλυνσης με τους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae* [197]. Η DDC αποτελεί κύριο ρυθμιστή της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας όντας το υπεύθυνο ένζυμο για την σύνθεση των βιογενών αμινών, των κατεξοχήν απαραίτητων μορίων για την νευροδιαβιβαστική λειτουργία του ΚΝΣ με εξίσου σημαντικό ρόλο, όμως, στην σηματοδότηση που λαμβάνει χώρα στους περιφερικούς ιστούς. Επιπλέον, η DDC κατέχει καθοριστικό ρόλο σε κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη κυτταρική βιωσιμότητα και απόπτωση [157], τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται από την ιϊκή μόλυνση. Ταυτόχρονα, τα προϊόντα της (ισταμίνη) ή υποδοχείς τους (υποδοχείς ντοπαμίνης D2 και D4) παίζουν ρόλο στην είσοδο του DENV [190, 426].

Με βάση τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα του εργαστηρίου, στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε εκτενέστερη μελέτη της αμφίροπης αρνητικής σχέσης που φαίνεται να επικρατεί μεταξύ της DDC και της μόλυνσης με DENV. Η επαγωγή καθώς και η καταστολή της έκφρασης αλλά και της ενζυμικής ενεργότητας μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους στον ιϊκό

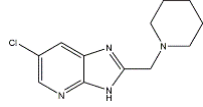
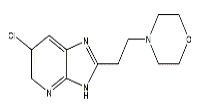
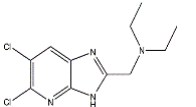
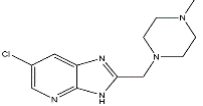
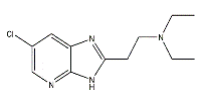
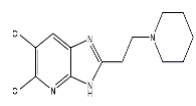
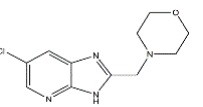
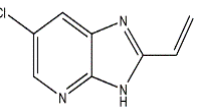
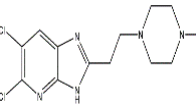
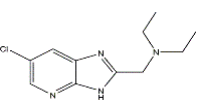
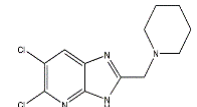
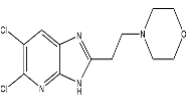
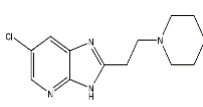
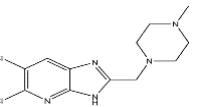
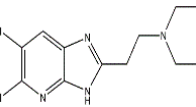
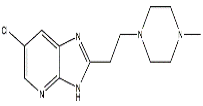
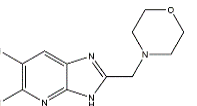
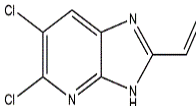
πολλαπλασιασμό. Σε δεύτερο χρόνο, η μελέτη επεκτάθηκε στο μεταβολικό μονοπάτι εκατέρωθεν της βιοσύνθεσης των προϊόντων της DDC. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις οξειδάσες των μονοαμινών (MAO), ένζυμα υπεύθυνα για την αποικοδόμηση των ελεύθερων στο κυτταρόπλασμα αμινών, καθώς και στους κυστιδιακούς μεταφορείς μονοαμινών (VMATs) που είναι υπεύθυνοι για την αποθήκευση τους στα εκκριτικά κυστίδια. Ακολούθως, για την κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών, μελετήθηκε η ενδεχόμενη συσχέτιση του οξειδωτικού στρες, απόρροια της δυσλειτουργίας του μεταβολικού μονοπατιού των μονοαμινών, με τον ιϊκό πολλαπλασιασμό, εστιάζοντας στην σημασία της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στην έκβαση της μόλυνσης με DENV.

Επιπλέον, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε μία σειρά καινοτόμων αντιϊκών ουσιών ως προς τη δράση τους έναντι του ιού της Ηπατίτιδας Β (HBV). Ο HBV είναι η συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου [358] και παρόλο που υπάρχουν εμβόλια που έχουν εγκριθεί από την FDA [420] ή βρίσκονται σε προκλινικές ή κλινικές δοκιμές [421], η ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων με στόχο την πλήρη εξάλειψη του ιού σε μολυσμένους ασθενείς παραμένει. Τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα βρίσκονται στην πρώτη γραμμή έρευνας στην αντι-HBV θεραπεία και μία κατηγορία αυτών, τα παράγωγα βενζιμιδαζολών που φέρουν μία ευρεία ποικιλία πιθανών υποκαταστάσεων έχει αποδειχθεί ότι κατέχουν ικανή αντι-HBV δραστηριότητα [427]. Με βάση αυτό το σκεπτικό και εν συνεχεία πειραμάτων από την ομάδα των Καθηγητών Π. Μαράκος και Ν. Πουλή (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) που οδήγησαν στην ανακάλυψη βιοενεργών ισοστέρων πουρίνης [428-430], σχεδιάστηκε και συντέθηκε μία σειρά καινοτόμων ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δράση τους ως πιθανοί αναστολείς του HBV. Η αντί-HBV δραστηριότητα τους εκτιμήθηκε σε *in vitro* σύστημα μόλυνσης χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HepG2-NTCP. Από το σύνολο των αναστολέων που ελέγχθηκαν, μελετήθηκε ο πιθανός μηχανισμός δράσης επιλεγμένων ομάδων ενώσεων, εστιάζοντας στην εξακρίβωση του σταδίου που στοχεύουν στον ιϊκό κύκλο ζωής.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Μία σειρά καινοτόμων ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών σχεδιάστηκε και συντέθηκε από την ομάδα των Καθηγητών Π. Μαράκος και Ν. Πουλή (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ). Οι ενώσεις αναδιαλύθηκαν σε DMSO σε συγκέντρωση 50, 20 ή 10 mM και παρατίθενται στον Πίνακα 1.

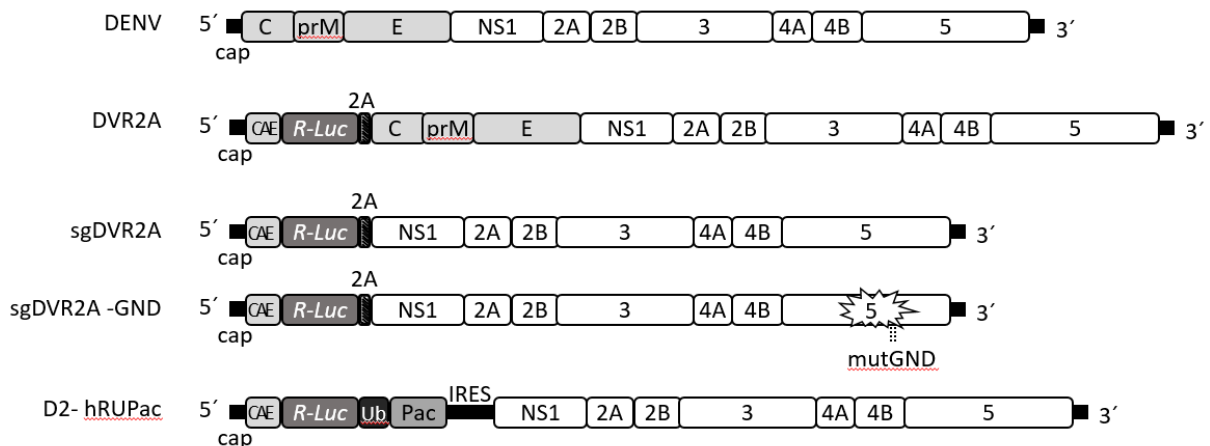
Ανάλογο	χημική δομή	Ανάλογο	χημική δομή	Ανάλογο	χημική δομή
19a		20c		22a	
19b		20d		22b	
19c		21a		22c	
19d		21b		22d	
20a		21c		23	
20b		21d		24	

Πίνακας 1. Χημικές δομές νουκλεοσιδικών αναλόγων.

2.2. ΙΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ

Οι ιικές αλληλουχίες του DENV που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στον ορότυπο 2 (DENV2), στέλεχος 16681 και παρουσιάζονται σχεδιαγραμματικά στην **Εικόνα 27**. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η πλήρης ιική αλληλουχία pFK-DVs, καθώς και η

προερχόμενη από αυτή ρFK-DVR2A, η οποία φέρει ως γονίδιο αναφοράς τη *Renilla* λουσιφεράση (R-Luc) μεταξύ της καψιδιακής αλληλουχίας κυκλοποίησης (capsid cyclization sequence) CAE (πρώτα 25 αμινοξέα της C) και το πεπτιδίο τομής 2A του *Thosea asigna virus* (TaV) (προσφορά του Prof. Ralf Bartenschlager, Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, Γερμανία) [66]. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν τα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια ρFK-sgDVR2A, και ρFK-sgDVR2A-GND (προσφορά του Prof. Ralf Bartenschlager, Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, Γερμανία), τα οποία φέρουν *Renilla* λουσιφεράση μεταξύ της αλληλουχίας CAE και του πεπτιδίου 2A, ακολουθούμενα από τις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού (NS1-NS5). Το ρεπλικόνιο ρFK-sgDVR2A-GND φέρει επίσης μεταλλαγή στο ενεργό κέντρο της NS5 πολυμεράσης, που καθιστά αδύνατη την αντιγραφή [66, 431]. Τέλος, το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο ρD2-hRUPac (προσφορά του Prof. Charles Rice, Πανεπιστήμιο Rockefeller, ΗΠΑ) φέρει την κασέτα hRUPac (human R-Luc-Ubi-Pac), η οποία εκφράζει τη *Renilla* λουσιφεράση και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη, υπό τον μεταφραστικό έλεγχο του 5' UTR, καθώς και τις μη δομικές πρωτεΐνες υπό το μεταφραστικό έλεγχο του IRES του EMCV [432]. Το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη επιτρέπει την κατασκευή κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά το ρεπλικόνιο, ύστερα από επιλογή με το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλουχιών του *DENV*.

του υποκινητή H1, τη θηλειά TCAAGAG και εκατέρωθεν την συμπληρωματική αλληλουχία ως προς το γονίδιο στόχο. Επιπλέον, η κατασκευή φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη καθώς και το γονίδιο αναφοράς eGFP.

2.4. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Huh7: Η κυτταροσειρά Huh7 (προσφορά του Prof. Ralf Bartenschlager, Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, Γερμανία) είναι μια καλά διαφοροποιημένη καρκινική κυτταρική σειρά προερχόμενη από ανθρώπινα ηπατοκύτταρα και ελήφθησαν αρχικά από όγκο ήπατος. Αυτά τα κύτταρα τυπικά αναπτύσσονται ως δισδιάστατες μονοστοιβάδες. Ανάμεσα στις γονιδιωματικές τροποποιήσεις τους περιλαμβάνεται μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο p53 [435].

Huh7-D2: Κυτταρική σειρά βασισμένη στη Huh7. Κατασκευάστηκε με εισαγωγή του RNA του υπογονιδιωματικού ρεπλικονίου pD2-hRUPac, του DENV οροτύπου 2 (στέλεχος 16681). Το ρεπλικόνιο διατηρείται στα κύτταρα με προσθήκη 0,5 μg/ml πουρομυκίνη.

HepAD38: Κυτταρική σειρά που βασίζεται στην HepG2 και φέρει σταθερά, παρουσία 400 μg/ml G418, το cDNA του pgRNA του HBV υποτύπου ayw, η έκφραση του οποίου ελέγχεται με ένα υποκινητή τετρακυκλίνης (προσφορά του Prof. Stephan Urban, Πανεπιστήμιο της Χαϊδελβέργης, Γερμανία). Συγκεκριμένα, παρουσία του αντιβιοτικού τετρακυκλίνης καταστέλλεται η μεταγραφή του HBV, ενώ αν αφαιρεθεί από το υλικό καλλιέργειας, τα κύτταρα παράγουν ιϊκά σωματίδια του HBV [398].

HepG2-NTCP: Κυτταρική σειρά που βασίζεται στην HepG2 και προήλθε ύστερα από υπερέκφραση του NTCP υποδοχέα με εισαγωγή του αντίστοιχου πλασμιδίου (προσφορά του Dr. Christoph Seeger, Fox Chase Center, ΗΠΑ) [399]. Καλλιεργείται παρουσία 5 μg/ml πουρομυκίνης.

2.5. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Για τον πολλαπλασιασμό πλασμιδίων που φέρουν τις ιικές αλληλουχίες ή εκφράζουν πρωτεΐνες σε κύτταρα θηλαστικών, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *E.coli* XL1-

Blue (Stratagene) με γονότυπο *F' recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*. Η ανάλυση του γονοτύπου είναι η εξής:

F': περιέχει το επίσωμα F που φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη, και το γονίδιο που χρησιμεύει για την βιοσύνθεση της προλίνης

recA1: εμποδίζει την παραγωγή μιας DNA εξαρτώμενης ATPase που είναι απαραίτητη για τον ομόλογο ανασυνδυασμό επιτυγχάνοντας έτσι τη σταθερότητα των πλασμιδίων

endA1: η δράση της μη ειδικής ενδονουκλεάσης I έχει χαθεί οπότε το στέλεχος δίνει τη δυνατότητα για DNA διεργασίες υψηλής ποιότητας

gyrA96: μετάλλαξη της DNA γυράσης που προσδίδει ανθεκτικότητα στο ναλαδιξικό οξύ

thi-1: το στέλεχος απαιτεί θυαμίνη για την ανάπτυξη σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό

hsdR17: καταργεί τον περιορισμό αλλά όχι και την μεθυλίωση σε θέσεις r-m-εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του πλασμιδιακού DNA με το οποίο μετασχηματίζεται

supE44: πρόκειται για amber κατασταλτικό στέλεχος που εισάγει γλουταμίνη σε ένα κωδικόνιο UAG επιτρέποντας την ανάπτυξη πλασμιδίων με amber μεταλλαγές

relA1: άγνωστος ρόλος

lac: δεν είναι ικανό να χρησιμοποιήσει λακτόζη

2.6. ΧΗΜΙΚΑ

Στα πλαίσια της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί αναστολείς πρωτεϊνών, οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής χημικά:

- **Ριμπαβιρίνη** (Ribavirin, Abcam): Φάρμακο με αντι-ϊική δράση.
- **Πεγκυλιωμένη Ιντερφερόνη α2b** (pegylated interferon α2b, Peg-IFN,): Φάρμακο με αντι-ϊική δράση.
- **Ανηγμένη γλουταθειόνη** (reduced L-Glutathione, Sigma): Χημικό με αντιοξειδωτική δράση.
- **5-υδροξυτρυπτοφάνη** (5-hydroxytryptophan - 5-HTP, Sigma): Υπόστρωμα του ενζύμου DDC που μετατρέπεται σε σεροτονίνη

- **L-Dopa** (Sigma): Υπόστρωμα του ενζύμου DDC που μετατρέπεται σε ντοπαμίνη
- **Reserpine** (Sigma): Αναστολέας των κυστιδιακών μεταφορέων μονοαμινών (VMAT)
- **Clorgyline** (Sigma): Αναστολέας των οξειδασών μονοαμινών A (MAO A)
- **Phenelzine** (Sigma): Αναστολέας των οξειδασών μονοαμινών A και B (MAO A, B)
- **Forskolin** (Sigma): Ενεργοποιητής της αδενυλικής κυκλάσης που οδηγεί στην αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP.
- **PMA** (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma): Ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C

2.7. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.7.1. Χημική μέθοδος προετοιμασίας δεκτικών βακτηρίων

Για την παραγωγή δεκτικών βακτηρίων ικανά να μετασχηματιστούν, χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο και είναι τα εξής:

- LB (5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract, 10 g/l tryptone)
- LB-agar (40 g/l)
- 0,1 M CaCl₂

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες (φλόγα) και έχει ως εξής:

Την πρώτη μέρα, βακτήρια από ήδη υπάρχων στοκ στρώνονται (streaking) σε τρυβλία με LB-agar με 13 μg/ml τετρακυκλίνη και επωάζονται για 16 ώρες στους 37 °C.

Την δεύτερη μέρα, εμβολιάζεται μία μεμονωμένη αποικία σε 25 mL LB και με 13 μg/ml τετρακυκλίνη, για την παραγωγή κορεσμένης καλλιέργειας βακτηρίων. Τα βακτήρια επωάζονται για 16 ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση.

Την τρίτη μέρα, η καλλιέργεια των 25 ml εμβολιάζεται σε 500 mL LB χωρίς αντιβιοτικό και 1 ml από το μείγμα φυλάσσεται για μέτρηση. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση μέχρι τα βακτήρια να φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία προσδιορίζεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (OD) στα 600 nm (LB ως τυφλό). Όταν το OD₆₀₀ είναι περίπου ίσο με 0,55, συνήθως ύστερα από 1-2 ώρες επώασης, η καλλιέργεια ψύχεται στον πάγο και έπειτα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 5000 rpm, 4 °C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 125 ml κρύο CaCl₂ 0,1 M και επωάζεται για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 5000 rpm, 4 °C και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 21,5 ml κρύο CaCl₂ 0,1 M. Τέλος, προστίθενται 3,5 ml γλυκερόλης και το βακτηριακό εναιώρημα μοιράζεται σε aliquots του 0,5-1 ml σε προψυγμένα erpendorf του 1,5 ml. Τα βακτηριακά στοκ φυλάσσονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.7.2. Μετασχηματισμός βακτηρίων με τη βοήθεια θερμικού σοκ

Δεκτικά βακτήρια *E. coli* από υπάρχον στοκ που βρίσκεται στους -80 °C ξεπαγώνουν ομαλά στον πάγο. Στη συνέχεια, τα βακτήρια ανακατεύονται καλά με τη χρήση πιπέτας και 200 μl του εναιωρήματος μεταφέρονται σε προψυγμένο erpendorf του 1,5 ml. Στο εναιώρημα των βακτηρίων προστίθεται μέχρι 0,5 μg από πλασμιδιακό DNA ή μία αντίδραση ligation, με το οποίο θα γίνει ο μετασχηματισμός των βακτηρίων.

Ύστερα από απαλή ανάδευση, το erpendorf τοποθετείται στον πάγο για 30 λεπτά και ύστερα ακολουθεί το θερμικό σοκ: 2 λεπτά στους 42 °C και 3 λεπτά στον πάγο. Αυτή η εναλλαγή θερμοκρασιών οδηγεί στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών θερμικού σοκ που βοηθούν να πραγματοποιηθεί ο μετασχηματισμός, καθώς και στη διάνοιξη και απότομο κλείσιμο των πόρων της μεμβράνης με ταυτόχρονη απορρόφηση του προσκολλημένου στα κυτταρικά τοιχώματα πλασμιδιακού DNA.

Στη συνέχεια, προστίθεται 1 ml θρεπτικού υλικού LB χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών και το erpendorf επωάζεται στους 37 °C για 60 λεπτά. 100 μl του βακτηριακού εναιωρήματος επιστρώνεται σε τρυβλίο LB-agar με 100 μg/ml αμπικιλίνη, το οποίο επωάζεται ανεστραμμένο στους 37°C, τουλάχιστον για 18

ώρες. Παράλληλα, ως δείγμα ελέγχου (control), χρησιμοποιούνται βακτήρια στα οποία δεν έχει προστεθεί πλασμιδιακό DNA, για επιβεβαίωση δεν υπάρχουν επιμολύνσεις.

Για την παρασκευή τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υλικό LB-agar 40 g/l, η σκόνη αναμειγνύεται σε απεσταγμένο νερό, ανακινείται καλά, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και αφού κρυώσει σε ανεκτή θερμοκρασία, μοιράζεται υπό στείρες συνθήκες (λύχνος Bunsen) σε τρυβλία. Αν είναι απαραίτητο, πριν το μοίρασμα προστίθεται αντιβιοτικό. Τα τρυβλία φυλάσσονται μέχρι τη χρήση στους 4 °C.

2.7.3. Δημιουργία καλλιέργειας βακτηρίων – βακτηριακό ίζημα

Υγρό θρεπτικό LB, στο οποίο έχει προστεθεί (συνήθως) 100 µg/ml αμπικιλίνη, μοιράζεται υπό στείρες συνθήκες σωλήνες τύπου universal ή κωνικές φιάλες. Το LB εμβολιάζεται με μία μονήρη βακτηριακή αποικία, η οποία λαμβάνεται από το αντίστοιχο τρυβλίο με αποστειρωμένο tip. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C, υπό ανάδευση 200 rpm για 18 ώρες.

Για να αποκτηθεί βακτηριακό ίζημα (pellet), η καλλιέργεια μεταφέρεται σε κατάλληλα δοχεία φυγοκέντρησης ή σωλήνες τύπου Falcon και φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ το ίζημα στραγγίζεται σε απορροφητικό χαρτί και είτε χρησιμοποιείται άμεσα ή αποθηκεύεται στους -20 °C.

2.7.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας (midiprep) με χρήση στηλών που βασίζονται σε ιοντοανταλλακτική μέθοδο

Το βακτηριακό ίζημα (pellet) που έχει προέλθει από βακτηριακή καλλιέργεια (περίπου 200 ml) με high ή low copy πλασμίδιο, επαναδιαλύεται και γίνεται απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα (midiprep) με χρήση στηλών με το NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Όπως και για το αντίστοιχο πρωτόκολλο μικρής κλίμακας, η λύση των βακτηριών βασίζεται σε μέθοδο αλκαλικής λύσης και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζεται σε χρήση ιοντοανταλλακτικών στηλών. Τα στάδια απομόνωσης των high copy πλασμιδίων παρουσιάζονται παρακάτω συνοπτικά. Για τα low copy πλασμίδια χρησιμοποιούνται διπλάσιοι όγκοι των διαλυμάτων RES, LYS και NEU.

- Προσθήκη 8 ml διαλύματος RES με διαρκή ανάδευση και μεταφορά σε 50 ml falcon.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος LYS, ήπια ανάδευση για να μην σπάσει και διασκορπιστεί το χρωμοσωμικό DNA και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 8 ml διαλύματος NEU, ήπια ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 5.000 g.
- Τοποθέτηση στήλης NucleoBond Xtra Column με φίλτρο σε ένα 50 ml falcon και κυκλική διάβρεξη του φίλτρου με 12 ml διαλύματος EQU.
- Φόρτωμα του υπερκειμένου της παραπάνω φυγοκέντρησης στο φίλτρο της στήλης.
- Πλύσιμο κυκλικά του φίλτρου και της στήλης με 5 ml διαλύματος EQU, πέταμα του φίλτρου αφού στραγγίξει.
- Πλύσιμο στήλης με 8 ml διαλύματος WASH και έπειτα τοποθέτηση της στήλης σε νέο 50 ml falcon.
- Έκλουση του πλασμιδιακού DNA με προσθήκη 5 ml διαλύματος ELU (προθερμασμένου στους 50 °C) και αφαίρεση της στήλης.
- Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με προσθήκη 3,5 ml ισοπροπανόλης και φυγοκέντρηση του falcon στα 15.000 g στους 4 °C για 30 λεπτά.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου της φυγοκέντρησης.
- Πλύσιμο του πλασμιδιακού DNA ιζήματος με προσθήκη 2 ml διαλύματος 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση του falcon στα 15.000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσεκτική αφαίρεση του υπερκειμένου της φυγοκέντρησης.
- Ξήρανση του πλασμιδιακού DNA ιζήματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 g.
- Επαναδιάλυση του πλασμιδιακού DNA με τον κατάλληλο όγκο ddH₂O και μεταφορά σε 1,5 ml erpendorf.

Το midiprep φωτομετρείται στα 260 nm σε nanodrop και (με ddH₂O ως τυφλό) και φυλάσσεται στους -20 °C.

2.7.5. Πέψη με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ειδικά ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο δίκλωνο DNA, μεγέθους 4-8 νουκλεοτιδίων. Απομονώνονται από βακτήρια από τα οποία παίρνουν και τα αντίστοιχα ονόματά τους και ο φυσιολογικός ρόλος τους είναι η προστασία του βακτηρίου από την εισβολή ξένου DNA. Ο όρος ενδονουκλεάσες τους έχει δοθεί γιατί κόβουν στο εσωτερικό του δίκλωνου DNA, όχι στα άκρα του, ενώ ο όρος περιοριστικές έχει δοθεί λόγω της ειδικής αναγνώρισης μόνο ξένου DNA, δηλαδή μόνο εκεί περιορίζεται η δράση τους. Λόγω της συμπληρωματικότητας του DNA, τα ένζυμα αυτά κόβουν και τις δύο αλυσίδες σε συγκεκριμένες θέσεις και έτσι δημιουργούν συνήθως μονόκλωνες συμπληρωματικές ουρές στο DNA.

Μία ενζυμική αντίδραση πέψης πραγματοποιείται συνήθως σε eppendorf του 1,5 mL, μέσα στο οποίο τοποθετούνται τα εξής αντιδραστήρια:

1. Το πλασμιδιακό DNA που προορίζεται για πέψη. Συνήθως χρησιμοποιούνται 10-20 µg DNA σε 100-200 µl αντίδρασης για διαδικασία που χρειάζεται απομόνωση του κομμένου DNA, και 0,5-1 µg σε 20 µl αντίδρασης για απλό έλεγχο των κομμένων τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.
2. Το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού (New England Biolabs). Ο όγκος του ενζύμου δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης, ενώ πρέπει επίσης να προστίθεται πάντα τελευταίο. Συνήθως, το 1 µl ενζύμου περιέχει 10 ή 20 u (ανάλογα με τον κατασκευαστή) , ενώ 1 u ενζύμου μπορεί να κόψει 1 µg DNA.
3. Το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο που χρησιμοποιείται, το οποίο πρέπει να βρίσκεται σε συγκέντρωση 1x στον τελικό όγκο της αντίδρασης.
4. ddH₂O ως τον επιθυμητό όγκο της αντίδρασης (συνήθως μέχρι 200 µl).

Με την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων, γίνεται ανάδευση στο μίγμα και ύστερα αυτό επωάζεται για 5 ώρες στη θερμοκρασία βέλτιστης απόδοσης του ενζύμου (συνήθως 37 °C).

Ακολουθεί έλεγχος της ολοκλήρωσης της πέψης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, καθώς και πρωτόκολλο απομόνωσης του DNA για τις μετέπειτα διαδικασίες.

2.7.6. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης έχει εφαρμογή στην ανάλυση καθώς και στον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων. Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50x (242 gr Tris-HCl, 57,1 ml glacial acetic acid, 100 ml EDTA 0,5 M pH 8.0 και dH₂O μέχρι 1000 ml) αραιώνεται σε συγκέντρωση 0,5x. Ο όγκος του διαλύματος TAE 0,5x κυμαίνεται από 100-300 ml, ανάλογα με την ποσότητα αγαρόζης που χρειάζεται. Σε αυτό προστίθεται 0,9-2% αγαρόζη, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA ή RNA που πρόκειται να αναλυθούν. Μόρια νουκλεϊκών οξέων με μεγαλύτερο μέγεθος διαχωρίζονται σε πηκτώματα με μικρότερο ποσοστό αγαρόζης και αντίστροφα.

Το μίγμα αγαρόζης-TAE θερμαίνεται σε θάλαμο μικροκυμάτων μέχρι να γίνει εντελώς διαυγές το μίγμα. Αφού κρυώσει σε ανεκτή θερμοκρασία (40-45 °C), προστίθενται 1-3 μl 10 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma) και το μίγμα αναδεύεται. Το βρωμιούχο αιθίδιο εισχωρεί στα ζεύγη βάσεων των νουκλεϊκών οξέων και είναι υπεύθυνο για τον φθορισμό που παρατηρείται με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία. Μετά την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου, το πήκτωμα αφήνεται να πήξει σε κατάλληλο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης, όπου έχει τοποθετηθεί ειδικό χτένι για το σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης των δειγμάτων. Μετά την πήξη της αγαρόζης το χτένι αφαιρείται και προστίθεται στη συσκευή TAE 0,5x μέχρι να καλυφθούν τα ηλεκτρόδια της συσκευής και το κύκλωμά της να κλείσει. Τα ηλεκτρόδια τοποθετούνται έτσι ώστε τα πηγάδια του πηκτώματος να βρίσκονται προς την άνοδο και άρα το αρνητικά φορτισμένο DNA να μεταναστεύσει προς την θετικά φορτισμένη κάθοδο.

Τα δείγματα αναμειγνύονται με 6x διαλύματος χρώσης (0.25 % μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25 % κυανού της ξυλόλης και 30 % γλυκερόλη) σε τελική αραιώση 1x. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pPB2017, το οποίο έχει υποστεί πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI ή PstI, ώστε από το μείγμα των πέψεων να προκύψουν οι ζώνες με μοριακά βάρη 8700 bp, 3500 bp, 2700 bp, 1700 bp, 805 bp, 540 bp.

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

2.7.7. Καθαρισμός DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο

Η διαδικασία του καθαρισμού με φαινόλη και χλωροφόρμιο χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του cccDNA και του rcDNA του HBV ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία του λυμένου εναιωρήματος. Το πρωτόκολλο είναι συνοπτικά το εξής:

- Στην αντίδραση της πέψης προστίθεται dH₂O μέχρι τελικού όγκου 350 μl.
- Προσθήκη 50 μl διαλύματος CH₃COONa (3M, pH 5.2).
- Προσθήκη 400 μl φαινόλης (Buffer-saturated, pH 8), δηλαδή ίσου όγκου με την υδατική φάση, και ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει το DNA, σε eppendorf του 1,5 mL.
- Τα δύο τελευταία βήματα επαναλαμβάνονται άλλη μία φορά.
- Προσθήκη 400 μl χλωροφορμίου και καλή ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε eppendorf του 1,5 mL.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά όλης της υπάρχουσας ποσότητας εκτός των τελευταίων 20 μl περίπου σε καινούριο eppendorf του 1,5 mL, για απομάκρυνση των υπολειμμάτων χλωροφορμίου.
- Προσθήκη 2,5 όγκων 100% αιθανόλης (1 ml) και καλή ανάδευση.
- Κατακρήμνιση του DNA στους -20 °C μέχρι την επόμενη ημέρα.

- Φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm για 15 λεπτά και αφαίρεση του υπερκλειμένου.

- Ξέπλυμα του ιζήματος DNA (pellet) με 500 μl αιθανόλης 70%. Ήπια ανάδευση πάνω - κάτω με το χέρι, φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκλειμένου. Επανάληψη του βήματος αυτού άλλη μία φορά.

- Στέγνωμα των δειγμάτων για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι, ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Έπειτα, προσθήκη 130 μl ddH₂O.

- Επαναδιαλυτοποίηση του DNA με επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C, με ενδιάμεση ανάδευση ανά 5 λεπτά.

Το καθαρό DNA φυλάσσεται στους -20 °C ως τη χρήση του.

2.7.8. In vitro μεταγραφή

10-20 μg πλασμιδιακού DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να μεταγραφεί γραμμικοποιείται ύστερα από πέψη με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση στο σημείο λήξης της μεταγραφής. Ύστερα από τον καθαρισμό του DNA με φαινόλη – χλωροφόρμιο, ακολουθείται το πρωτόκολλο μεταγραφής ιικών αλληλουχιών με 5' cap με χρήση SP6 RNA πολυμεράσης.

Για την *in vitro* μεταγραφή των ιικών αλληλουχιών του DENV απαιτείται προσθήκη 5' cap για την αποτελεσματική μετάφραση και αντιγραφή του RNA μέσα στα κύτταρα. Τα πλασμίδια που φέρουν τις ιικές αλληλουχίες έχουν γραμμικοποιηθεί με XbaI (DENV) (New England Biolabs). Τα πλασμίδια φέρουν υποκινητή για SP6 RNA πολυμεράση, με εξαίρεση τα πλασμίδια του ZIKV, για τα οποία χρησιμοποιείται η T7 πολυμεράση. Η αντίδραση μεταγραφής πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 100 μL σε 1.5 mL erpendorf και περιλαμβάνει τα εξής:

- 10 μg καθαρισμένου DNA σε 41 μL ddH₂O
- 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος RRL-SP6 5x (400 mM HEPES pH 7.5, 80 mM MgCl₂, 10 mM spermidin, 200 mM DTT)

- 12,5 μl διαλύματος ριβονουκλεοτιδίων (rNTPs solution) 25 mM (Invitrogen), το οποίο περιλαμβάνει 3,125 μL rATP, rUTP και rCTP, καθώς και 1,563 μL rGTP και ddH₂O (Η μισή ποσότητα rGTP αντικαθίσταται από το cap analog)
- 20 μl Cap analog (7mG(ppp)G RNA cap, 5 mM, New England Biolabs)
- 2,5 μl RRI (Recombinant RNase Inhibitor) 40 u/μl (Takara)
- 4 μl (20u) SP6 RNA πολυμεράσης (Promega)

Το μίγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 40 °C για 2,5 ώρες. Κατόπιν, προστίθενται άλλα 2 μl SP6 RNA πολυμεράσης και το δείγμα επωάζεται για άλλες 2,5 ώρες. Στο τέλος της αντίδρασης προστίθενται 6 μl (6 u) RQ1 RNase-free DNase (Promega) και επωάζεται για 30-60 λεπτά στους 37 °C, για αποδιάταξη του DNA.

Τέλος, το RNA φυλάσσεται στους -80 °C. Η επιτυχία της αντίδρασης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και το RNA καθαρίζεται με φαινόλη – χλωροφόρμιο.

2.7.9. Καθαρισμός *in vitro* παραγμένου RNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

Για τον καθαρισμό του *in vitro* παραγμένου RNA και την απομάκρυνση των ενζύμων και των ρυθμιστικών διαλυμάτων της *in vitro* μεταγραφής, ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

- Στο διάλυμα της αντίδρασης μεταγραφής προστίθενται 60 μl οξικού νατρίου (CH₃COONa 2M, pH 4.5) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 600 μl.
- Σε απαγωγό, προστίθενται 400 μl όξινης φαινόλης (water saturated, pH<5).
- Ανάδευση και 10' επώαση στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης (περίπου 500 μl), που περιέχει το RNA, σε νέο eppendorf του 1,5 ml.
- Προσθήκη όγκου χλωροφορμίου ίσου με την υδατική φάση (περίπου 500 μl) και ανάδευση.

- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης σε νέο erpendorf του 1,5 ml.
 - Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του δείγματος, εκτός των τελευταίων 20 μl, σε νέο erpendorf του 1,5 ml, για απομάκρυνση υπολειμμάτων χλωροφορμίου.
 - Προσθήκη όγκου ισοπροπανόλης 0,7 φορές του όγκου δείγματος και ανάδευση.
 - Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και πλήρης αφαίρεση του υπερκειμένου.
 - Προσθήκη 500 μl αιθανόλης 70% στο ίζημα RNA για ξέπλυμα, και ήπια ανάδευση με το χέρι.
 - Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση υπερκειμένου.
 - Επανάληψη των δύο προηγούμενων σταδίων άλλη μία φορά.
 - Επώαση για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με ανοιχτό καπάκι, για την εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης.
 - Προσθήκη 40 μl ddH₂O και επαναδιάλυση του ιζήματος RNA με επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C, με ανάδευση ανά 5 λεπτά.
 - Πάγωμα για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -80 °C, για πιο εύκολη επαναδιάλυση του ιζήματος RNA, και έπειτα αναδιάλυση.
- Μετά τον καθαρισμό, το RNA φωτομετρείται σε nanodrop στα 260 nm, με ddH₂O ως τυφλό. Φυλάσσεται στους -80 °C μέχρι τη χρήση.

2.7.10. Διείλεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)

Όταν κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα σε επιφάνεια φτάνουν και καλύπτουν περίπου το 90 % της πληρότητας του χώρου στον οποίο αναπτύσσονται (πχ φλάσκες), τότε είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που σχετίζονται με ζωντανά κύτταρα θηλαστικών πραγματοποιούνται σε θάλαμο νηματικής ροής, με στείρα υλικά. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι: PBS

1x (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄), θρυψίνη 1x (0,05% Trypsin-EDTA, Gibco) και θρεπτικό υλικό DMEM High Glucose (Dulbecco's modified minimal essential medium, Invitrogen, συμπληρωμένο με 2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine), 0,1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα (non-essential amino acids - NEAA), 100 U/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη και 10% (v/v) εμβρυικού ορού μόσχου (fetal bovine serum, FBS). Η διαδικασία γίνεται ως εξής:

- Απόρριψη του παλιού θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα ή το πιάτο.
- 2 πλύσεις με PBS 1x για απομάκρυνση υπολειμμάτων ορού.
- Απόρριψη PBS και προσθήκη θρυψίνης 1x έτσι ώστε να καλύπτεται οριακά η επιφάνεια της φλάσκας. Σε ευαίσθητες κυτταροσειρές η θρυψίνη αραιώνεται 1:4 με PBS 1x.
- Επώαση με την θρυψίνη εντός κλιβάνου (37 °C, 5% CO₂) για 5-10' ή έως ότου τα κύτταρα αποκολληθούν.
- Μετά την αποκόλληση των κυττάρων η θρυψίνη απενεργοποιείται με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM, σε ποσότητα τουλάχιστον 2 φορές μεγαλύτερη από της θρυψίνης.
- Τα κύτταρα αποκολλώνται πλήρως από τη φλάσκα και τα συσσωματώματα διασπώνται ανακατεύοντας το εναιώρημα με τη βοήθεια ορολογικής πιπέτας.
- Όταν τα κύτταρα είναι πλέον μονήρη, ύστερα από παρατήρηση σε μικροσκόπιο, μια ποσότητά τους μοιράζεται σε νέα φλάσκα ή πιάτο, συνήθως σε αραιώση 1:3 με 1:8, ανάλογα με την ταχύτητα ανάπτυξης κάθε κυτταροσειράς.
- Συμπληρώνεται θρεπτικό υλικό μέχρι τον κατάλληλο όγκο και τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν σε κλίβανο (37 °C, 5% CO₂).

Αν είναι απαραίτητο, η περίσσεια του εναιωρήματος κυττάρων χρησιμοποιείται για πάγωμα, ή στρώνεται σε πλάκες πολλών πηγαδιών (multi-well plates). Επιπλέον, σε περίπτωση που η κυτταροσειρά φέρει σταθερά κάποιο ιικό ρεπλικόνιο ή πλασμίδιο έκφρασης, τα οποία συνεκφράζουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του αντίστοιχου αντιβιοτικού.

2.7.11. Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ειδικά φιαλίδια (cryovials), τα οποία βρίσκονται σε δεξαμενή υγρού αζώτου. Κατά την απόψυξη των κυττάρων, το περιεχόμενο του cryovial ξεπαγώνεται γρήγορα και μεταφέρεται σε 5 mL πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM μέσα σε falcon των 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (800 rpm, 5') και στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε 3-4 mL πλήρους DMEM και το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε πιάτο ή φλάσκα καλλιέργειας, στο οποίο προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Τα κύτταρα επωάζονται εντός κλιβάνου (37 °C, 5% CO₂).

2.7.12. Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων

Μία ποσότητα κυττάρων από ανακαλλιέργεια μεταφέρεται σε falcon των 15 mL και φυγοκεντρείται στις 800 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται, ενώ το ίζημα επαναδιαλύεται με 1500 μl μίγματος 95% ορού (FBS) και 5% DMSO (Dimethyl sulfoxide - C₂H₆OS, Applichem) και μεταφέρεται σε cryovial. Το cryovial μεταφέρεται με ειδικό δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη στη βάση του (για αποφυγή της απότομης ψύξης) στους -80 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το φιαλίδιο μεταφέρεται σε δεξαμενή υγρού αζώτου και φυλάσσεται για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.7.13. Εισαγωγή DNA/RNA σε κύτταρα θηλαστικών με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ώστε να εισαχθεί σε κύτταρα ιικό RNA, ή πλασμίδια έκφρασης πρωτεϊνών. Με έκθεση των κυττάρων σε παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου αλλά μικρής διάρκειας, η μεμβράνη τους αποσταθεροποιείται και δημιουργούνται παροδικά μεμβρανικοί πόροι που επιτρέπουν την είσοδο του εκάστοτε νουκλεϊκού οξέος.

Για κάθε δείγμα, 4x10⁶ κύτταρα από ανακαλλιέργεια μεταφέρονται σε falcon των 15 ml. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 800 rpm για 5 λεπτά

και το ίζημα των κυττάρων ξεπλένεται με 3-4 ml PBS 1x. Το PBS απομακρύνεται με φυγοκέντρηση (800 rpm, 5') και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 400 μl διαλύματος Cytomix pH 7,6 (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6, 25 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA), με 2 mM ATP και 5 mM γλουταθειόνη.

400 μl εναιωρήματος κυττάρων σε Cytomix αναμιγνύονται με 10 μg DNA/RNA και μεταφέρονται σε στείρα κυβέττα ηλεκτροδιάτρησης (0,4 cm gap, Bio-Rad). Η κυβέττα εισάγεται στη συσκευή GenePulser XCell (Bio-Rad) και πραγματοποιείται ηλεκτροδιάτρηση με συνθήκες 975 μF και 270 V. Αμέσως μετά, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε 8 ml θρεπτικού υλικού DMEM και τα συσσωματώματα που σχηματίστηκαν λόγω της άσκησης υψηλού ηλεκτρικού πεδίου διαχωρίζονται ανακατεύοντας με ορολογική πιπέτα.

Έπειτα, τα κύτταρα στρώνονται στην κατάλληλη πυκνότητα σε πιάτα ή σε πλάκες πολλών πηγαδιών και την επόμενη μέρα ακολουθείται η εκάστοτε πειραματική διαδικασία.

2.7.14. Παραγωγή και τιτλοποίηση ιικών στοκ

2.7.14.1. Παραγωγή DENV

Για την παραγωγή ιικού στοκ του DENV το RNA που έχει παραχθεί με *in vitro* μεταγραφή, εισάγεται σε κύτταρα Vero E6 με ηλεκτροδιάτρηση. Τα κύτταρα στρώνονται σε πιάτο 100 mm και 24 ώρες μετά την επιμόλυνση, το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM αντικαθίσταται με νέο, που περιέχει 15 mM HEPES pH 7,5. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να παρατηρηθεί μια ορατή κυτταροπαθολογική επίδραση (cytopathogenic effect - CPE), χαρακτηριστικό της προχωρημένης μόλυνσης από τον συγκεκριμένο λυτικό ιό (72 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας, που περιέχει τον ιό, συλλέγεται στις 4 ημέρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση στην περίπτωση ιών με γονίδιο αναφοράς, για τον περιορισμό εμφάνισης ανασυνδυασμένων ιών χωρίς αυτό το γονίδιο, και επιπλέον στις 7 ημέρες για ιούς χωρίς γονίδιο αναφοράς. Στη συνέχεια, το συλλεγμένο υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρα 0,45 μM για απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων, μοιράζεται σε aliquots του 1 ml και φυλάσσεται στους -80 °C.

Για την παραγωγή ιϊκού στοκ με υψηλότερο τίτλο ιού, πραγματοποιείται δεύτερος κύκλος παραγωγής. Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο που συλλέγεται ύστερα από την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιείται για μόλυνση νέων κυττάρων Vero E6 σε πιάτο 100 mm. Το υπερκείμενο αφαιρείται 4 ώρες μετά τη μόλυνση και στα κύτταρα προστίθεται νέο πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM, με 15 mM HEPES pH 7,5. Τα κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι να παρατηρηθεί το CPE και το υπερκείμενο συλλέγεται στις 4 ημέρες μετά την μόλυνση στην περίπτωση ιών με γονίδιο αναφοράς, και επιπλέον στις 5 ημέρες για ιούς χωρίς γονίδιο αναφοράς. Στη συνέχεια, το συλλεγμένο υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρα 0,45 μM, μοιράζεται σε aliquots του 1 ml και φυλάσσεται στους -80 °C.

2.7.14.2. Τιτλοποίηση DENV με δοκιμασία πλακών λύσης

Για την τιτλοποίηση του λυτικού ιού DENV χρησιμοποιείται η δοκιμασία πλακών λύσης (plaque assay), ως εξής: Κύτταρα Vero E6 στρώνονται σε πλάκα 24 πηγαδιών (24-well) σε πλήρη κάλυψη (~2x10⁵ κύτταρα/πηγάδι) και 24 ώρες μετά επωάζονται για 1 ώρα με 250 μL υπερκείμενου ιϊκής καλλιέργειας σε διαδοχικές αραιώσεις 1:10, εις διπλούν. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό αλλάζεται και προστίθεται θρεπτικό υλικό MEM (Gibco) χωρίς FCS, που περιέχει 1,5% καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (Sigma). Τα κύτταρα επωάζονται για 7 ημέρες στον κλίβανο, χωρίς να μετακινηθούν, και έπειτα γίνεται αδρανοποίηση του ιού και μονιμοποίηση των κυττάρων μέσω προσθήκης 1 ml 10% φορμαλδεΰδης για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η πλάκα ξεπλένεται έντονα με νερό βρύσης, για την πλήρη απομάκρυνση της μεθυλοκυτταρίνης. Τα κύτταρα βάφονται 15-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 1 % Crystal Violet σε 10% αιθανόλη, που βάφει μόνο τα κύτταρα που ήταν ζωντανά κατά τη μονιμοποίηση. Ύστερα από αφαίρεση της χρωστικής και ξέπλυμα της πλάκας με νερό βρύσης, οι εστίες μόλυνσης (πλάκες) είναι ορατές με γυμνό μάτι ως άχρωμες περιοχές. Ο τίτλος του ιού υπολογίζεται μέσω μέτρησης των εστιών μόλυνσης στην αραιώση που περιέχει 10-100 εστίες, και με βάση τον τύπο:

PFU/mL = αρ. πλακών/(αραίωση x όγκο ιού/πηγάδι (mL)) (PFU: Plaque Forming Unit, εστία μόλυνσης).

2.7.14.3. Παραγωγή HBV

Για την παραγωγή ιϊκού στοκ HBV χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά HepAD38, η οποία φέρει σταθερά το ιϊκό γονιδίωμα, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από την παρουσία ή όχι τετρακυκλίνης. Αρχικά, σε φλάσκες 175 cm² (F175) γίνεται επίστρωση με 15 ml από 50μg/ml κολλαγόνο (Corning) για 2-3 ώρες, στους 37 °C. Έπειτα, το κολλαγόνο αφαιρείται και κύτταρα HepAD38 στρώνονται στις φλάσκες και συμπληρώνονται με θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (Gibco), συμπληρωμένο με 2 mM L-γλουταμίνη, 0,1 mM μη απαραίτητα αμινοξέα, 100 U/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη και 10% (v/v) FBS. Την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό υλικό αντικαθίσταται με William's Medium E (Gibco), που περιέχει 5% (v/v) FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 100 μg/mL στρεπτομυκίνη, 2% DMSO, 35 μg/ml υδροκορτιζόνη (Hydrocortisone, STEMCELL) και 5 μg/ml ινσουλίνη (Sigma). Η παρουσία 2% DMSO προκαλεί διαφοροποίηση στα κύτταρα, τα οποία παρουσιάζουν αναστολή της αύξησης με επαφή. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C με 5% CO₂ και το υπερκείμενο συλλέγεται δύο φορές την εβδομάδα, για 2 έως 7 εβδομάδες.

Το συλλεγμένο υπερκείμενο περνά από φίλτρο 0,22 μm (Millipore) και έπειτα προστίθεται πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 50% σε PBS 1x), σε τελική συγκέντρωση 5%, για την κατακρήμνιση των ιϊκών σωματιδίων. Ύστερα από καλή ανάδευση, το μίγμα επωάζεται στους 4 °C για 18 ώρες.

Την επόμενη μέρα, το μίγμα μοιράζεται σε 50 ml falcon και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm, 4 °C για τουλάχιστον 1 ώρα. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με 1ml πλήρες DMEM και επώαση στους 4 °C για 18 ώρες. Έπειτα, το ίζημα επαναδιαλύεται με τη βοήθεια πιπέτας, μοιράζεται σε aliquots των 200 μl και τα ιϊκά στοκ φυλάσσονται στους -80 °C.

2.7.14.4. Τιτλοποίηση του HBV

Η τιτλοποίηση του HBV πραγματοποιείται απευθείας στο ιϊκό στοκ που χρησιμοποιείται, με χρήση ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR). Συγκεκριμένα, το ιϊκό rcDNA που βρίσκεται μέσα στα καψίδια απομονώνεται με χρήση του QIAamp DNA blood Mini Kit (Qiagen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας:

- 20 μl ιϊκού στοκ αναμειγνύονται με 180 μl PBS 1x, 20 μl πρωτεΐνάση K () και 200 μl Buffer AL
- Το μίγμα επωάζεται στους 56 οC για 10', έτσι ώστε να καταστραφούν τα ιϊκά σωματίδια
- Προσθήκη 200 μl 100% αιθανόλης και μεταφορά σε στήλη στην οποία προσδένεται το DNA
 - Φυγοκέντρηση 6.000 g, 1'
 - Προσθήκη 500 μl buffer AW1 και φυγοκέντρηση 6.000 g, 1'
 - Προσθήκη 500 μl buffer AW2 και φυγοκέντρηση 6.000 g, 3'
 - Μεταφορά στήλης σε 1,5ml erpendorf και έκλουση του DNA με 100 μl buffer AE
- Επώαση 1' σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση 6.000 g, 1'

Στη συνέχεια, το απομονωμένο DNA ποσοτικοποιείται χρησιμοποιώντας Real-Time qPCR και η συγκέντρωση υπολογίζεται με χρήση διαδοχικών αραιώσεων του πλασμιδίου HBVrawy1.2, γνωστής συγκέντρωσης. Ο τίτλος του ιϊκού στοκ υπολογίζεται σε αντίγραφα ανά ml (genome equivalent: copies/ml).

2.7.15. Μόλυνση κυττάρων με πλήρεις ιούς

Όλες οι μολύνσεις με πλήρεις ιούς πραγματοποιήθηκαν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, σε θάλαμο νηματικής ροής, ακολουθώντας πρακτικές επιπέδου βιοασφαλείας 2+ (Biosafety Level 2+ - BSL2+).

2.7.15.1. Μόλυνση με DENV

Για την μόλυνση με DENV χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Huh7. Τα κύτταρα από την ανακαλλιέργεια επιστρώνονται σε πυκνότητα ~30%, με την κατάλληλη ποσότητα πλήρους θρεπτικού υλικού, σε πιάτα πολλών πηγαδιών, για 18 ώρες στους 37 °C. Την επόμενη μέρα γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη ιϊκού στοκ αραιωμένου σε πλήρες θρεπτικό DMEM. Για αποδοτική μόλυνση, ο όγκος του θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγάδι είναι όσο πιο μικρός γίνεται. Η ποσότητα του ιϊκού στοκ εξαρτάται από το multiplicity of infection (MOI), το οποίο προσδιορίζει τον αριθμό των σωματιδίων που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο, τον ιϊκό τίτλο και τον αριθμό των κυττάρων. Για τον DENV το MOI κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 2 rfu/κύτταρο ανάλογα με το πείραμα.

Τα κύτταρα επωάζονται με τον ιό για 4 ώρες και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό με την περίσσεια του ιού απομακρύνεται και αντικαθίσταται με νέο πλήρες θρεπτικό υλικό. Η επώαση των κυττάρων στον κλίβανο, στους 37 °C με 5% CO₂, συνεχίζεται μέχρι τη λύση τους, 4 έως 72 ώρες μετά τη μόλυνση (hours post infection - h.p.i).

2.7.15.2. Μόλυνση με HBV

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

2.7.16. Έλεγχος αντι-ϊικής δράσης και κυτταροτοξικότητας

Στην περίπτωση ελέγχου της δράσης ενώσεων έναντι της ιϊκής αντιγραφής, χρησιμοποιούνται κύτταρα που φέρουν σταθερά το ιϊκό ρεπλικόνιο του DENV. Για την ποσοτικοποίηση της ιϊκής αντιγραφής, μετράται η ενεργότητα λουσιφεράσης, η οποία συνεκφράζεται από το ιϊκό ρεπλικόνιο και τα επίπεδά της αντιστοιχούν στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε πλάκα 96 πηγαδιών σε 30% κάλυψη. Την επόμενη ημέρα, το υλικό με το οποίο επωάζονταν τα κύτταρα (πλήρες DMEM με αντιβιοτικό επιλογής) απομακρύνεται και προστίθενται διαδοχικές αραιώσεις των ενώσεων, διαλυμένες σε πλήρες DMEM. Ως αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (control) χρησιμοποιείται ο διαλύτης των εκάστοτε ενώσεων. Τα κύτταρα επωάζονται για το κατάλληλο χρονικό περιθώριο ανά πείραμα και έπειτα λύνονται με Passive Lysis Buffer 1x (Promega) για μέτρηση Renilla λουσιφεράσης.

Στην περίπτωση ελέγχου της δράσης ενώσεων έναντι όλων των σταδίων του κύκλου ζωής ενός ιού, αυτά μελετώνται ξεχωριστά ως εξής:

Για τη μελέτη της **αντιγραφής** (RNA αντιγραφή και μετάφραση), 24 ώρες μετά την επίστρωση των κυττάρων γίνεται μόλυνση με τον ιό για 4 ώρες. Στη συνέχεια, ο ιός απομακρύνεται με αντικατάσταση του υλικού με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM που περιέχει τις ενώσεις σε διαδοχικές αραιώσεις ή τον αντίστοιχο διαλύτη.

Για τη μελέτη της **εισόδου** του ιού (είσοδος, απελευθέρωση ιϊκού σωματιδίου στο κυτταρόπλασμα), 24 ώρες μετά την επίστρωση των κυττάρων, γίνεται προεπάση με τις ενώσεις ή τον διαλύτη για 2 ώρες. Στη συνέχεια, το υλικό αντικαθίσταται και γίνεται μόλυνση με τον ιό, παρουσία της αντίστοιχης ένωσης. Μετά από επώαση 4 ωρών το υλικό αντικαθίσταται με πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει την αντίστοιχη ένωση ή τον διαλύτη. Τα κύτταρα επωάζονται μέχρι την λύση τους. Η μελέτη της εισόδου γίνεται παράλληλα με τη μελέτη της αντιγραφής, για σύγκριση των δύο συνθηκών.

Για τη μελέτη της **συγκρότησης** του νουκλεοκαψιδίου (συγκρότηση, απελευθέρωση) συλλέγονται τα υπερκείμενα από τα κύτταρα στα οποία οι ενώσεις είχαν προστεθεί μετά τη μόλυνση και χρησιμοποιούνται για μόλυνση νέων κυττάρων, επιστρωμένων σε πλάκα 96 πηγαδιών σε πυκνότητα 30%. Τα κύτταρα επωάζονται

με τα υπερκείμενα που περιέχουν τον παραγμένο ιό για 16 ώρες και στη συνέχεια γίνεται αλλαγή υλικού με πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM. Ύστερα από 72 ώρες τα κύτταρα λύνονται.

Η **κυτταροτοξικότητα** προσδιορίζεται μέσω μέτρησης των ενδοκυττάρων επιπέδων ATP σε κύτταρα που επώαστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις του εκάστοτε αναστολέα. Ύστερα από 72 ώρες επώασης, τα κύτταρα λύνονται με ViaLight plus Cell Lysis Reagent (Lonza) για μέτρηση ενδοκυτταρικού ATP.

2.7.17. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Για την ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης σε λυμένα κύτταρα χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το όξινο διάλυμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και σαν αποτέλεσμα προκύπτει ένα κυανό χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm.

Η ποσοτικοποίηση γίνεται σε πλάκα 96 πηγαδιών με διαυγή, επίπεδο πάτο, και ως τυφλό για τα δείγματα χρησιμοποιείται ίση ποσότητα από το εκάστοτε διάλυμα λύσης των κυττάρων. Επίσης, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα δείγματα, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με υδατικό διάλυμα αλβουμίνης (bovine serum albumin - BSA) σε συγκεντρώσεις 0 (τυφλό πρότυπης), 0,5, 5, 10, 15, 20 και 25 μg/μl.

Τα δείγματα αραιώνονται σε dH₂O με τελικό όγκο 120 μl και έπειτα προστίθενται 30 μl αντιδραστηρίου Bradford ανά πηγάδι. Η πλάκα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο για μέτρηση στα 600 nm (Microplate Reader model 680, Bio-Rad). Από τις τιμές απορροφήσεων που λαμβάνονται από το μηχάνημα αφαιρείται η τιμή του αντίστοιχου τυφλού, και με την χρήση πρότυπης καμπύλης γίνεται αντιστοίχιση των απορροφήσεων των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις τους.

2.7.18. Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου *Renilla* λουσιφεράσης (R-Luc) βασίζεται στην αντίδραση οξειδωσης του υποστρώματός του, της κοιλεντεραζίνης, δηλαδή η λουσιφερίνη των κοιλεντερωτών, παρουσία ενέργειας (ATP) και Mg²⁺, η οποία

πραγματοποιείται με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός φωτονίου. Το φως που παράγεται μετράται σε μετρητή φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, Bio-Rad).

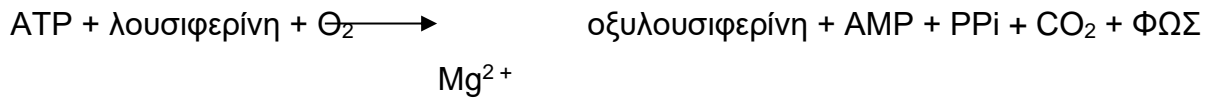
Για μέτρηση της *Renilla* λουσιφεράσης, τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS 1x και προστίθενται σε κάθε πηγάδι 40 μl Passive Lysis Buffer 1x (Promega) το οποίο έχει αραιωθεί 1:5 με ddH₂O. Μετά από 5 λεπτά συλλέγεται το κυτταρόλυμα σε erppendorf του 0,5 mL, τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C. Το διαλύματα λύσης που χρησιμοποιούνται λύνουν ήπια τα κύτταρα και δεν αποδιατάσσουν πρωτεΐνες που χρειάζεται να διατηρήσουν την ενζυμική τους ενεργότητα μετά τη λύση, όπως η λουσιφεράση.

Τα δείγματα ξεπαγώνουν, αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 rpm για 3 λεπτά. Αυτή η διαδικασία γίνεται ώστε να κατακρημνιστούν μεμβρανικά συστατικά που έχουν προκύψει από τη λύση και να μην αλλοιώσουν τις μετρήσεις. Παράλληλα, σε erppendorfs του 1,5 mL αντίστοιχα σε αριθμό με αυτόν των δειγμάτων προς μέτρηση, τοποθετούνται 30 του υποστρώματος κοιλεντεραζίνης 12 μM (Promega), αραιωμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM potassium phosphate, pH 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA). Σε κάθε Erppendorf με αντιδραστήριο προστίθενται 2-8 μl από το κάθε δείγμα και μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στα 10 δευτερόλεπτα, η οποία εκφράζεται από το λουσιφερόμετρο ως σχετικές μονάδες φωτός (Relative Light Units - RLU).

2.7.19. Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP

Για να μετρηθούν τα επίπεδα κυτταρικής βιωσιμότητας, χρησιμοποιείται ένας κυτταρικός δείκτης με σχετικά μεγάλη ευαισθησία, όπως το ATP. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη χρήση του ViaLight plus kit (Lonza). Η μέθοδος βασίζεται στην μέτρηση βιοφωταύγειας του ATP που είναι παρούσα σε όλα τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα, και χρησιμοποιεί το ένζυμο λουσιφεράση, η οποία καταλύει το σχηματισμό φωτός από ATP και λουσιφερίνη, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

λουσιφεράση



Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός συνδέεται γραμμικά με την συγκέντρωση του ATP και μετράται σε μετρητή φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, Bio-Rad).

Τα κύτταρα ξεπλένονται μία φορά με σκέτο DMEM και λύνονται με 75 μl ViaLight plus Cell Lysis Reagent, αραιωμένο 1:3 με σκέτο DMEM. Το κυτταρόλυμα φυλάσσεται εppendorf στους -80 °C μέχρι τη μέτρηση.

Για την μέτρηση, τα δείγματα ξεπαγώνουν, αναδεύονται και φυγοκεντρούνται στις 13.000 rpm για 2 λεπτά. Παράλληλα, 30 μl υποστρώματος μέτρησης (ATP Monitoring Reagent - AMR) ανά δείγμα μοιράζονται σε Eppendorf του 1,5 ml. Σε κάθε eppendorf με αντιδραστήριο προστίθενται 5-10 μl από το κάθε δείγμα και μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στο 1 δευτερόλεπτο, η οποία εκφράζεται από το λουσιφερόμετρο ως σχετικές μονάδες φωτός (Relative Light Units - RLU).

2.7.20. Υπολογισμός μέσης δραστηκής (EC₅₀) και μέσης κυτταροτοξικής (CC₅₀) συγκέντρωσης αναστολέων

Για να χαρακτηριστεί ένας αναστολέας ως προς τη δράση και την τοξικότητά του, προσδιορίζονται οι αντίστοιχοι δείκτες. Συγκεκριμένα, για την κυτταροτοξικότητα, προσδιορίζεται η μέση κυτταροτοξική συγκέντρωση (median cytotoxic concentration - CC₅₀), με μέτρηση των επιπέδων ενδοκυττάριου ATP σε κύτταρα που επωάζονται με διαδοχικές αραιώσεις του εκάστοτε αναστολέα. Αντίστοιχα, για την αντι-ιική δράση, προσδιορίζεται η μέση δραστηκή συγκέντρωση (median effective concentration - EC₅₀). Ο ακριβής υπολογισμός των τιμών CC₅₀ και EC₅₀ γίνεται με εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα Prism Software (Graph Pad). Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο δείκτης επιλεξιμότητας (Selectivity Index - SI) που είναι ο λόγος CC₅₀/EC₅₀.

2.7.21. Απομόνωση ολικού RNA με χρήση διαλύματος NucleoZol

Για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα θηλαστικών, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο NucleoZol (Macherey-Nagel), το οποίο είναι ένα μίγμα φαινόλης, ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και άλλων συστατικών. Τα κύτταρα που έχουν αναπτυχθεί

σε πλάκα 12 ή 24 πηγαδιών πλένονται 2 φορές με PBS 1x και λύνονται με 500 μl NucleoZol. Το κυτταρόλυμα συλλέγεται σε Eppendorf του 1,5 ml και τα δείγματα φυλάσσονται στους -80 °C μέχρι την απομόνωση. Η διαδικασία απομόνωσης είναι η εξής:

- Προσθήκη 200 μL ddH₂O, καλή ανάδευση και επώαση σε RT για 15 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά σε RT.
- Μεταφορά 500μl από το υπερκείμενο σε νέα eppendorf.
- Προσθήκη 5-10 μg γλυκογόνου και 500 μl ισοπροπανόλης για την καθίζηση του RNA.
- Ανάδευση και αναμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4 °C.
- Πέταμα υπερκειμένου και ξέπλυμα ιζήματος RNA με 500 μL 75% αιθανόλης, με ήπια ανακίνηση.
- Φυγοκέντρηση στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4 °C και πέταμα υπερκειμένου.
- Εξάτμιση της αιθανόλης με επώαση 5-10 λεπτά με ανοιχτό καπάκι.
- Επαναιώρηση του ιζήματος RNA με 60 μL ddH₂O και επαναδιαλυτοποίηση με επώαση στους 37°C για 15 λεπτά, με ανάδευση κάθε 5 λεπτά.
- Αποθήκευση στους -80 °C μέχρι τη χρήση.

2.7.22. Απομόνωση HBV DNA

Για την ποσοτικοποίηση του πολλαπλασιασμού του HBV ύστερα από μόλυνση, μελετώνται οι διάφορες μορφές DNA/RNA που προκύπτουν κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του. Για την ποσοτικοποίηση του HBV pgRNA, καθώς και των ολικών μεταγράφων του HBV, απομονώνεται ολικό RNA (Παράγραφος 2.7.21). Για την ποσοτικοποίηση του HBV rcDNA στα ιϊκά σωματίδια που εκκρίνονται από τα κύτταρα, συλλέγεται το υπερκείμενο καλλιέργειας και απομονώνεται το DNA, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 2.7.14 για την τιτλοποίηση του HBV.

Επιπλέον, ποσοτικοποιούνται τα επίπεδα του HBV cccDNA στον πυρήνα, καθώς και του HBV rcDNA στα ιϊκά σωματίδια στο κυτταρόπλασμα, στα οποία γίνεται η αντιγραφή του ιϊκού γενετικού υλικού ή δεν έχουν ακόμα απελευθερωθεί από το κύτταρο. Για το σκοπό αυτό, σε μολυσμένα κύτταρα στρωμένα σε πλάκα 24

πηγαδιών, προστίθεται 1 ml διάλυμα λύσης κυττάρων (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 8% σουκρόζη, 0,375% NP40). Η πλάκα επωάζεται για 10 λεπτά στους 37 °C και έπειτα το κυτταρόλυμα συλλέγεται σε Eppendorf 1,5 ml και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 4 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο περιέχει τα κυτταροπλασματικά σωματίδια του HBV (κυτταροπλασματικό κλάσμα) και μεταφέρεται σε νέο Eppendorf, ενώ το ίζημα περιέχει τους πυρήνες των κυττάρων (πυρηνικό κλάσμα). Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80 °C μέχρι την απομόνωση.

2.7.22.1. Απομόνωση HBV cccDNA από πυρηνικό κλάσμα λύσης

Το πυρηνικό κλάσμα (ίζημα) πλένεται μία φορά με PBS 1x. Το PBS αφαιρείται με φυγοκέντρηση και προστίθενται 500 µl διαλύματος λύσης πυρήνων (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% SDS). Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 5 λεπτά και έπειτα προστίθενται 250 µl 2,5 M KCl. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο γίνεται απομόνωση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη (Παράγραφος 2.7.7). Τέλος, το ίζημα DNA επαναδιαλύεται σε 100 µl ddH₂O.

Απομόνωση HBV rcDNA από κυτταροπλασματικό κλάσμα λύσης

- 1^η επώαση με DNάση: προσθήκη στο κυτταροπλασματικό κλάσμα 6 µl MgCl₂ 1M, 10 µl RQ1 DNase (10 mg/ml, Promega), 5 µl RNase A (10 mg/ml, Invitrogen) και επώαση 30 λεπτά στους 37 °C.
- Κατακρήμνιση κασιδίων: προσθήκη 330 µl διαλύματος κατακρήμνισης κασιδίων (1,4 M NaCl, 25 mM EDTA, 26% PEG 8000), επώαση 30 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 4 λεπτά στους 4 °C.
- 2^η επώαση με DNάση: Επαναιώρηση του ιζήματος με 200µl μείγματος, που περιέχει 2 µl 1M Tris-HCl pH 7,5, 1,2 µl 1M MgCl₂ και 10 µl RQ1 DNase, και επώαση για 15 λεπτά στους 37 °C.
- Επώαση με Πρωτεΐνάση K: Προσθήκη 2,2 µl 0,5 M EDTA (για την αναστολή της DNάσης και της αποικοδόμησης του rcDNA μετά την λύση των κασιδίων).

Έπειτα, προσθήκη 100 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K 5x (250 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% SDS), 12,5 μl πρωτεΐνάσης K και 187,5 μl ddH₂O και επώαση στους 37 °C για τουλάχιστον 1 ώρα.

- Καθαρισμός DNA: με φαινόλη/χλωροφόρμιο (Παράγραφος 2.7.7), παρουσία 15 μg γλυκογόνου και επαναιώρηση σε 150 μl ddH₂O.

2.7.22.2. Ενζυμική δοκιμασία της ενδογενούς πολυμεράσης του HBV

Η ενζυμική δοκιμασία ενδογενούς πολυμεράσης του HBV (HBV endogenous polymerase assay, EPA) πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως [436, 437] με τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει τα εξής:

- Ιικά σωματίδια του HBV (~5 × 10⁵ genome equivalents), όπως έχουν απομονωθεί με διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω
 - EPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Nonidet P-40)
 - 0.1 mM από κάθε dATP, dGTP, dTTP and dCTP

Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε ddH₂O μέχρι τελικό όγκο τα 50μL. Ως αρνητικός μάρτυρας της ενζυμικής δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε μία αντίδραση χωρίς την προσθήκη dNTPs. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37°C για 16h. Τα επίπεδα του HBV DNA προσδιορίστηκαν κατόπιν απομόνωσης του DNA από τις αντιδράσεις με την χρήση του QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen) και επακόλουθης qPCR όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλ. 2.7.14).

2.7.23. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription - RT) χρησιμοποιείται για την σύνθεση cDNA, που θα χρησιμοποιηθεί για PCR, από αρχική

μήτρα RNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίστροφη μεταγραφάση του Moloney murine leukemia virus (MMLV, Promega).

Στην αντίδραση προστίθεται 0,5 µg ολικού RNA και ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, με τον όγκο να συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τα 6,25 µl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι 1 µl oligod(T)18 (New England Biolabs), ο οποίος προσδένεται στην polyA ουρά των mRNA, ή 70 pmol (0,7 µl) μίγματος 2 ανάστροφων (reverse-R) εκκινητών που προσδένονται ειδικά στο ιικό RNA και στο σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο (housekeeping gene) της πρωτεΐνης 14-3-3-zeta (YWHAZ) (**Πίνακες 2 και 3**).

Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή Tprofessional 96 (Biometra) και επωάζονται στους 70 °C για 5 λεπτά (αποδιάταξη δευτεροταγών δομών). Έπειτα μεταφέρονται για 5 λεπτά στον πάγο και προστίθεται σε κάθε δείγμα 3,75 µl μίγματος που περιέχει 1 µl 100mM dNTPs (Invitrogen), 0,25 µl αναστολέα Rnaσών RRI (Takara), 2 µl MMLV buffer 5x (Promega) και 0,5 µl ένζυμο MMLV (Promega), για τελικό όγκο αντίδρασης στα 10 µl.

Τα δείγματα τοποθετούνται ξανά στο θερμικό κυκλοποιητή και η επιμήκυνση του cDNA πραγματοποιείται για 1 ώρα στους 42 °C (ειδικοί primers) ή 37 °C (oligodT). Η αντίδραση τερματίζει με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95 °C για 3 λεπτά. Η αντίδραση αραιώνεται 1:5 με 40 µl ddH₂O και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C.

2.7.24. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR) είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, βασισμένη στη χρήση θερμοανθεκτικής πολυμεράσης μέσα από πολλούς κύκλους εναλλαγής θερμοκρασιών. Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR), ή αλλιώς ποσοτική PCR (quantitative PCR - qPCR), είναι η πιο ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικοποίησης των επιπέδων DNA ή RNA. Η qPCR προσδιορίζει τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, στηριζόμενη στην ανίχνευση φθορίζουσών χρωστικών που προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, η qPCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των ιικών νουκλεϊκών οξέων και των επιπέδων έκφρασης κυτταρικών mRNA. Το δείγμα που χρησιμοποιείται στην αντίδραση είναι το προϊόν της αντίδρασης RT, ή οι διάφορες μορφές HBV DNA που απομονώνονται. Σε ειδικά σωληνάκια qPCR (0,1 ml PCR-Tubes and Caps for Corbett-System, Kisker) ή πιάτα 96 θέσεων (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL, Applied Biosystems), προστίθεται 1 μl (συνήθως) δείγματος, αραιωμένο κατά 1:1 - 1:100, ανάλογα με το προϊόν που θα ποσοτικοποιηθεί και την αρχική του ποσότητα στο δείγμα. Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 4,5 μl με ddH₂O. Για κάθε δείγμα ετοιμάζονται 3 αντιδράσεις (triplicate). Έπειτα, σε κάθε αντίδραση προστίθενται 5 μl 2x SYBRGreen Master Mix (KAPA) και 0,25 μl από καθέναν από τους 2 ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (10 pmol/μl), τον ανάστροφο (reverse-R) και τον πρόσθιο (forward-F), ειδικούς για εκάστοτε γονίδιο (**Πίνακες 2 και 3**).

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

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

- Παραμονή (Hold): 95 °C, 3'
- Κυκλοποίηση (Cycling) x40 φορές: 95 °C, 10''

(αποδιάταξη)

60 ή 65 °C, 20'' (πρόσδεση, °C ανάλογα το T_m των εκκινητών)

72 °C, 15'' (επιμήκυνση, μέτρηση στο Πράσινο κανάλι)

- Καμπύλη αποδιάταξης (Melt curve): 72-95°C, 1°C/βήμα, μέτρηση στο Πράσινο κανάλι

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

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

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

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Γονίδιο στόχος
YWHAZ-1133-F	5'-GCTGGTGATGACAAGAAAGG-3'	YWHAZ
YWHAZ-1226-R	5'-GGATGTGTTGGTTGCATTTCCCT-3'	YWHAZ
CyclineA2-F	5'-CCTGCTCAGTTTCCTTTGGT-3'	CCNA2
CyclineA2-R	5'-AGACGCCCCAGAGATGCAG-3'	CCNA2
VMAT2-F	5'-GAAAGCCACCGTCCAGCTC-3'	VMAT2
VMAT2-R	5'-CCGCAAATATGGGAATTGGATA-3'	VMAT2
MAO A-F	5'-GGGCTGCTACACGGCCTACT- 3'	MAO A
MAO A-R	5'-GACCTCCCTAGCTGCTCGTTCT- 3'	MAO A
MAO B-F	5'-GGAGCCAGTGCATTATGAAGA- 3'	MAO B
MAO B-R	5'-GCCTGCAAAGTAAATCCTGTC- 3'	MAO B
Nrf2-F	5'-TGAGCAAGTTTGGGAGGAGC-3'	Nrf2
Nrf2-R	5'-GGCTTCTGGACTTGGAAACCAT-3'	Nrf2
HO-1-F	5'-GTGTAAGGACCCATCGGAGA-3'.	HO-1
HO-1-R	5'-GTGTAAGGACCCATCGGAGA-3'.	HO-1

ISG 56-F	5'-GGACAGGAAGCTGAAGGAG-3'	ISG 56
ISG 56-R	5'-AGTGGGTGTTTCCTGCAA-3'	ISG 56
DDC-F	5'-GAACAGACTTAACGGGAGCCTTT-3'	DDC (exon 10)
DDC-R	5'-AATGCCGGTAGTCAGTGATAAGC-3'	DDC (exon 12)

F: Forward, R: Reverse

Πίνακας 2. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για qPCR που προσδένονται σε κυτταρικά γονίδια.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Στόχος
DENV-10873-F	5'-GAAAGACCAGAGATCCTGCTGTCT-3'	DENV 3'UTR
DENV-10940-R	5'-ACCATTCATTTTCTGGCGTT-3'	DENV 3'UTR
HBV-pgRNA-F	5'-TGTCAACACTAATATGGGCCTAA-3'	HBV pgRNA
HBV-pgRNA-R	5'-AGGGGCATTTGGTGGTCTAT-3'	HBV pgRNA
HBV-cccDNA-F	5'-GTGCACTTCGCTTCACCTCT-3'	HBV cccDNA
HBV-cccDNA-R	5'-AGCTTGGAGGCTTGAACAGT-3'	HBV cccDNA
HBV-rcDNA-F	5'-GACTCTCTCGTCCCCTTCTC-3'	HBV rcDNA
HBV-rcDNA-R	5'-ATGGTGAGGTGAACAATGCT-3'	HBV rcDNA
HBV-ttIRNA-F	5'-TGAACCTTTACCCCGTTGCC-3'	Όλα τα HBV RNA
HBV-ttIRNA-R	5'-GTATGGATCGGCAGAGGAGC-3'	Όλα τα HBV RNA

F: Forward, R: Reverse

Πίνακας 3. Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για qPCR που προσδένονται σε ιικές αλληλουχίες.

2.7.25. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page

Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται για ανάλυση έκφρασης πρωτεϊνών μεγαλώνουν σε πλάκες 12 πηγαδιών και λύνονται με 80 µl από ειδικό διάλυμα λύσης (protein lysis buffer), το οποίο περιέχει P-Buffer 1x (20 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,2% TritonX-100), αναστολείς πρωτεασών Protease Inhibitor Cocktail 1x (PIC, Roche), αναστολείς φωσφατασών PHOS-STOP 1x (Roche) και 2 mM DTT. Τα δείγματα συλλέγονται σε eppendorf 1,5 ml και ποσοτικοποιούνται με μέθοδο Bradford.

Τα δείγματα διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Για κάθε πήκτωμα παρασκευάζονται 10 ml από 12% πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), που περιέχει τα εξής:

- 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (Merck)
- 4 ml 30% ακρυλαμίδη/δισ-ακρυλαμίδη (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, Applichem).
- 100 µL 10% SDS (Applichem)
- 100 µL 10% APS (Ammonium Persulfate)
- 10 µl Temed (Applichem)
- 3,38 ml ddH₂O

Το μίγμα τοποθετείται ανάμεσα στα δύο ειδικά τζάμια Mini-PROTEAN Short Plates (Bio-Rad) και Mini-PROTEAN Spacer Plates 1.5 mm (Bio-Rad), μέχρι τα δύο τρίτα περίπου του ύψους του τζαμιού. Στη συνέχεια, πάνω από το πήκτωμα προστίθεται περίπου 1 ml ισοπροπανόλης, ώστε να δημιουργηθεί ένα επίπεδο μέτωπο στο separating gel, το οποίο αφήνεται να πήξει. Έπειτα παρασκευάζονται 5 ml για κάθε gel από το 4% πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), ως εξής:

- 1,25 ml Tris-HCl 1 M, pH 6,8 (Merck)
- 0,67 ml 30% ακρυλαμίδη/δισ-ακρυλαμίδη (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, Applichem).
- 50 µL 10% SDS (Applichem)
- 50 µL 10% APS (Ammonium Persulfate,)
- 5 µl Temed (Applichem)

- 3,02 ml ddH₂O

Αφαιρείται η ισοπροπανόλη από το separating gel και προστίθεται το stacking gel μέχρι το χείλος του τζαμιού. Ανάμεσα στα δύο τζάμια μπαίνει το ειδικό χτένι (Mini-PROTEAN Comb, 10-well, 1.5 mm, 66 μl, Bio-Rad) για το σχηματισμό των πηγαδιών. Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 20-30 μg πρωτεΐνης αραιώνονται σε τελικό όγκο 20 μl 30 και προστίθενται 4 μl 6x laemmli buffer (12% SDS, 300 mM Tris-HCl 1M pH 6,8, 0,6% μπλε της βρωμοφαινόλης, 60% γλυκερόλη) και 1:80 β-μερκαπτοαιθανόλη. Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών στους 100 °C για 3 λεπτά και μεταφορά στον πάγο. Ως μάρτυρας μοριακών βαρών χρησιμοποιείται ο Color Prestained Protein Standard, Broad Range (New England Biolabs) με μοριακά βάρη 245, 190, 135, 100, 80, 58, 46, 32, 25, 22, 17 και 11 kDa.

Τα έτοιμα gel τοποθετούνται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με running buffer (3,3 g/L Tris base και 14,41 g/L γλυκίνη και 1 g/L SDS). Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια με σύριγγα Hamilton και η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 120 V, για 1-1,5 ώρες.

2.7.26. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη διαδικασία της υγρής μεταφοράς (wet transfer). Το τμήμα του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο separating gel τοποθετείται μέσα σε ειδική κασέτα (Mini Gel Holder Cassette, Bio-Rad) και πάνω από αυτό τοποθετείται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran 0.45 NC nitrocellulose, Amersham). Εκατέρωθεν αυτών τοποθετούνται από 2 κομμάτια χαρτιού Whatman και ένα σφουγγάρι. Όλα τα υλικά είναι διαβρεγμένα με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 2,9 g/L γλυκίνη, 5,8 g/L Tris base, 0,37 g/L SDS και 20% μεθανόλη). Η κασέτα τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς, η οποία γεμίζει με transfer buffer. Εφαρμόζεται στην συσκευή σταθερή ένταση ρεύματος 300 mA για 2 ώρες, όσο η συσκευή βρίσκεται στους 4 °C, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση.

2.7.27. Ανοσοστύπωση τύπου Western

Για τον έλεγχο της μεταφοράς, η μεμβράνη χρωματίζεται με διάλυμα Ponceau S (0,2% Ponceau S και 4% τριχλωροξικό οξύ $C_2HCl_3O_2$), μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Τα περιθώρια της μεμβράνης κόβονται και η χρωστική ξεπλένεται με PBS 1x.

Για την ανοσοστύπωση τύπου Western (Western blot), η μεμβράνη επωάζεται υπό ανακίνηση για 1 ώρα με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων (blocking buffer: 5% γάλα σκόνη και 0,02% Tween-20 σε PBS 1x), μέσα σε πλαστικά τρυβλία. Για αντισώματα που αναγνωρίζουν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, χρησιμοποιείται blocking buffer με BSA (1% BSA και 0,02% Tween-20 σε PBS 1x). Στη συνέχεια αφαιρείται το blocking buffer και προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την πρωτεΐνη που θέλουμε να ποσοτικοποιήσουμε (**Πίνακας 4**). Το αντίσωμα αραιώνεται σε γάλα (1% γάλα και 0,02% Tween20 σε PBS 1x), ή BSA (1% BSA και 0,02% Tween-20 σε PBS 1x) για τα αντισώματα έναντι φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες επωάζονται υπό ανάδευση στους 4 °C όλη νύχτα.

Την επόμενη μέρα οι μεμβράνες ξεπλένονται 3 φορές με διάλυμα 1% γάλα-PBS-Tween και ύστερα προστίθεται αραιωμένο 1:2000 σε 1% γάλα-PBS-Tween το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι anti-mouse ή anti-rabbit αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση HRP (horseradish peroxidase-conjugated antibodies, Cell Signalling). Οι μεμβράνες επωάζονται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1-1,5 ώρες. Ακολουθεί 3 φορές ξέπλυμα με 1% γάλα-PBS-Tween και μία φορά με PBS 1x. Έπειτα, οι μεμβράνες επωάζονται για 5 λεπτά με μίγμα εμφανιστικών διαλυμάτων (LumiSensor, Chemiluminescent HRP Substrate, GenScript) και μετά έκθεση σε φιλμ και εμφάνισή του. Οι εικόνες μεταφέρονται σε υπολογιστή μέσω σάρωσης. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με χρήση του λογισμικού Quantity I Bio-Rad Software.

Αντίσωμα	Τύπος	Αραίωση	Εταιρεία
Anti-NS3 (DENV, GT2811)	Μονόκλωνο ποντικού	1:4000	GeneTex

Anti-DDC (human, DDC C-T)	Πολύκλωνο κουνελιού	1:1000	Affina Immuntechnik GmbH [157]
Anti-DDC (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-actin (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:6000	Chemicon International
Anti-VMAT2 (human)	Μονόκλωνο ποντικού	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Πίνακας 4. Κατάλογος πρώτων αντισωμάτων.

Στατιστική ανάλυση

Σε όλα τα διαγράμματα, οι ράβδοι αναπαριστούν μέσες τιμές τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων εις τριπλούν. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

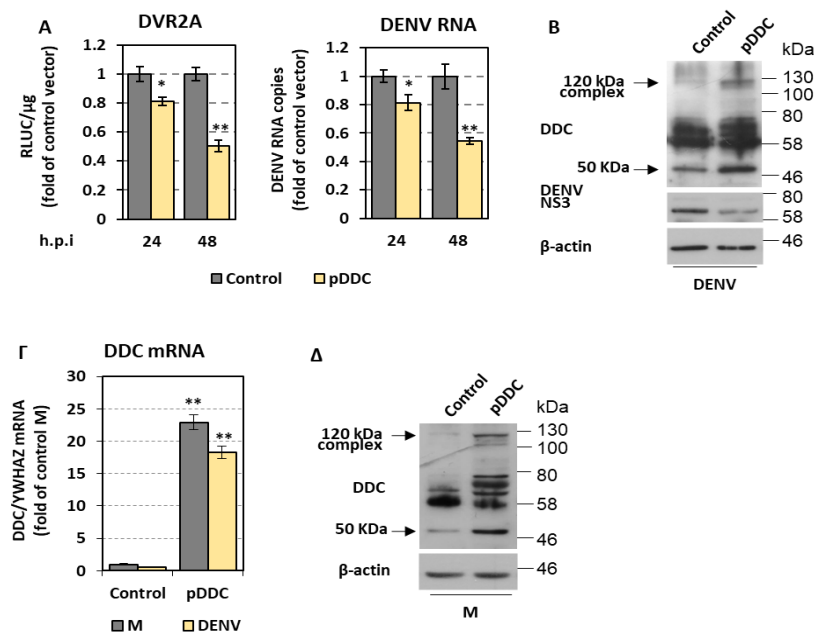
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ DENV ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ

3.1.1. Η επίδραση της υπερέκφρασης της DDC στην ιϊκή αντιγραφή

Η DDC είναι ένα κυτταρικό ένζυμο που καταλύει τη βιοσύνθεση βιογενών αμινών και παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε περιφερικά όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, όπου η βιολογική λειτουργία της δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Εν συνεχεία των πειραμάτων που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ και κατέδειξαν την αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μόλυνσης με DENV και της έκφρασης της DDC [197], στόχος ήταν η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με πειράματα υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε ηπατοκύτταρα και επακόλουθης μόλυνση με DENV. Αναλυτικότερα, για την επαγωγή των ενδοκυτταρικών επιπέδων της DDC, κύτταρα Huh7 υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με το πλασμίδιο φορέα έκφρασης της DDC (pcDNA3,1(+)-DDC), ο οποίος εκφράζει την DDC υπό τον

μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή κυτταρομεγαλοϊού (CMV) [433, 434] ή το πατρικό πλασμίδιο ως αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα, 24 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση, μολύνθηκαν με DENV (DV-2 16681 στέλεχος, MOI=0,1) ή τον DVR2A (MOI=0,1) που εκφράζει *Renilla* λουσιφεράση. Τα επίπεδα RNA του DENV ή της ενεργότητας *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον DENV προσδιορίστηκαν σε κύτταρα που λύθηκαν στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Η υπερέκφραση της DDC επηρέασε αρνητικά την αντιγραφή του DENV (**Εικ. 29 Α**) όπως φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα της *Renilla* λουσιφεράσης αλλά και του DENV RNA. Ομοίως, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στο επίπεδο έκφρασης των ιϊκών πρωτεϊνών κατά την υπερέκφραση της DDC (**Εικ. 29 Β**). Η επαγωγή της έκφρασης του mRNA (**Εικ. 29 Γ**) και της πρωτεΐνης (**Εικ. 29 Δ**) της DDC επιβεβαιώθηκε σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.



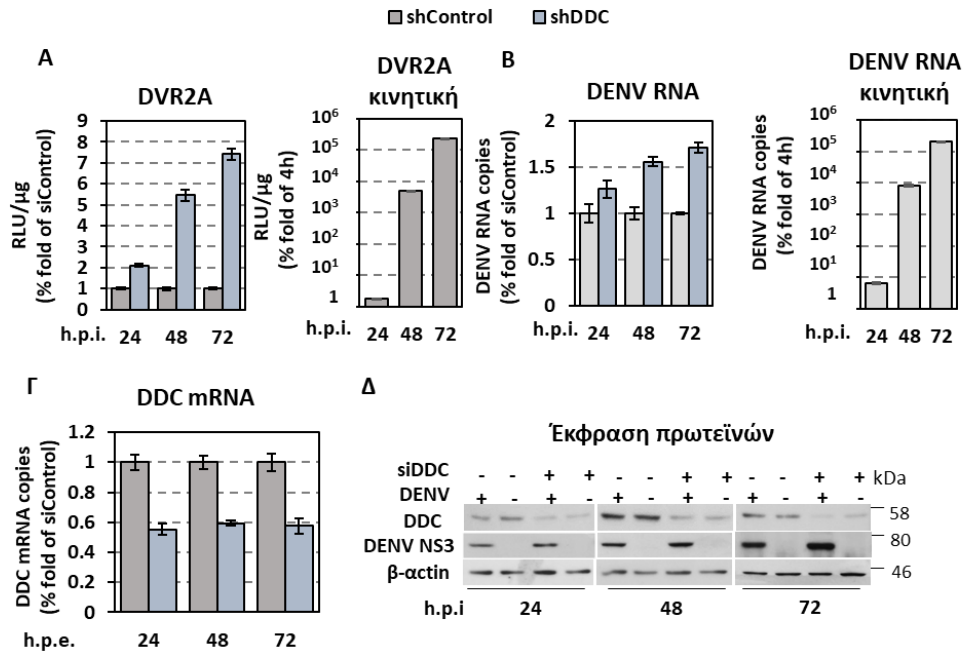
Εικόνα 29: Επίδραση της υπερέκφρασης της DDC στον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Κύτταρα *Huh7* υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με *pcDNA3.1(+)-DDC* (*pDDC*) ή τον πατρικό φορέα *pcDNA3.1(+)* (*control*), 24 ώρες μετά μολύνθηκαν με ιϊκά σωματίδια *DENV* (DV-2 16681 στέλεχος, MOI=0,1) που δεν φέρουν γονίδιο αναφοράς ή που φέρουν το γονίδιο αναφοράς *Renilla* λουσιφεράση (*DVR2A*, MOI=0.1) για 4 ώρες και λύθηκαν στις αναφερόμενες χρονικές στιγμές (*h.p.i*) **A. Αριστερά:** Η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης

(*R-Luc*) που εκφράζεται από το *DVR2A* ποσοτικοποιήθηκε και εκφράστηκε ως *RLU/μg* ολικής πρωτεΐνης. **Δεξιά:** Τα επίπεδα του θετικής πολικότητας RNA του *DENV* ποσοτικοποιήθηκαν με *RT-qPCR* και το mRNA του *YWHAZ* χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **B.** Ανάλυση *Western blot* έναντι των *DDC*, *DENV NS3* και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. **Γ-Δ.** Επίπεδα *DDC mRNA* και πρωτεΐνης σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση και μολύνθηκαν, ή όχι, με *DENV* ($MOI=0,1$), για 48 ώρες. **Γ.** Τα επίπεδα του mRNA της *DDC* προσδιορίστηκαν με *RT-qPCR* και κανονικοποιήθηκαν ως προς το mRNA του *YWHAZ*. **Δ.** Ανάλυση *Western blot* έναντι των *DDC* και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

3.1.2. Σίγηση της έκφρασης της *DDC* με *shRNAi*

Λόγω της αμφίδρομης αρνητικής σχέσης που επικρατεί μεταξύ της μόλυνσης με *DENV* και της έκφρασης της *DDC*, επόμενος στόχος αποτέλεσε η πιθανή επίδραση της αποσιώπησης της έκφρασης της *DDC* στην ιϊκή μόλυνση. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (*small interfering RNA*, *siRNA*) τα οποία μέσω συμπληρωματικότητας υβριδοποιούνται με το mRNA της *DDC* οδηγώντας σε παρεμπόδιση της μετάφρασης ή σε αποικοδόμηση του mRNA με τελικό αποτέλεσμα τη συνολική μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Για την σίγηση λοιπόν των ενδοκυτταρικών επιπέδων της *DDC*, κύτταρα *Huh7,5* υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με πλασμίδιο *psi-LVRH1GP/si-DDC* (*shDDC*) ή το πατρικό πλασμίδιο *psi-LVRH1GP/si-Control* (*shControl*) ως αρνητικό μάρτυρα. Τα κύτταρα, 24 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση, μολύνθηκαν με *DENV* ($MOI=0,1$) ή τον *DVR2A* ($MOI=0,1$) που εκφράζει *Renilla* λουσιφεράση. Τα επίπεδα RNA του *DENV* ή της ενεργότητας *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον *DENV* προσδιορίστηκαν σε κύτταρα που λύθηκαν στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Η αποσιώπηση της *DDC* επηρέασε θετικά την αντιγραφή του *DENV* (**Εικ. 30 A,B αριστερά**) όπως φαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα της *Renilla* λουσιφεράσης αλλά και του *DENV* RNA. Στην **Εικ. 30 A,B δεξιά** φαίνεται η κινητική της ιϊκής αντιγραφής από τις 24 έως

τις 72 ώρες μετά την μόλυνση. Ομοίως, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στο επίπεδο έκφρασης των ιϊκών πρωτεϊνών κατά την αποσιώπηση της DDC (**Εικόνα 30 Δ**). Η καταστολή της έκφρασης 24-72h κατόπιν της ηλεκτροδιάτρησης (h .p.e.) επιβεβαιώθηκε με ποσοτικοποίηση του mRNA της DDC (**Εικ. 30 Γ**) σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης (**Εικόνα 30 Δ**) της DDC επιβεβαιώθηκε σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες.



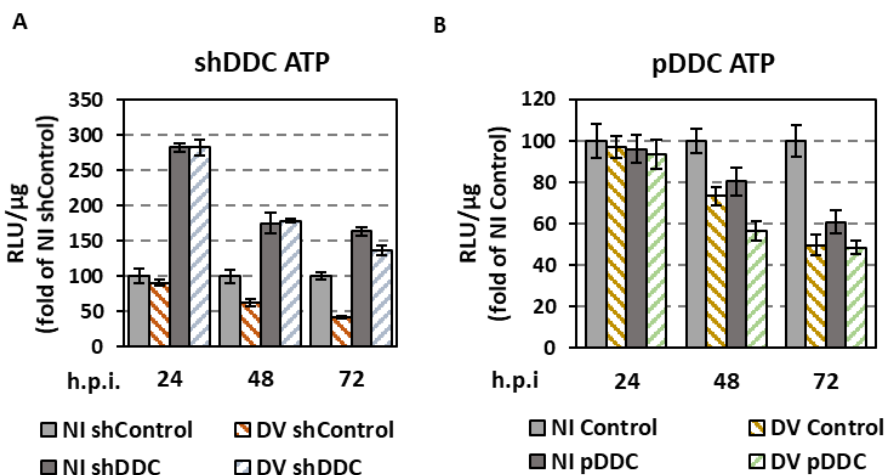
Εικόνα 30: Επίδραση της σίγησης της DDC στον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Κύτταρα *Huh7* υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με τον φορέα αποσιώπησης της DDC (*shDDC*), ή τον φορέα ελέγχου (*shControl*), 24 ώρες μετά μόλυνθηκαν με *DVR2A* ($MOI=0.1$) ή *DENV* ($MOI=0,1$) για 4 ώρες και λύθηκαν στις αναφερόμενες χρονικές στιγμές (h p.i). **A. Αριστερά:** Η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης (*R-Luc*) που εκφράζεται από το *DVR2A* ποσοτικοποιήθηκε και εκφράστηκε ως *RLU/μg* ολικής πρωτεΐνης. **Δεξιά:** Η κινητική του ιϊκού πολλαπλασιασμού εκφράστηκε ως προς τις τιμές των 4 h. **B. Αριστερά:** Τα επίπεδα του θετικής πολικότητας RNA του *DENV* ποσοτικοποιήθηκαν με *RT-qPCR* και το mRNA του *YWHAZ* χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Δεξιά:** Η κινητική του ιϊκού πολλαπλασιασμού εκφράστηκε ως προς τις τιμές των 4 h. **Γ.** Επίπεδα *DDC mRNA* 24-72h p.e. σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση. Τα επίπεδα του mRNA της

DDC προσδιορίστηκαν με RT-qPCR και κανονικοποιήθηκαν ως προς το mRNA του YWHAZ. Οι τιμές εκφράζονται ως λόγοι των κυττάρων ελέγχου (NI shControl) για κάθε χρονική στιγμή. Δ. Ανάλυση Western blot έναντι των DDC, DENV NS3 και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

3.1.3. Επίδραση της υπερέκφρασης και της σίγησης της DDC στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP

Ο κυρίαρχος ρόλος της DDC ως κεντρικός ρυθμιστής πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών κυτταρικής βιωσιμότητας, αποτέλεσε την αιτία για να μελετηθεί στην συνέχεια η επίδραση της σίγησης και της υπερέκφρασης του ενζύμου στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP καθώς και στη μεσολαβούμενη από τον DENV κυτταρική απόπτωση. Κύτταρα Huh7 υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με τον φορέα αποσιώπησης της DDC (shDDC), ή τον φορέα ελέγχου ως αρνητικό μάρτυρα (shControl) και 24 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση, πραγματοποιήθηκε μόλυνση με DENV (MOI=1) και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Αρχικά παρατηρείται αύξηση έως και 3 φορές στα ενδοκυττάρια επίπεδα του ATP στα μη μολυσμένα κύτταρα (NI) που υποεκφράζουν την DDC σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα κύτταρα μάρτυρες (NI shControl) (**Εικ. 31 A**). Η μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα του ATP είναι εμφανής στα μολυσμένα με DENV κύτταρα-μάρτυρες ενώ η αποσιώπηση της DDC φαίνεται να μειώνει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από τον DENV στις 48 και στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση όπως προσδιορίζεται με μέτρηση του ενδοκυτταρικού ATP (**Εικ. 31 A**).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μόλυνση με DENV (MOI=1) και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP σε κύτταρα Huh7 που υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με pcDNA3.1(+)-DDC (pDDC) ή τον πατρικό φορέα pcDNA3.1(+) (control). Αρχικά παρατηρείται μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα του ATP στα μη μολυσμένα κύτταρα (NI) που υπερεκφράζουν την DDC σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα κύτταρα μάρτυρες (NI Control) (**Εικ. 31 B**). Η μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα του ATP είναι εμφανώς μεγαλύτερη στα μολυσμένα με DENV κύτταρα παρουσία υπερέκφρασης (**Εικ. 31 B**).

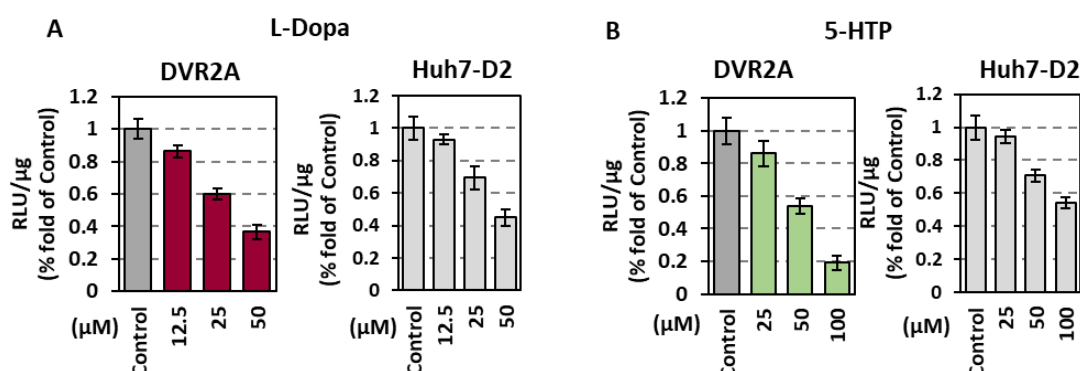


Εικόνα 31: Η έκφραση της DDC επηρεάζει τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP και την διαμεσολαβούμενη από τον DENV απόπτωση των κυττάρων. Κύτταρα Huh7 υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση **A.** με τον φορέα αποσιώπησης της DDC (*shDDC*), ή τον φορέα ελέγχου (*control*) και **B.** με *pcDNA3.1(+)-DDC* (*pDDC*) ή τον πατρικό φορέα *pcDNA3.1(+)* (*control*). 24 ώρες μετά μόλυνθηκαν με DENV (*MOI* = 1) για 4 ώρες, λύθηκαν στις αναφερόμενες χρονικές στιγμές (*h p.i*) και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές εκφράζονται ως λόγοι των μη μολυσμένων κυττάρων ελέγχου (*NI shControl*, *NI Control*) για κάθε χρονική στιγμή.

3.1.4. Επίδραση των υποστρωμάτων της DDC στον ιικό πολλαπλασιασμό

Εξωγενής χορήγηση των υποστρωμάτων της DDC, της L-Dopa και της 5-υδροξυτρυπτοφάνης (5-HTP) μελετήθηκε ως προς την δυνητική επίδραση τους στην αντιγραφή του DENV. Μολυσμένα με DVR2A (*MOI*=0.1) Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με διαδοχικές, μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων και προσδιορίστηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης (**Εικ. 32 A,B αριστερά-DVR2A**). Παράλληλα, για τον έλεγχο των υποστρωμάτων έναντι της αντιγραφής του DENV χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Huh7-D2, που εκφράζει το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του DENV2 (βλ. 2.2). Για την ποσοτικοποίηση της ιικής αντιγραφής, μετρήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης, η οποία συνεκφράζεται από το ιικό ρεπλικόνιο. Ομοίως, παρατηρείται

δοσοεξαρτώμενη μείωση στα επίπεδα αντιγραφής του DENV παρουσία υποστρωμάτων (**Εικ. 32 A,B δεξιά-Huh7-D2**).



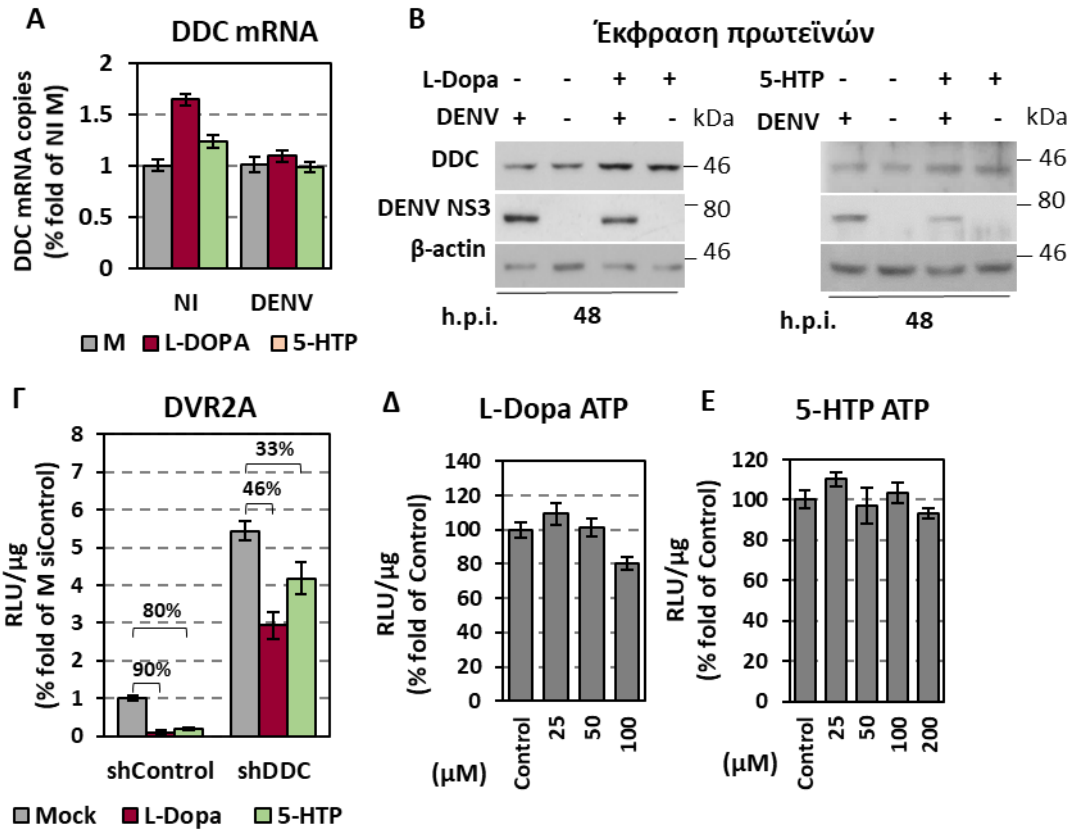
Εικόνα 32: Τα υποστρώματα της DDC επιδρούν αρνητικά στον ιϊκό πολλαπλασιασμό. A,B Αριστερά: Huh7 κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις L-Dopa και 5-HTP για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. **Δεξιά:** Έλεγχος της δράσης των υποστρωμάτων στην ιϊκή αντιγραφή έγινε μετά από επώαση κυττάρων Huh7-D2 για 48h με L-Dopa και 5-HTP στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα control ορίστηκαν ως 1.

Κατόπιν, στόχος ήταν η διακρίβωση της πιθανής επίδρασης της εξωγενούς χορήγησης των υποστρωμάτων στην έκφραση της DDC. Για το λόγο αυτό, το mRNA της DDC ποσοτικοποιήθηκε σε κύτταρα μη μολυσμένα ή μολυσμένα με DENV (MOI=0.1) τα οποία επώαστηκαν με τις μεγαλύτερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων για 48h. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 33 A** κατόπιν επώασης με τα υποστρώματα παρατηρείται αύξηση του mRNA της DDC, η οποία αναστρέφεται παρουσία του ιού. Ο φαινότυπος αυτός δεν παρατηρείται στον ίδιο βαθμό σε πρωτεϊνικό επίπεδο (**Εικ. 33 B**) καθώς η επώαση με τα υποστρώματα προκαλεί συσσώρευση της DDC πρωτεΐνης αλλά χωρίς ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ μη μολυσμένων και μολυσμένων με DENV (MOI=0,1) κυττάρων. Ωστόσο, επιβεβαιώνεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο η δράση των υποστρωμάτων στην ιϊκή

αντιγραφή εφόσον τα επίπεδα της DENV NS3 είναι εμφανώς μειωμένα σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου **(Εικ. 33 Β)**.

Στη συνέχεια, εφόσον η εξωγενής προσθήκη υποστρωμάτων του ενζύμου επηρέασε αρνητικά την ιϊκή αντιγραφή, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η πιθανή επίδραση τους με ταυτόχρονη αποσιώπηση του ενζύμου. Επομένως, 24 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση με τον φορέα αποσιώπησης (shDDC) ή τον πατρικό φορέα (shControl), πραγματοποιήθηκε μόλυνση με DVR2A (MOI=0.1) για 4 ώρες και ακολούθησε επώαση με τα υποστρώματα στις μέγιστες ασφαλείς συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα ενεργότητας *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον DENV προσδιορίστηκαν σε κύτταρα που λύθηκαν στις 48 ώρες **(Εικ. 33 Γ)**. Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά, η 90% μείωση στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής που παρατηρείται με εξωγενή προσθήκη L-Dopa (50μM) στα κύτταρα-μάρτυρες (sh

Control) μειώνεται στο 46% στα κύτταρα που υποεκφράζεται η DDC. Αντίστοιχα, η 80% μείωση με εξωγενή προσθήκη 5-HTP (100μM) μειώνεται στο 33%. Για τον προσδιορισμό των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων, L-Dopa και 5-HTP, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με διαδοχικές συγκεντρώσεις αυτών για 48h και κατόπιν προσδιορίστηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP **(Εικ. 33 Δ,Ε)**.

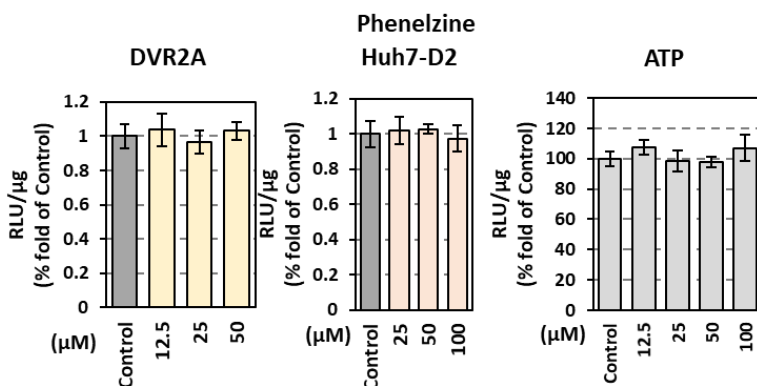


Εικόνα 33: Επίδραση των υποστρωμάτων στην έκφραση της DDC. A,B. Κύτταρα *Huh7* μολυσμένα με *DENV* ($MOI = 0,1$) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (M), με *L-Dopa* ($50\mu M$) και *5-HTP* ($100\mu M$) για 48 ώρες. **A.** Το mRNA της *DDC* ποσοτικοποιήθηκε με *RT-qPCR* και το mRNA του *YWHAZ* χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **B.** Έγινε ανάλυση *Western blot* έναντι των *DENV NS3*, *DDC*, και β -ακτίνης. Η β -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. **Γ.** Κύτταρα *Huh7* υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με τον φορέα αποσιώπησης της *DDC* (*shDDC*), ή τον φορέα ελέγχου (*control*). 24 ώρες μετά μολύνθηκαν με *DVR2A* ($MOI = 0,1$) για 4 ώρες, και επώαστηκαν, ή όχι (*Mock*), με *L-Dopa* ($50\mu M$) και *5-HTP* ($100\mu M$). Τα κύτταρα λύθηκαν 48 ώρες αργότερα και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως *RLU/μg* ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα *si-control Mock* ορίστηκαν ως 1. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό μείωσης των επιπέδων λουσιφεράσης

μεταξύ των τιμών που βρίσκονται στις δύο άκρες της αγκύλης. **Δ,Ε.** Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις L-Dopa και 5-HTP και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης.

3.1.5. Οι οξειδάσες μονοαμινών A και B (MAO A και B) και η επίδραση των αναστολέων τους

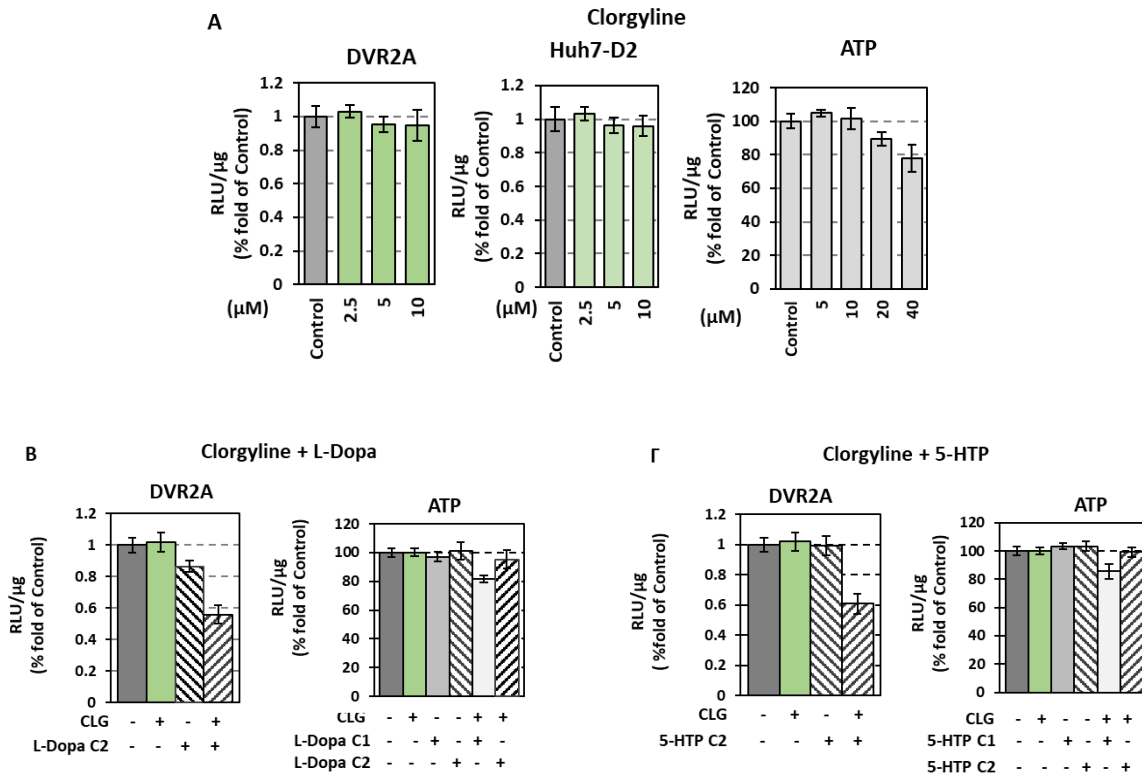
Οι οξειδάσες των μονοαμινών είναι φλαβοένζυμα υπεύθυνα για την οξείδωση των αμινών συμπεριλαμβανομένων πολλαπλών νευροδιαβιβαστών, στις αντίστοιχες ιμίνες (βλ.1.3.1). Αρχικά, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν ή όχι με τον μη αντιστρεπτό αναστολέα rhelzelzine, ο οποίος αναστέλλει μόνιμα την λειτουργία και των δύο ισοενζύμων [252]. Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI=0.1) επωάστηκαν με τον αναστολέα rhelzelzine για 48 ώρες και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον ιό (**Εικ. 34 αριστερά**). Όπως φαίνεται η επώαση των κυττάρων με rhelzelzine πιθανώς δεν επηρεάζει τα επίπεδα αντιγραφής του DENV. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα κατόπιν επώασης Huh7-D2 κυττάρων (**Εικ. 34 κέντρο**). Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προσδιορίστηκαν από τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ATP σε κύτταρα που επωάστηκαν για 48h με διαδοχικές συγκεντρώσεις του αναστολέα (**Εικ. 34 δεξιά**).



Εικόνα 34: Επίδραση του αναστολέα των MAO, phenelzine, στην αντιγραφή του DENV. **Αριστερά:** Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις phenelzine για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. **Κέντρο:** Έλεγχος της δράσης του αναστολέα στην ιική αντιγραφή έγινε μετά από επώαση κυττάρων Huh7-D2 για 48h με phenelzine στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (Control) ορίστηκαν ως 1. **Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις phenelzine και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης.

Ομοίως, χρησιμοποιήθηκε και η clorgyline, ο αντιστρεπτός και ειδικός για τις MAO A αναστολέας. Η απουσία επίδρασης του αναστολέα σε διαδοχικές μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (**Εικ. 35 Α δεξιά**) στον DENV φαίνεται τουλάχιστον στο επίπεδο της αντιγραφής (**Εικ. 35 Α αριστερά, κέντρο**). Ωστόσο, πραγματοποιήθηκε περεταίρω ανάλυση με ταυτόχρονη επώαση μολυσμένων κυττάρων με clorgyline και 5-HTP ή L-Dopa. Αρχικά, προσδιορίστηκαν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του συνδυασμού κατόπιν επώασης Huh7 κυττάρων με clorgyline (5μM) και διαδοχικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Παράλληλα, κύτταρα επωασμένα με το διαλύτη H₂O χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP προσδιορίστηκαν 48 ώρες μετά την επώαση (**Εικ. 35 Β,Γ-δεξιά**) και ο εκάστοτε μη κυτταροτοξικός συνδυασμός αλλά και ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση μολυσμένων με DVR2A (MOI=0,1) κυττάρων προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα λουσιφεράσης που προκύπτει από τον ιό. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 35 Β,Γ-αριστερά** όταν πραγματοποιείται ταυτόχρονη επώαση με clorgyline και τα υποστρώματα σε περίσσεια, τότε παρατηρείται μείωση στα επίπεδα ιικής αντιγραφής έως και 50%. Για κάθε πληθυσμό, ως 1 θεωρήθηκαν οι τιμές λουσιφεράσης από τα κύτταρα που επώαστηκαν με H₂O για 48 ώρες (M) και εκφράστηκαν ως προς αυτές οι αντίστοιχες

τιμές από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τους παράγοντες και τον συνδυασμό αυτών για 48 ώρες.



Εικόνα 35: Επίδραση του αναστολέα των MAO A, clorgyline, στην αντιγραφή του DENV. Α. Αριστερά: Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις clorgyline για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. **Κέντρο:** Έλεγχος της δράσης του αναστολέα στην ιική αντιγραφή έγινε μετά από επώαση κυττάρων Huh7-D2 για 48h με clorgyline στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (Control) ορίστηκαν ως 1. **Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις clorgyline και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. **Β-Γ, Αριστερά:** Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (M), με clorgyline (5μM) και **(Β)** L-Dopa C2 ή **(Γ)** 5-HTP C2 και τον συνδυασμό **(Β)** clorgyline/L-Dopa ή **(Γ)** clorgyline/5-HTP, αντίστοιχα, για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό.

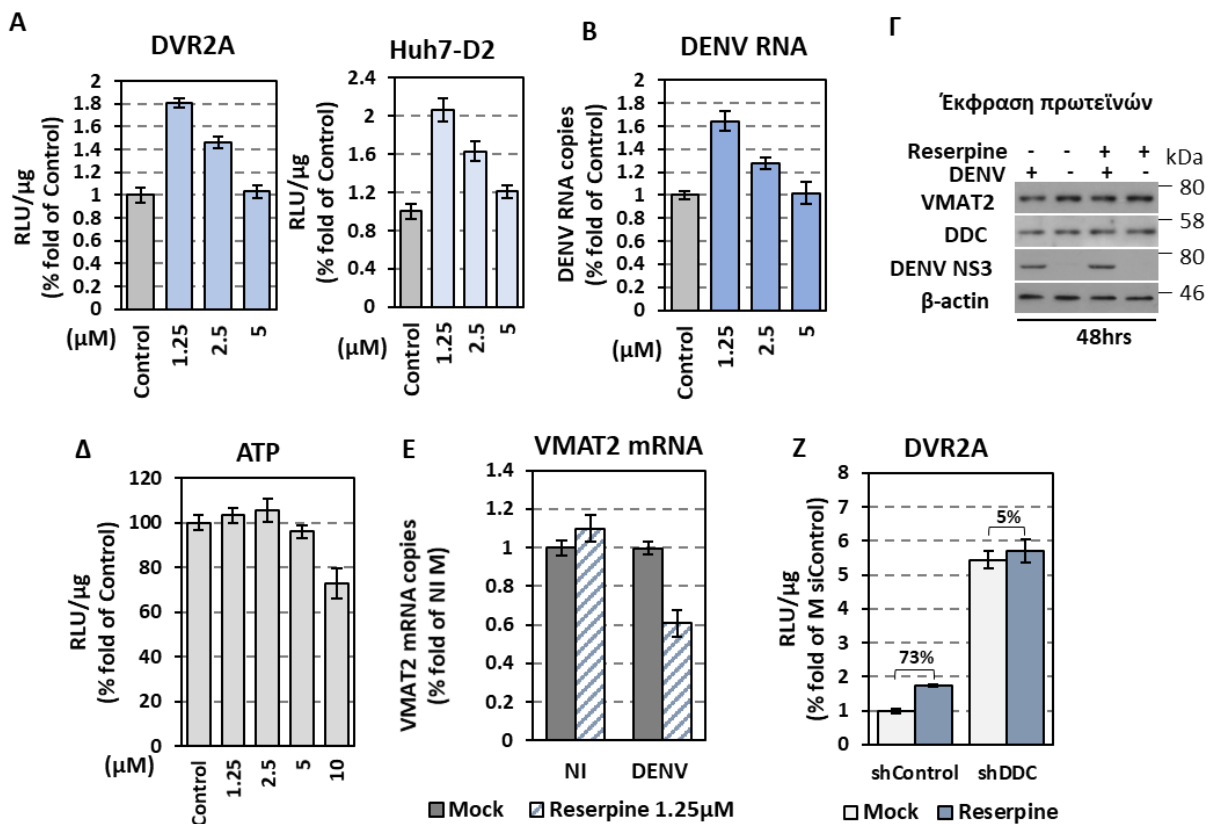
Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (M) ορίστηκαν ως 1. **Β-Γ, Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 48 ώρες με *clorgyline* και διαδοχικές συγκεντρώσεις **(B)** L-Dopa και **(Γ)** 5-HTP και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Για την L-Dopa: C1=30μM, C2=15μM και για το 5-HTP: C1=50μM, C2=25μM

3.1.6. Κυστιδιακοί μεταφορείς μονοαμινών (VMATs) και η επίδραση του αναστολέα τους

Εκατέρωθεν της βιοσύνθεσης τους, οι βιογενείς αμίνες αποθηκεύονται σε κυστίδια από τους κυστιδιακούς μεταφορείς μονοαμινών 1 και 2 (VMAT1 και 2) (βλ. 1.3.2) [96], οι οποίοι έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε νευρώνες. Αρχικά, κρίθηκε αναγκαίο να εξακριβωθεί κατά πόσο οι VMATs εκφράζονται σε ηπατοκύτταρα. Huh7 κύτταρα λύθηκαν και το ποσοτικοποιήθηκε το mRNA των VMAT1 και VMAT2 με RT-qPCR όπου φάνηκε ότι τα ηπατοκύτταρα πιθανώς εκφράζουν μόνο VMAT2 καθώς τα επίπεδα του VMAT1 mRNA δεν ήταν ανιχνεύσιμα (δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα). Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του ειδικού αναστολέα των VMAT, reserpine [295], στην μόλυνση με DENV. Αρχικά, κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI=0.1) για 4 ώρες, επωάστηκαν με reserpine για 48 ώρες και μετρήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον ιό (**Εικ. 36 Α αριστερά**). Όπως φαίνεται, η reserpine επηρεάζει θετικά τα επίπεδα αντιγραφής του DENV με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της reserpine με την οποία επωάζονται τα κύτταρα, τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση που παρατηρείται στα επίπεδα R-Luc. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση έως και 2 φορές σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Control) όταν τα κύτταρα επωαστούν με reserpine 1.25μM. Επιπλέον, η reserpine επηρέασε τουλάχιστον το στάδιο της αντιγραφής του ιικού RNA, όπως επιβεβαιώθηκε κατά την επώαση Huh7-D2 κυττάρων με τις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (**Εικ. 36 Α δεξιά**). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο RNA του DENV (**Εικ. 36 Β**) αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (**Εικ. 36 Γ**) κατόπιν μόλυνσης Huh7 κυττάρων με DENV

(MOI=0.1) για 4 ώρες και επώασης των μολυσμένων κυττάρων με διαδοχικές συγκεντρώσεις reserpine. Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίστηκαν όπως έχει περιγραφεί παραπάνω **(Εικ. 36 Δ)**.

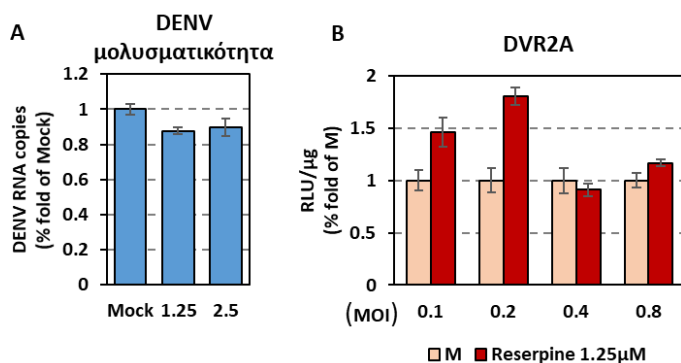
Η συγκέντρωση της reserpine που φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη θετική επίδραση στον ιικό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκε για την επώαση μη μολυσμένων και μολυσμένων με DENV (MOI=0.1) κυττάρων και ακολούθησε επώαση για 48 ώρες. Από τα επίπεδα mRNA **(Εικ. 36 Ε)** και πρωτεΐνης **(Εικ. 36 Γ)** των VMAT2 προκύπτει ότι η reserpine 1.25μM δεν επηρεάζει την έκφραση των μεταφορέων. Επιπλέον, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν τα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής με παράλληλη αποσιώπηση της DDC και αναστολής της αποθήκευσης των βιογενών αμινών σε κυστίδια. Έτσι, 24 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση Huh7 κυττάρων με τον φορέα αποσιώπησης της DDC (shDDC), πραγματοποιήθηκε μόλυνση με DVR2A (MOI=0.1) για 4 ώρες και ακολούθησε επώαση με reserpine (1.25μM) για 48 ώρες. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ενεργότητας *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον DENV και όπως φαίνεται χαρακτηριστικά, η 73% αύξηση στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής που παρατηρείται με προσθήκη reserpine (1.25μM) στα κύτταρα-μάρτυρες (shControl) εξαλείφεται στα κύτταρα που υποεκφράζεται η DDC **(Εικ. 36 Ζ)**.



Εικόνα 36: Επίδραση του αναστολέα των VMAT2, reserpine, στον ιικό πολλαπλασιασμό και στην έκφραση των μεταφορέων. Huh7 κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) ή DENV (MOI=0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις reserpine για 48h. **A. Αριστερά:** Ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. **Δεξιά:** Έλεγχος της δράσης του αναστολέα στην ιική αντιγραφή έγινε μετά από επώαση κυττάρων Huh7-D2 για 48h με reserpine στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (Control) ορίστηκαν ως 1. **B.** Το θετικής πολικότητας DENV RNA ποσοτικοποιήθηκε με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Γ.** Έγινε ανάλυση Western blot έναντι των VMAT2, DDC, DENV NS3 και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. **Δ.** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις reserpine και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. **E.** Το VMAT2 mRNA

ποσοτικοποιήθηκε με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Z.** Κύτταρα Huh7 υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με τον φορέα αποσιώπησης της DDC (*shDDC*), ή τον φορέα ελέγχου (*shControl*). 24 ώρες μετά μολύνθηκαν με DVR2A (MOI = 0,1) για 4 ώρες, και επώαστηκαν, ή όχι (*Mock*), με *reserpine* (1.25μM). Τα κύτταρα λύθηκαν 48 ώρες αργότερα και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα *shControl Mock* ορίστηκαν ως 1. Οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό αύξησης των επιπέδων λουσιφεράσης μεταξύ των τιμών που βρίσκονται στις δύο άκρες της αγκύλης.

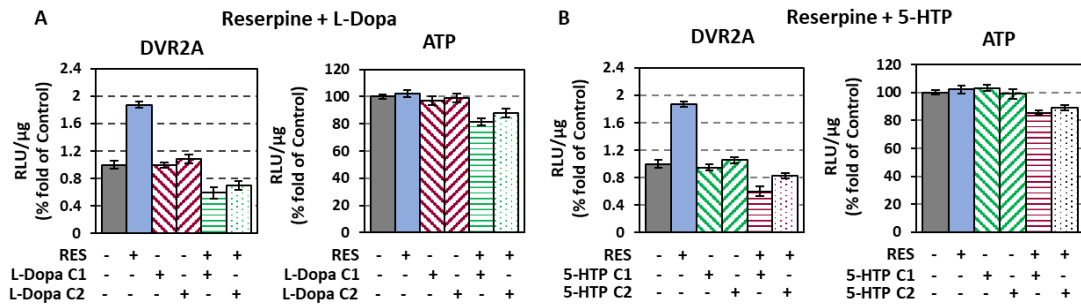
Επιπροσθέτως, η επίδραση της *reserpine* στην ιϊκή μολυσματικότητα προσδιορίστηκε με μόλυνση νέων κυττάρων Huh7 με τα υπερκείμενα των μολυσμένων κυττάρων που επώαστηκαν με *reserpine* και όπως φαίνεται στην **Εικ. 37 A**, η *reserpine* δεν αύξησε την ιϊκή μολυσματικότητα για τον DENV. Τέλος, εφόσον η επώαση με *reserpine* φαίνεται να ευνοεί την ιϊκή αντιγραφή, πραγματοποιήθηκε μόλυνση με DVR2A διάφορων MOI για 4 ώρες και ακολούθησε επώαση με *reserpine* (1.25μM) για 48 ώρες. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 37 B** από τα επίπεδα ενεργότητας R-Luc που προσδιορίστηκαν, η επίδραση της *reserpine* στην αντιγραφή του DENV μειώνεται όσο αυξάνεται το MOI δηλαδή όσο αυξάνεται ο αριθμός των ιϊκών σωματιδίων που αντιστοιχούν ανά κύτταρο κατά τη μόλυνση τόσο καταστέλλεται η δράση της *reserpine*.



Εικόνα 37: Η δράση της *reserpine* δεν επηρεάζει την μολυσματικότητα του DENV αλλά εξαρτάται από το MOI. A. Το υπερκείμενο από τα μολυσμένα κύτταρα που

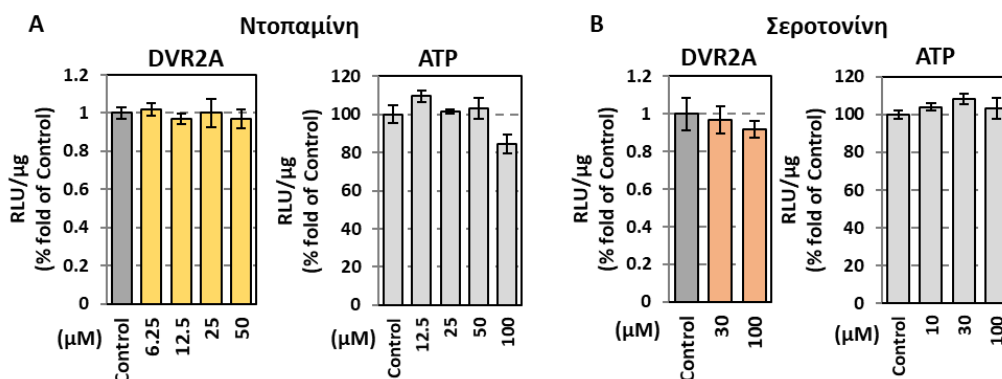
είχαν επωαστεί ή όχι με *reserpine* για 48 ώρες χρησιμοποιήθηκαν για να μολύνουν νέα κύτταρα, τα οποία λύθηκαν στις 48 ώρες και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα *DENV RNA*, ενδεικτικά των επιπέδων μολυσματικότητας του πρώτου κύκλου μόλυνσης. Το θετικής πολικότητας *DENV RNA* ποσοτικοποιήθηκε με *RT-qPCR*. Το *mRNA* του *ΨWHAZ* χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **B.** Κύτταρα μολυσμένα με *DVR2A* $MOI = 0.1$ έως $0,8$ για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (*M*), με *reserpine* ($1,25\mu M$) για 48h. Ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα *R-Luc* που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως *RLU/μg* ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (*M*) ορίστηκαν ως 1.

Εν συνεχεία, και εφόσον ο συνδυασμός *clorgyline* και υποστρωμάτων σε περίσσεια είχε σαφή επίδραση στην ιϊκή αντιγραφή, εξετάστηκε η πιθανότητα διαφορικής επίδρασης στην αντιγραφή του *DENV* κατόπιν ταυτόχρονης επώασης μολυσμένων κυττάρων με *reserpine* και 5-HTP ή L-Dopa. Αρχικά, στόχος ήταν ο προσδιορισμός των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του συνδυασμού μέσω επώασης *Huh7* κυττάρων με *reserpine* ($1.25\mu M$) και διαδοχικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων. Παράλληλα, κύτταρα επωασμένα με τον διαλύτη χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα ενδοκυττάρια επίπεδα *ATP* προσδιορίστηκαν 48 ώρες μετά την επώαση (**Εικ. 38 A,B δεξιά**) και όπως φαίνεται οι συνδυασμοί ακόμα και με τις μικρότερες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων μειώνουν αισθητά τα *ATP* επίπεδα. Ωστόσο, ο εκάστοτε συνδυασμός αλλά και ο κάθε παράγοντας ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση μολυσμένων με *DVR2A* ($MOI=0,1$) κυττάρων προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα λουσιφεράσης που προκύπτει από τον ιό. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 38 A,B αριστερά** όταν πραγματοποιείται ταυτόχρονη επώαση με *reserpine* και υποστρώματα σε περίσσεια, τότε παρατηρείται μείωση στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής. Για κάθε πληθυσμό, ως 1 θεωρήθηκαν οι τιμές λουσιφεράσης από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τον διαλύτη για 48 ώρες και εκφράστηκαν ως προς αυτές οι αντίστοιχες τιμές από τα κύτταρα που επώαστηκαν με τους παράγοντες και τον συνδυασμό αυτών για 48 ώρες.



Εικόνα 38: Η αναστολή της αποθήκευσης των υποστρωμάτων σε περίσσεια επιδρά αρνητικά στην ιϊκή αντιγραφή και στη κυτταρική βιωσιμότητα. A-B, αριστερά: Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (M), με reserpine (1.25μM) και (A) L-Dopa ή (B) 5-HTP στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις και τον συνδυασμό reserpine/L-Dopa ή reserpine/5-HTP, αντίστοιχα, για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (M) ορίστηκαν ως 1. A-B, δεξιά: Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με reserpine (1.25μM) και διαδοχικές συγκεντρώσεις (A) L-Dopa και (B) 5-HTP και τον συνδυασμό reserpine/L-Dopa ή reserpine/5-HTP, αντίστοιχα και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Για την L-Dopa: C1=15μM, C2=7,5μM και για το 5-HTP: C1=25μM, C2=12,5μM

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της εξωγενούς χορήγησης των προϊόντων της DDC, ντοπαμίνης και σεροτονίνης, στην ιϊκή αντιγραφή. Huh 7 κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI=0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν με ντοπαμίνη και σεροτονίνη για 48 ώρες και μετρήθηκε η ενεργότητα *Renilla* λουσιφεράσης που εκφράζεται από τον ιό (Εικ. 39 A,B αριστερά). Όπως φαίνεται, η επώαση μολυσμένων κυττάρων με τα προϊόντα δεν επηρεάζουν την αντιγραφή του DENV. Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις της ντοπαμίνης και σεροτονίνης προσδιορίστηκαν όπως έχει περιγραφεί (Εικ. 39 A,B δεξιά).



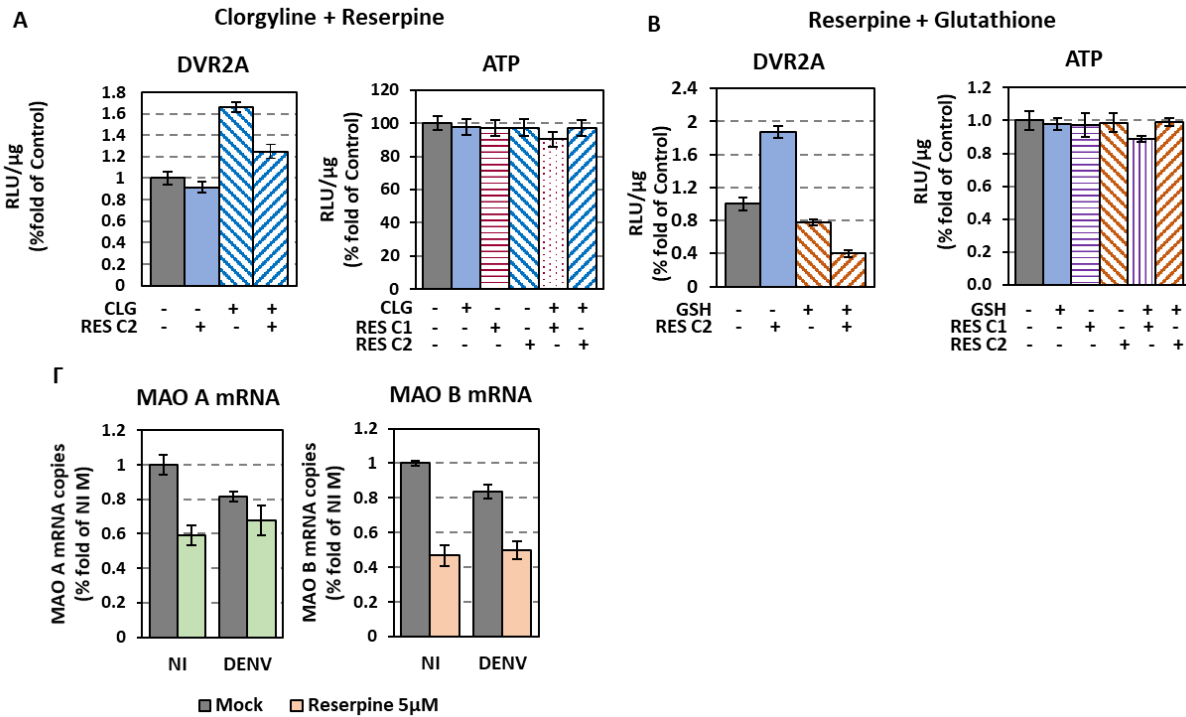
Εικόνα 39: Η εξωγενής χορήγηση ντοπαμίνης και σεροτονίνης δεν επιδρά στην αντιγραφή του DENV. **A-B Αριστερά:** Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Control), με **(A)** ντοπαμίνη και **(B)** σεροτονίνη στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (Control) ορίστηκαν ως 1. **A-B Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις **(A)** ντοπαμίνης και **(B)** σεροτονίνης και μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης.

3.1.7. Το οξειδωτικό στρες στην μόλυνση με DENV

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (βλ. 1.4) η αναστολή αποθήκευσης των βιογενών αμινών σε κυστίδια έχει ως αποτέλεσμα της αποικοδόμηση τους μέσω ενζυμικής και μη οξείδωσης τους στο κυτταρόπλασμα. Για το λόγο διερευνήθηκε η πιθανότητα η οποιαδήποτε δράση της reserpine να σχετίζεται με το προκαλούμενο οξειδωτικό στρες. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη επώαση μολυσμένων κυττάρων με clorgyline και reserpine για την αναστολή της οξείδωσης και της αποθήκευσης των βιογενών αμινών. Ο μη κυτταροτοξικός συνδυασμός των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε για την επώαση Huh7 κυττάρων μολυσμένων με DVR2A (MOI=0,1) προκειμένου να προσδιοριστεί η ενεργότητα λουσιφεράσης και όπως φαίνεται στην **Εικ. 40 A αριστερά** όταν πραγματοποιείται ταυτόχρονη επώαση με reserpine

(1.25μM) και clorgyline (5μM), τότε ανατρέπεται η θετική επίδραση της πρώτης στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής. Για κάθε πληθυσμό, ως 1 θεωρήθηκαν οι τιμές λουσιφεράσης από τα κύτταρα που επωάστηκαν με τον διαλύτη για 48 ώρες (Control) και εκφράστηκαν ως προς αυτές οι αντίστοιχες τιμές από τα κύτταρα που επωάστηκαν με τους παράγοντες και τον συνδυασμό αυτών για 48 ώρες. Οι ασφαλείς συγκεντρώσεις του συνδυασμού προέκυψαν από κύτταρα που επωάστηκαν ταυτόχρονα με clorgyline και reserpine σε διάφορες συγκεντρώσεις και προσδιορίστηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP όπως έχει περιγραφεί (**Εικ. 40 Α δεξιά**).

Επόμενη συνθήκη που μελετήθηκε για να εξακριβωθεί εάν η θετική επίδραση της reserpine στην ιϊκή αντιγραφή εξαρτάται από τα παραγόμενα ROS είναι η ταυτόχρονη επώαση κυττάρων με τον αναστολέα των VMAT2 και ενός σημαντικού αντιοξειδωτικού μορίου, την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Huh7 κύτταρα επωάστηκαν ταυτόχρονα με reserpine και GSH σε διάφορες συγκεντρώσεις για 48 ώρες. Εφόσον προσδιορίστηκαν οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των παραγόντων και του συνδυασμού αυτών από τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP (**Εικ. 40 Β δεξιά**), μολυσμένα με DVR2A (MOI=0.1) για 4 ώρες, κύτταρα επωάστηκαν με reserpine (1,25μM), GSH 10mM και τον συνδυασμό τους για 48 ώρες. Όπως φαίνεται από την ενεργότητα R-Luc που μετρήθηκε (**Εικ. 40 Β αριστερά**), η προσθήκη GSH που μειώνει τη δράση των παραγόμενων ROS αναστρέφει την επίδραση της reserpine μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα της ιϊκής αντιγραφής. Επιπλέον, κύτταρα μη μολυσμένα και μολυσμένα με DENV (MOI=0.1) για 4 ώρες, επωάστηκαν με reserpine στην μεγαλύτερη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση (5μM) και 48 ώρες μετά τη μόλυνση, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA των MAO. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 40 Γ** η έκφραση των MAO A και B μειώνεται σημαντικά κατόπιν επώασης των κυττάρων με reserpine χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ μολυσμένων και μη κυττάρων.

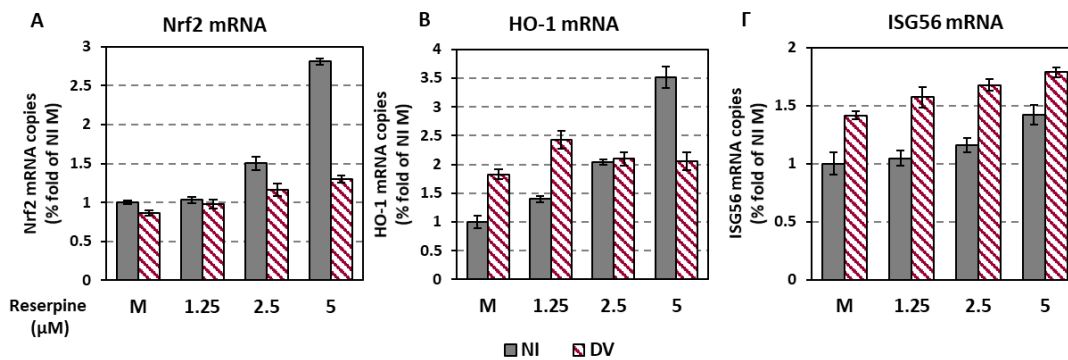


Εικόνα 40: Η δράση της reserpine εξαρτάται από το οξειδωτικό στρες. **A Αριστερά: Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (M), με reserpine C2 και clorgyline (5μM) και τον συνδυασμό reserpine/clorgyline για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (M) ορίστηκαν ως 1. **Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με clorgyline (5μM) και reserpine σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και μετρήθηκαν τα ενδοκυτάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. **B Αριστερά:** Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (M), με reserpine C2 και glutathione (10mM) και τον συνδυασμό reserpine/glutathione για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα ελέγχου (M) ορίστηκαν ως 1. **Δεξιά:** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με reserpine και glutathione σε διαδοχικές συγκεντρώσεις και μετρήθηκαν τα ενδοκυτάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Για την reserpine: C1=2.5μM, C2=1.25μM. **Γ.** Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI =**

0,1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (Mock), με reserpine (5μM) για 48 ώρες. Ποσοτικοποιήθηκε το mRNA των MAO A και B με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση.

Στη συνέχεια, δίνοντας έμφαση στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, μελετήθηκε η έκφραση του κυτταροπροστατευτικού παράγοντα Nrf2 καθώς και των αντιοξειδωτικών γονιδίων που επάγονται εξ αυτού. Επομένως, Huh7 κύτταρα μολύνθηκαν με DENV (MOI=0.1) για 4 ώρες και ακολούθησε επώαση των κυττάρων με διαδοχικές συγκεντρώσεις reserpine για 48 ώρες. Ταυτόχρονα, στις ίδιες συνθήκες επώαστηκαν και μη μολυσμένα κύτταρα. Στην **Εικ. 41** φαίνονται τα επίπεδα mRNA (**A**) του Nrf2 και (**B**) της heme oxygenase-1 (HO-1), του αντιοξειδωτικού γονιδίου που επάγεται. Όπως είναι φανερό η έκφραση και των δύο γονιδίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της reserpine και, μάλιστα, η μεγαλύτερη συγκέντρωση reserpine (5μM) αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του Nrf2 έως και 2,5 φορές ενώ της HO-1 έως και 3,5 φορές.

Όσον αφορά την επίδραση του DENV, από τα κύτταρα ελέγχου (M) φαίνεται πως παρουσία του ιού μειώνεται ελάχιστα η έκφραση του Nrf2 ενώ, αντίθετα, η έκφραση της HO-1 διπλασιάζεται σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα ελέγχου (M NI) (**Εικ. 41 A,B**). Επιπλέον, η επίδραση της reserpine στην έκφραση των δύο αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων παρουσία του DENV επηρεάζεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά με χαμηλότερο ρυθμό όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της reserpine. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η έκφραση του ISG56 (Interferon Stimulated Gene 56), ενός γονιδίου με καθοριστικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση έναντι της ιϊκής μόλυνσης. Τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν σε επίπεδο mRNA και φαίνεται να αυξάνονται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο κατόπιν επώασης μη μολυσμένων κυττάρων με reserpine (**Εικ. 41 Γ**). Εντούτοις, η παρουσία της μόλυνσης φαίνεται να προκαλεί αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου έως και 1,5 φορά (**Εικ 41 Γ**).

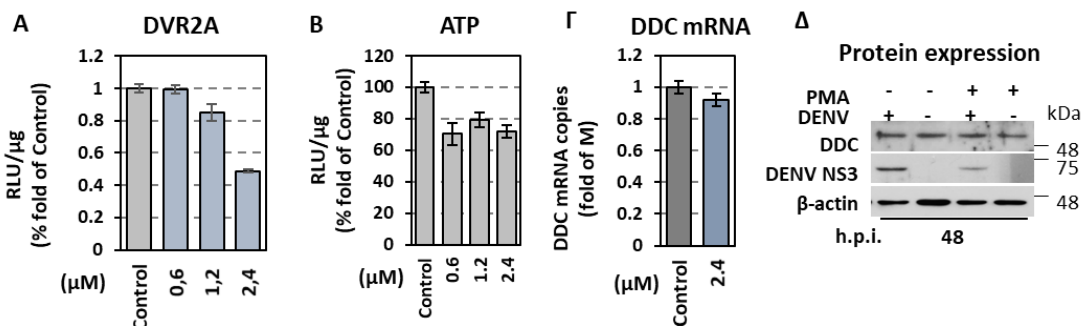


Εικόνα 41: Η reserpine επάγει την έκφραση αντι-οξειδωτικών και αντι-ϊικών γονιδίων. A-B-Γ. Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI = 0,1) για 4 ώρες, επωάστηκαν ή όχι (M), με reserpine στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις για 48 ώρες. Ποσοτικοποιήθηκε το mRNA των (A) Nrf2, (B) HO-1 και (Γ) ISG56 με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. Οι τιμές από τα μη μολυσμένα κύτταρα Mock ορίστηκαν ως 1.

3.1.8. Επαγωγείς του μονοπατιού βιοσύνθεσης των βιογενών αμινών

Στη συνέχεια εξετάστηκαν δύο μόρια, το PMA και η forskoline που ενεργοποιούν τις κινάσες PKC και PKA, αντίστοιχα, ως προς την πιθανή επίδραση τους στην ιϊκή αντιγραφή. Ο λόγος που μελετήθηκαν είναι επειδή αποτελούν γνωστούς επαγωγείς του μονοπατιού. Αρχικά για τον προσδιορισμό των μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων του PMA, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα για 48h και κατόπιν λύσης μετρήθηκαν τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ATP (Εικ. 42 Β). Οι μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση μολυσμένων με DVR2A (MOI=0,1) κυττάρων για 48 ώρες όπου και προσδιορίστηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης όπως προκύπτει από την ιϊκή αντιγραφή. Όπως φαίνεται στην Εικ. 42 Α τα επίπεδα αντιγραφής το DENV μειώνονται παρουσία PMA με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ταυτόχρονα, το PMA φαίνεται να μην επηρεάζει την έκφραση της DDC τόσο σε επίπεδο mRNA (Εικ. 42 Γ) όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικ. 42 Δ). Η ανάλυση Western blot επιβεβαίωσε την

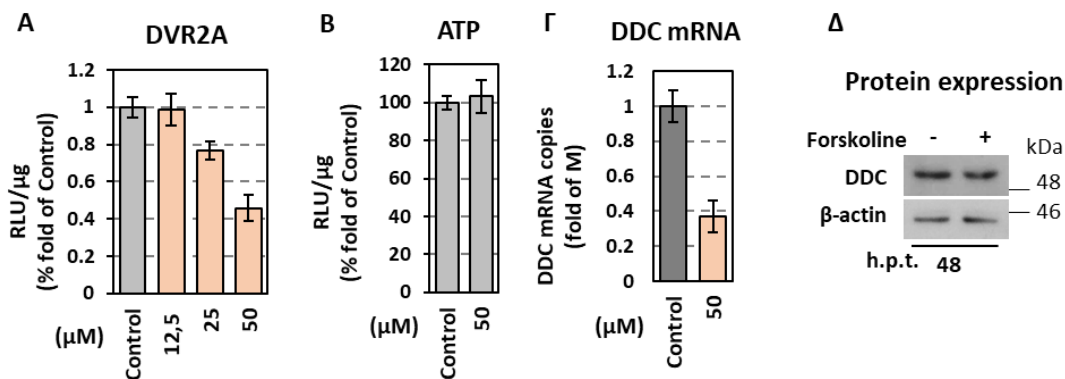
δράση του PMA στην ιϊκή αντιγραφή καθώς φαίνεται σημαντική μείωση της NS3 πρωτεΐνης του DENV (**Εικ. 42 Δ**).



Εικόνα 42: Επίδραση του PMA στην ιϊκή αντιγραφή και την έκφραση της DDC.

A. Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις PMA για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα control ορίστηκαν ως 1. **B.** Κύτταρα Huh7 επώαστηκαν για 48 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις του PMA και μετρήθηκαν τα ενδοκυτάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. **Γ.** Επίδραση του PMA (2.4 μM) στο mRNA της DDC. Το mRNA της DDC ποσοτικοποιήθηκε με RT-qPCR και το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Δ.** Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI = 0,1) για 4 ώρες, επώαστηκαν ή όχι (control), με PMA (2.4μM) για 48h. Έγινε ανάλυση Western blot έναντι των DENV NS3, DDC και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

Ομοίως, εφόσον προσδιορίστηκε η μέγιστη ασφαλής συγκέντρωση της forskoline (**Εικ. 43 B**), κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI=0,1) για 48 ώρες επώαστηκαν με διαδοχικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα και προσδιορίστηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται, και στην περίπτωση της forskoline, τα επίπεδα της ιϊκής αντιγραφής μειώνονται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (**Εικ. 43 A**). Ωστόσο, είναι φανερό πως η forskoline (50μM) επηρεάζει την έκφραση της DDC καθώς παρατηρείται σημαντική μείωση σε επίπεδο mRNA (**Εικ. 43 Γ**) και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (**Εικ. 43 Δ**).

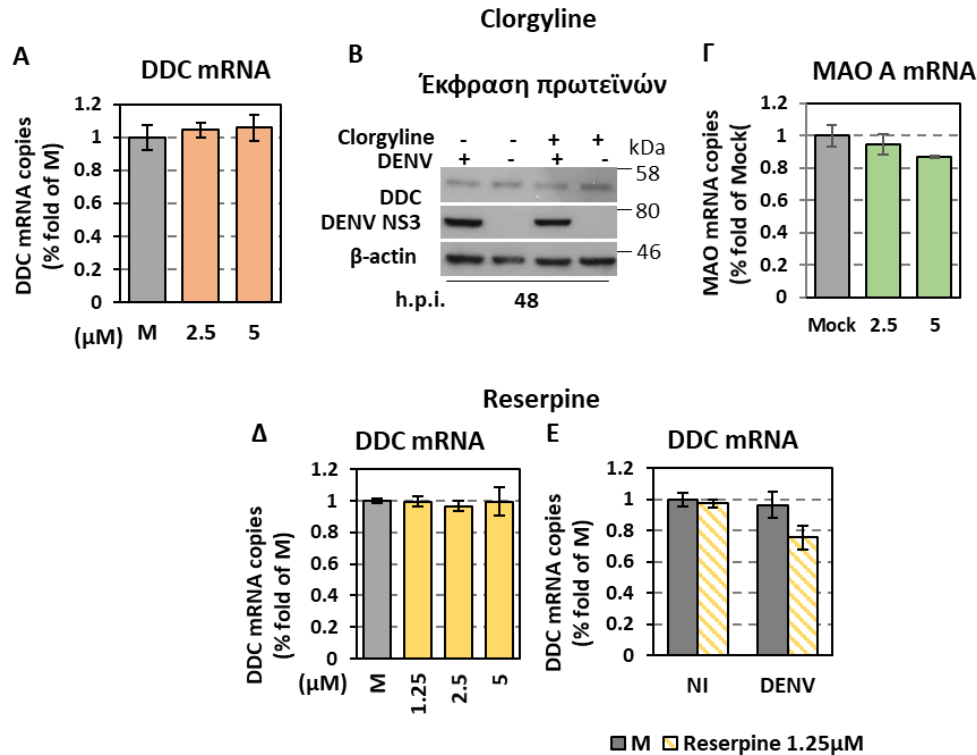


Εικόνα 43: Επίδραση της forskoline στην ιϊκή αντιγραφή και την έκφραση της DDC. **A.** Κύτταρα μολυσμένα με DVR2A (MOI = 0.1) για 4 ώρες, επωάστηκαν ή όχι (control), με διαφορετικές συγκεντρώσεις forskoline για 48h και ποσοτικοποιήθηκε η ενεργότητα R-Luc που εκφράζεται από τον ιό. Τα επίπεδα λουσιφεράσης εκφράζονται ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές από τα κύτταρα control ορίστηκαν ως 1. **B-Δ.** Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 48 ώρες με forskoline (50μM). **B.** Μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Το ATP εκφράστηκε ως RLU/μg ολικής πρωτεΐνης. **Γ.** Το mRNA της DDC ποσοτικοποιήθηκε με RT-qPCR και το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Δ.** Έγινε ανάλυση Western blot έναντι των DDC και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

3.1.9. Επίδραση των αναστολέων στην έκφραση της DDC

Οι αναστολείς που επηρεάζουν την αντιγραφή του DENV ελέχθηκαν ως προς την επίδραση τους στην έκφραση της DDC. Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με διαδοχικές συγκεντρώσεις clorgyline για 48 ώρες και από τα ενδοκυττάρια επίπεδα DDC mRNA και πρωτεΐνης που προσδιορίστηκαν δεν φαίνεται ο αναστολέας των MAO A να επηρεάζει την έκφραση της DDC (**Εικ. 44 A, B**). Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα mRNA επίπεδα των MAO A (**Εικ. 44 Γ**). Κατόπιν μόλυνσης Huh7 κυττάρων με DENV (MOI=0.1) για 4 ώρες και επώασης με clorgyline (5μM) για 48 ώρες, επιβεβαιώνεται σε επίπεδο πρωτεΐνης ότι ο αναστολέας δεν επηρεάζει την ιϊκή αντιγραφή (**Εικ. 44 B**). Με παρόμοιο τρόπο ελέγχθηκε η επίδραση της reserpine στην έκφραση της DDC. Huh7 κύτταρα μη μολυσμένα και μολυσμένα με DENV (MOI=0.1) επωάστηκαν με reserpine για 48 ώρες

και από τα ενδοκυττάρια επίπεδα mRNA της DDC προκύπτει ότι ο αναστολέας των VMAT2 δεν επηρεάζει την έκφραση του ενζύμου παρά μόνο παρουσία μόλυνσης όπου παρατηρείται μείωση έως και 20% (Εικ. 44 Δ, Ε).

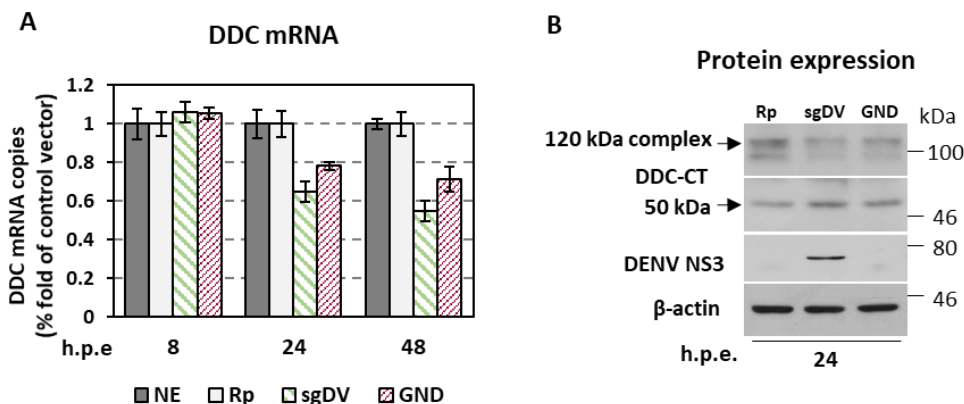


Εικόνα 44: A-Γ Επίδραση της clorgyline στην έκφραση της DDC και των MAO
A. Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με clorgyline στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις για 48 ώρες και ποσοτικοποιήθηκε το mRNA (A) της DDC και (Γ) της MAO A με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **B.** Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI = 0,1) για 4 ώρες, επωάστηκαν ή όχι (M), με clorgyline (5 μM) για 48 ώρες. Έγινε ανάλυση Western blot έναντι των DENV NS3, DDC, και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης. **Δ-Ε Επίδραση της reserpine στην έκφραση της DDC.** **Δ.** Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με reserpine στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις για 48 ώρες και ποσοτικοποιήθηκε το mRNA της DDC με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. **Ε.** Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI = 0,1) για 4 ώρες, επωάστηκαν ή όχι (M), με reserpine (1.25 μM) για 48 ώρες.

Ποσοτικοποιήθηκε το mRNA της DDC με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση.

3.1.10. Επίδραση των δισιστρονικών ρεπλικονίων του DENV στη έκφραση της DDC

Με την αρνητική συσχέτιση μεταξύ DDC και DENV να έχει επιβεβαιωθεί, στόχος ήταν να εξεταστεί εάν αυτή εξαρτάται από την αντιγραφή του ιϊκού RNA. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το δισιστρονικό ρεπλικόνιο αναφοράς sgDVR2A, το οποίο παράχθηκε κατόπιν *in vitro* μεταγραφής. Το sgDVR2A RNA (5μg) εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα Huh7, διαδικασία με την οποία παρακάμπτεται το στάδιο εισόδου του ιού. Ταυτόχρονα, διερευνήθηκε η πιθανότητα η επίδραση στην έκφραση της DDC να οφείλεται στον πολλαπλασιασμό του RNA ή στην επακόλουθη μετάφραση των πρωτεϊνών του DENV. Επομένως, ένα μη αντιγραφόμενο δισιστρονικό ρεπλικόνιο του DENV (sgDVR2A-GND) (5μg) εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα Huh7. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση ένα RNA που εκφράζει *Renilla* λουσιφεράση ή κύτταρα μη επιμολυσμένα. Σε κάθε περίπτωση, η έκφραση της DDC μελετήθηκε σε επίπεδο mRNA 8-48 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση (**Εικ. 45 A**) αλλά και σε επίπεδο πρωτεΐνης (**Εικ. 45 B**). Όπως φαίνεται, το sgDVR2A αλλά και το sgDVR2A-GND επηρεάζουν την έκφραση της DDC με τον ίδιο τρόπο μειώνοντας τα επίπεδα mRNA της DDC και μάλιστα από τα αρχικά στάδια της μόλυνσης (24h p.i.). Σε επίπεδο πρωτεΐνης, φαίνεται να προκαλείται συσσώρευση μίας ισομορφής της DDC που εμφανίζεται στα 50kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το ανενεργό μονομερές του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα μειώνονται τα επίπεδα ενός υδρόφοβου και ανθεκτικού στο SDS συμπλόκου που εμφανίζεται στα 120kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το λειτουργικό διμερές ένζυμο [127].

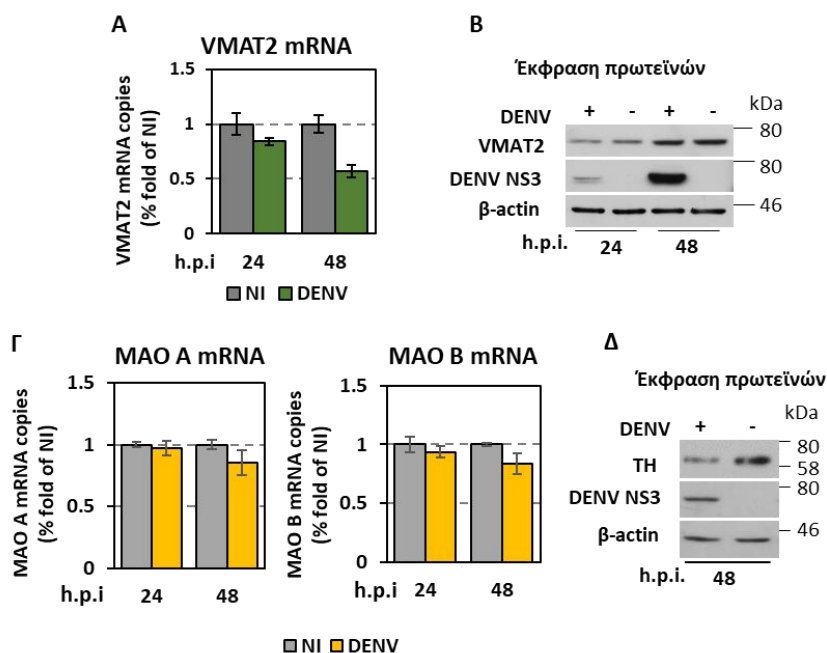


Εικόνα 45: Η επίδραση της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος στην έκφραση της DDC. Κύτταρα *Huh7* υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση (5 µg RNA / 4x10⁶ κύτταρα) με το υπογονιδιωµατικό ρεπλικόνιο *sgDVR2A* (*sgDV*) ή το αντίστοιχο µη αντιγραφόµενο ρεπλικόνιο *sgDVR2A-GND*. Ως κύτταρα ελέγχου χρησιµοποιήθηκαν κύτταρα που υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση (5 µg RNA / 4x10⁶ κύτταρα) µε το πλασµίδιο ελέγχου *Rp* ή κύτταρα *Huh7* που δεν υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση (*Non Electroporated*, *NE*). **A.** Στις αναγραφόµενες ώρες µετά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα λύθηκαν και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του mRNA της *DDC* µε *RT-qPCR*. Η κανονικοποίηση πραγµατοποιήθηκε ως προς το mRNA του *YWHAZ*. **B.** Έγινε ανάλυση *Western blot* έναντι των *DENV NS3*, *DDC-CT* και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιµοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

3.1.11. Επίδραση του DENV στο µεταβολικό μονοπάτι των µονοαµινών

Ολοκληρώνοντας, κρίθηκε σκόπιµο να µελετηθεί η επίδραση του *DENV* στην έκφραση των οξειδασών αλλά και των µεταφορέων των µονοαµινών του µονοπατιού που µελετάται. Για το λόγο αυτό κύτταρα *Huh7* µη µολυσµένα και µολυσµένα µε *DENV* (*MOI=1*) για 4 ώρες, λύθηκαν 24 και 48 ώρες αργότερα. Όπως φαίνεται ο *DENV* επιδρά αρνητικά στην έκφραση των *VMAT2* σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης (**Εικ. 46 A, B**) ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα mRNA των *MAO A* (**Εικ. 46 Γ**). Επιπλέον, µελετήθηκε η έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης, του ενζύµου που βρίσκεται ανοδικά της *DDC* στο µονοπάτι βιοσύνθεσης της ντοπαµίνης και είναι υπεύθυνο για την

μετατροπή της τυροσίνης σε L-Dopa. Όπως φαίνεται, ο DENV μειώνει τουλάχιστον σε επίπεδο πρωτεΐνης την έκφραση της TH (Εικ. 46 Δ).

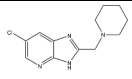
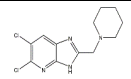
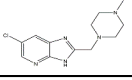
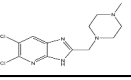
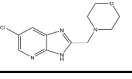
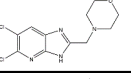
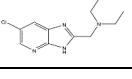
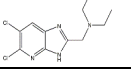
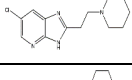
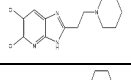
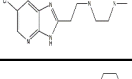
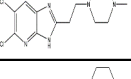
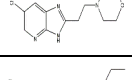
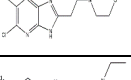
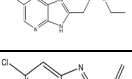
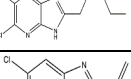
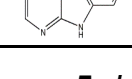
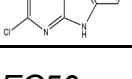


Εικόνα 46: Κύτταρα Huh7 μολυσμένα με DENV (MOI = 1) για 4 ώρες, λύθηκαν 24 και 48 ώρες μετά την μόλυνση. Τα mRNA (A) των VMAT2 και (Γ) των MAO A και B ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Το mRNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. B, Δ. Έγινε ανάλυση Western blot έναντι των DENV NS3, VMAT2, TH και β-ακτίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης.

3.2. Έλεγχος της δράσης νέων φαρμακευτικών αναλόγων έναντι του HBV

Στα πλαίσια εύρεσης καινοτόμων φαρμάκων με αντί-HBV δραστικότητα μελετήθηκε μία σειρά ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών που συντέθηκαν από την ομάδα των Καθηγητών Π. Μαράκος και Ν. Πουλή (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ). Αρχικά, η κυτταροτοξικότητα των καινοτόμων χημικών ενώσεων προσδιορίστηκε στην κυτταρική σειρά HepG2-NTCP (βλ. 2.4), κατόπιν επώασης των κυττάρων με διαδοχικές αραιώσεις κάθε ένωσης (0.1–200 μM) για 7 ημέρες και επακόλουθης

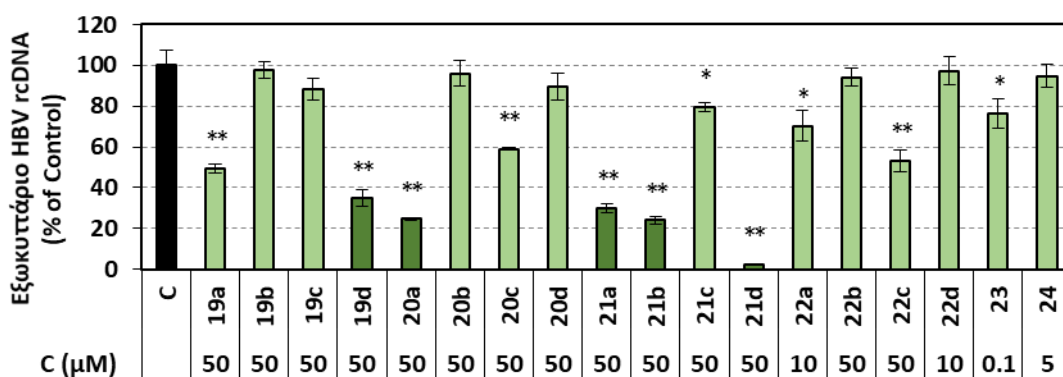
μέτρησης των ενδοκυττάρων επιπέδων ATP. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη DMSO. Έτσι, προσδιορίστηκε η μέση κυτταροτοξική συγκέντρωση (CC_{50}) με μέτρηση των επιπέδων ATP. Η αντι-HBV δραστηριότητα των καινοτόμων χημικών ενώσεων προσδιορίστηκε κατόπιν μόλυνσης της κυτταρικής σειράς HepG2-NTCP με HBV σωματίδια τα οποία παράχθηκαν όπως έχει περιγραφεί (βλ. 2.7.14). Ο αρχικός έλεγχος αντιϊκής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με 50μM συγκέντρωση των ασφαλέστερων ουσιών, ενώ για τις ουσίες που εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα στα 50μM, η μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 4-5 φορές χαμηλότερη από το αντίστοιχο CC_{50} . HepG2-NTCP κύτταρα επωάστηκαν με την εκάστοτε ουσία για 2 ώρες πριν τη μόλυνση, για 24 ώρες μαζί με την μόλυνση και για επιπλέον 6 ημέρες μετά την αφαίρεση του ιού. Κύτταρα που επωάστηκαν με DMSO χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Τα επίπεδα του HBV προσδιορίστηκαν κατόπιν απομόνωσης και ποσοτικοποίησης του HBV rcDNA των ιικών σωματιδίων που απελευθερώθηκαν στο υπερκείμενο όπως έχει περιγραφεί. Αντίστοιχα, για τις ενώσεις έγινε υπολογισμός της μέσης δραστηρικής συγκέντρωσης (EC_{50}) κι έπειτα υπολογίστηκε ο δείκτης επιλεξιμότητας (SI) που είναι ο λόγος CC_{50}/EC_{50} . Οι τιμές EC_{50} , CC_{50} και SI παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

Ανάλογο	χημική δομή	CC ₅₀ (μΜ)	EC50 (μΜ)	SI	Ανάλογο	χημική δομή	CC ₅₀ (μΜ)	EC50 (μΜ)	SI
19a		>200	49.88 ± 0.96	>4,0	21b		>200	25.31 ± 1.45	>7.9
19b		>200	>50	-	21c		>200	>50	-
19c		>200	>50	-	21d		>200	13.53 ± 0.92	>14.8
19d		>200	34.79 ± 4.66	>5,7	22a		50.54 ± 0.30	(>10)*	-
20a		>200	14.08 ± 0.60	>14.2	22b		117.7 ± 15.88	>50	-
20b		>200	>50	-	22c		>200	>50	-
20c		>200	>50	-	22d		>200	>50	-
20d		>200	>50	-	23		0.33 ± 0.01	(>0.1)*	-
21a		0.3322	21.14 ± 1.01	>9.5	24		23.07 ± 4.91	(>5)*	-

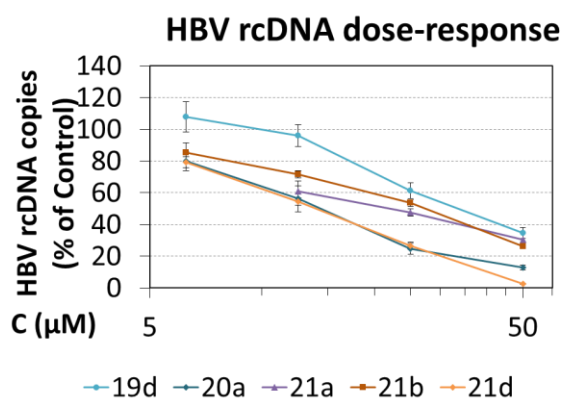
Πίνακας 5: Η χημική δομή και οι τιμές CC₅₀, EC₅₀ και SI των καινοτόμων ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών.

* Σε αυτή την περίπτωση, δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της τιμής EC₅₀ και η αναγραφόμενη τιμή αναφέρεται στη μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί βάση της κυτταροτοξικότητας της.

Η αρχική αξιολόγηση της πιθανής αντί-HBV δράσης των ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών παρουσιάζεται στην **Εικ 47**. Βάση των αρχικών δοκιμών, τα ολεφινικά παράγωγα **23** και **24** είναι άκρως κυτταροτοξικά (**Πίνακας 5**). Επομένως, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε αποκλειστικά στην αξιολόγηση των ενώσεων **19a-d - 22a-d** που φαίνεται να κατέχουν ικανοποιητική αντί-HBV δράση (**Εικ. 47**). Συγκεκριμένα, τα **19a-d** και **21a-d** φαίνεται να είναι δραστηρότερα σε σύγκριση με τα **20a-d** και **22a-d**, εκ των οποίων μόνο το **20a** εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντί-HBV δραστηριότητα (EC₅₀ = 14.08 μΜ, SI>14.2). Για τα πιο δραστηρικά ανάλογα **19d**, **20a**, **21a,b** και **21d**, παρατίθεται μία καμπύλη της δόσοεξαρτώμενης δράσης τους έναντι του HBV (**Εικ. 48**).



Εικόνα 47: Αξιολόγηση της δράσης των ιμιδαζο [4,5-*b*] πυριδινών έναντι στην παραγωγή HBV σωματιδίων. HepG2-NTCP κύτταρα (6×10^4 κύτταρα/πηγάδι) επωάστηκαν για 2 ώρες με τις μεγαλύτερες ασφαλείς συγκεντρώσεις των ιμιδαζο πυριδινών με 2-αλκυλοαμινο-υποκαταστάτες και κατόπιν μολύνθηκαν με HBV (MOI=1000) για 24 ώρες παρουσία των παραγώγων στις ίδιες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τα ανάλογα για 6 ημέρες. Κύτταρα που επωάστηκαν με τον διαλύτη DMSO χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C). Τα υπερκείμενα των κυττάρων συλλέχθηκαν 7 ημέρες μετά την μόλυνση και απομονώθηκε το HBV DNA. Τα επίπεδα του HBV rcDNA προσδιορίστηκαν με qPCR. Το DNA της cyclin A2 χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται κάτω από το όνομα κάθε ένωσης.



Εικόνα 48: Καμπύλη της δόσοεξαρτώμενης αντί-HBV δράσης των αναλόγων 19d, 20a, 21a, 21b και 21d. HepG2-NTCP κύτταρα (6×10^4 κύτταρα/πηγάδι)

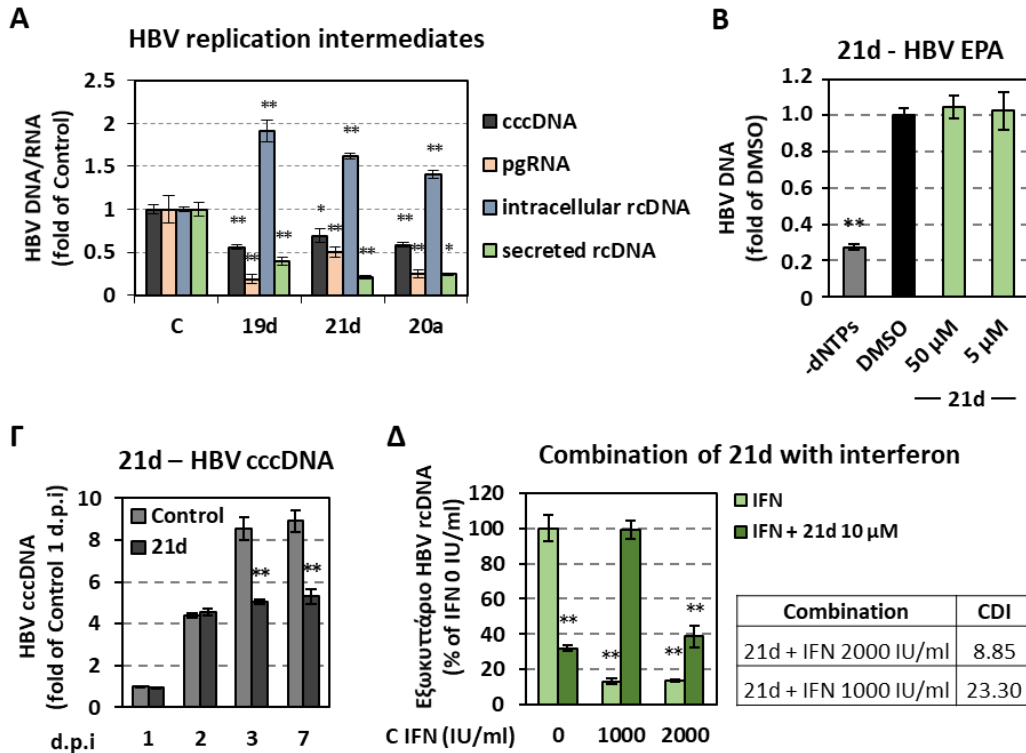
επωάστηκαν για 2 ώρες με διαδοχικές συγκεντρώσεις των αναλόγων και κατόπιν μολύνθηκαν με HBV (MOI=1000) για 24 ώρες παρουσία των αναλόγων στις ίδιες συγκεντρώσεις. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τις ενώσεις για 6 ημέρες. Κύτταρα που επωάστηκαν με τον διαλύτη DMSO χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C). Τα υπερκείμενα των κυττάρων συλλέχθηκαν 7 ημέρες μετά την μόλυνση και απομονώθηκε το HBV DNA. Τα επίπεδα του HBV rcDNA προσδιορίστηκαν με qPCR. Το DNA της *cyclin A2* χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση.

Στη συνέχεια, στόχος ήταν να προσδιοριστεί το ακριβές στάδιο του ιϊκού κύκλου ζωής που επηρεάζεται από τις ιμιδαζοπυριδίνες. Επομένως, οι πιο δραστικές από αυτές και συγκεκριμένα τα ανάλογα **21d**, **19d** και το **20a** επιλέχθηκαν προκειμένου να εξακριβωθεί η πιθανή επίδραση τους στα επίπεδα του HBV cccDNA στον πυρήνα, του pgRNA καθώς και του κυτταροπλασματικού rcDNA ταυτόχρονα με τα επίπεδα του rcDNA στα εκκρινόμενα ιϊκά σωματίδια μέσω RT-qPCR/qPCR (**Εικ. 49 A**). Αναλυτικότερα, HepG2-NTCP κύτταρα επωάστηκαν με 50μM των παραπάνω ενώσεων για 2 ώρες πριν τη μόλυνση. Ακολούθησε μόλυνση (MOI=1000) για 24 ώρες και επώαση των κυττάρων για 6 μέρες παρουσία των αναλόγων. Κύτταρα επωασμένα με DMSO χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Το ολικό RNA απομονώθηκε και το HBV pgRNA προσδιορίστηκε μέσω RT-qPCR. Επιπλέον, απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε με qPCR το cccDNA από τους πυρήνες των κυττάρων καθώς και το rcDNA από το κυτταροπλασματικό κλάσμα, όπως έχει περιγραφεί. Τα επίπεδα του εκκρινόμενου rcDNA στο υπερκείμενο προσδιορίστηκαν με qPCR.

Όπως φαίνεται στην **Εικ. 49 A**, επιπρόσθετα της μείωσης του εκκρινόμενου rcDNA, τα επίπεδα του pgRNA είναι εμφανώς μειωμένα παρουσία των ενώσεων και, μάλιστα, παρατηρήθηκε μείωση έως 30-45% στα επίπεδα του cccDNA. Ακόμα πιο ενδιαφέρον προκαλεί, ωστόσο, η ταυτόχρονη συσσώρευση του rcDNA που εντοπίζεται στο εσωτερικό των κυτταροπλασματικών κυστιδίων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, πιθανώς, ένα μετέπειτα στάδιο της αντιγραφής του HBV DNA, στην ωρίμανση του καψιδίου ή στην έκκριση του ιϊκού σωματιδίου επηρεάζεται από

τους αναστολείς. Για εξακρίβωση της παραπάνω υπόθεσης, πραγματοποιήθηκε ενζυμική δοκιμασία της ενδογενούς πολυμεράσης του HBV (EPA). Όπως φαίνεται στην **Εικ. 49 Β** η *in vitro* σύνθεση του HBV DNA δεν αναστέλλεται από το δραστικότερο ανάλογο **21d** και επομένως είναι φανερό ότι ο αναστολέας δεν στοχεύει άμεσα την ιϊκή πολυμεράση. Επιπρόσθετα, κατόπιν επώασης με το **21d**, τα επίπεδα του cccDNA δεν μειώθηκαν στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (1-2 ημέρες μετά την μόλυνση) αλλά 3 ημέρες αργότερα. (**Εικ. 49 Γ**).

Τέλος, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση των καινοτόμων ιμιδαζο-πυριδινών σε συνδυασμό με άλλες HBV θεραπείες. Για το λόγο αυτό, μολυσμένα με HBV κύτταρα επωάστηκαν με το πιο δραστικό ανάλογο **21d** ή/και πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α2b (Peg-IFN). Από τα επίπεδα του εκκρινόμενου rcDNA και της τιμής του δείκτη CDI (coefficient of drug interaction) που υπολογίστηκε με βάση τον τύπο: $CDI = AB/(A*B)$, όπου A και B η δράση της εκάστοτε ουσίας (Για τιμές μεγαλύτερες του 1, οι ουσίες έχουν ανταγωνιστική δράση, για τιμές περίπου ίσες του 1 έχουν αθροιστική δράση και για τιμές μικρότερες του 1 συνδυαστική δράση) φαίνεται πως το **21d** και η Peg-IFN έχουν άκρως ανταγωνιστική δράση (**Εικ. 49 Δ**).



Εικόνα 49: Α. Επίδραση των ενώσεων 19d, 20a και 21d στα επίπεδα των ενδιάμεσων σταδίων αντιγραφής του HBV. HepG2-NTCP κύτταρα (6×10^4 κύτταρα/ πηγάδι) μολύνθηκαν με HBV ($MOI = 1000$) και ακολούθησε επώαση με τις ενώσεις (50μM) ή DMSO (C) για 7 ημέρες. Τα επίπεδα του pgRNA προσδιορίστηκαν με RT-qPCR και κανονικοποιήθηκαν ως προς επίπεδα του mRNA του YWHAZ. Το πυρηνικό cccDNA, το κυτταροπλασματικό rcDNA εντός των καψιδίων και το εκκρινόμενο rcDNA στα υπερκείμενα ποσοτικοποιήθηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα του mRNA της cyclin A2. Οι τιμές για τα κύτταρα που επώαστηκαν με τις ενώσεις εκφράστηκαν ως προς τις τιμές των κυττάρων-ελέγχου που επώαστηκαν με DMSO. **Β. Το 21d δεν αναστέλλει τη δράση της ενδογενούς HBV DNA πολυμεράσης.** HBV ιικά σωματίδια χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική δοκιμασία της ενδογενούς πολυμεράσης του HBV (EPA) με το 21d στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις. Στην αντίδραση ελέγχου χρησιμοποιήθηκε DMSO 0,01% και μία αντίδραση χωρίς την προσθήκη dNTPs χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης. Κατόπιν της EPA, το HBV DNA απομονώθηκε

και ποσοτικοποιήθηκε με qPCR. Οι τιμές εκφράστηκαν ως προς τις τιμές της αντίδρασης με DMSO. **Γ. Η επίδραση του 21d στον σχηματισμό του cccDNA σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση.** HepG2-NTCP κύτταρα μολύνθηκαν με HBV και ακολούθησε επώαση με το 21d όπως περιεγράφηκε στο Α για 1,2,3 και 7 ημέρες μετά τη μόλυνση (d p.i.). Το πυρηνικό cccDNA ποσοτικοποιήθηκε με qPCR και κανονικοποιήθηκε ως προς την cyclin A2. Οι τιμές εκφράστηκαν ως προς τις τιμές των κυττάρων ελέγχου. **Δ. Η δρατικότητα του συνδυασμού 21d και ιντερφερόνης έναντι του σχηματισμού HBV σωματιδίων.** HepG2-NTCP κύτταρα μολύνθηκαν με HBV και ακολούθησε επώαση, ή όχι, με 1000 ή 2000 IU/ ml ιντερφερόνης παρουσία ή απουσία του 21d (10μM). Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν 7 d. p.i. και το HBV DNA απομονώθηκε. Τα επίπεδα του HBV rcDNA προσδιορίστηκαν με qPCR και κανονικοποιήθηκαν ως προς τα επίπεδα της cyclin A2. Οι τιμές εκφράστηκαν ως προς τις τιμές των κυττάρων ελέγχου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Η ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΩΝ ΒΙΟΓΕΝΩΝ ΑΜΙΝΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΟΥ DENV

4.1.1. Επίδραση του μονοπατιού βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των βιογενών αμινών στην αντιγραφή του ιού DENV

Η αποκαρβοξυλάση της L-Dopa (DDC), το ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση των βιογενών αμινών σχετίζεται αρνητικά με τη μόλυνση από τους ιούς HCV και DENV, όπως φάνηκε από προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ [197]. Εν συνεχεία των πειραμάτων αυτών, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του DENV και της DDC. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της DDC σε ηπατοκύτταρα και ακολούθησε μόλυνση με DENV. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα αυξημένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της DDC επέφεραν έως και 50% μείωση στην αντιγραφή του ιού.

Αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σίγησης της έκφρασης της DDC προκειμένου να προσδιοριστεί η ενδεχόμενη επίδραση στον ιικό κύκλο ζωής. Για το λόγο

αυτό εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση στα κύτταρα ένας φορέας αποσιώπησης της DDC, εν ολίγοις μία αλληλουχία DNA που μεταγράφεται σε ένα δίκλωνο μόριο με δομή θηλειάς (short hairpin, shRNA) έτσι ώστε μέσω του μονοπατιού RNAi σίγησης να επέλθει καταστολή της έκφρασης του ενζύμου. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε κατά τρόπο τέτοιο ώστε να εξασφαλιστεί η αποσιώπηση όσο το δυνατόν περισσότερων ισομορφών της DDC που προκύπτουν από τα εναλλακτικά μετάγραφα. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του shRNA είναι συμπληρωματική με 21bp που εντοπίζονται στο εξώνιο 2, το οποίο υπάρχει σε όλα τα μέχρι τώρα γνωστά εναλλακτικά μετάγραφα της DDC. Ο φορέας ελέγχου περιλαμβάνει μία αλληλουχία που δεν αναγνωρίζει καμία γνωστή ανθρώπινη αλληλουχία γονιδιώματος. Η αποσιώπηση κατόπιν της ηλεκτροδιάτρησης των κυττάρων με τον αντίστοιχο φορέα επιβεβαιώθηκε με τα μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της DDC από τις 24 έως και τις 72 h. p.e. σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Τα επίπεδα αντιγραφής του ιού αυξήθηκαν έως και 2 φορές όπως φαίνεται από την ποσοτικοποίηση του DENV RNA και έως 6 φορές κατόπιν μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας της λουσιφεράσης. Ομοίως, αυξημένα είναι τα επίπεδα της NS3 πρωτεΐνης. Η αύξηση στον ιικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα όπου καταστέλλεται η έκφραση της DDC αποτελεί φαινόμενο που συνάδει με αυτόν που παρατηρήθηκε σε κύτταρα όπου αναστέλλεται η ενζυμική ενεργότητα της DDC μέσω του ειδικού αναστολέα carbidopa [197].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί, ωστόσο, η επίδραση τόσο της σίγησης όσο και της υπερέκφρασης της DDC στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP αλλά και στην μεσολαβούμενη από τον DENV κυτταρική απόπτωση. Η μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα του ATP που παρατηρήθηκαν κατά την υπερέκφραση της DDC συμφωνεί με προηγούμενα αποτελέσματα που προέκυψαν από συνεργασία του εργαστηρίου με το εργαστήριο Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών του ΕΚΠΑ από τα οποία κατέστη πιθανό η DDC να μειορρυθμίζει τον ενεργειακό μεταβολισμό και την επιβίωση του κυττάρου [157]. Ταυτόχρονα, σε μολυσμένα κύτταρα που υπερεκφράζεται η DDC η απόπτωση λόγω του ιού φαίνεται να είναι εμφανώς πιο εκτενής σε αντίθεση με τα μολυσμένα κύτταρα ελέγχου. Σημειώνεται ότι στις 72h. p.i, το σύστημα φαίνεται να

βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ της απόπτωσης από την υπερέκφραση της DDC και της μόλυνσης με DENV καθώς δεν παρατηρείται περεταίρω μείωση στα ATP επίπεδα. Αντίστοιχα, κατόπιν σίγησης της DDC μετρήθηκαν αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Παράλληλα, παρά την αύξηση της ιϊκής αντιγραφής, η απόπτωση λόγω του ιού φαίνεται να αναστρέφεται σε μολυσμένα κύτταρα που υποεκφράζεται η DDC καθώς τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ATP παραμένουν αυξημένα ακόμα και στις 72h. p.i. σε αντίθεση με τα μολυσμένα κύτταρα ελέγχου στα οποία η απόπτωση είναι εμφανής από τις 48h. p.i.. Εντούτοις, περεταίρω πειράματα με ταυτόχρονη μελέτη της πιθανής επίδρασης στο μονοπάτι PI3K/AKT με καταστολή της έκφρασης της DDC είναι απαραίτητα για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ιϊκή μόλυνσης με το μονοπάτι βιοσύνθεσης των βιογενών αμινών, αρχικά ελέγχθηκε η επίδραση της εξωγενούς χορήγησης δύο εκ των υποστρωμάτων της DDC, της L-Dopa και της 5-υδροξυτρυπτοφάνης (5-HTP). Για πρώτη φορά, φαίνεται ότι η επώαση μολυσμένων κυττάρων με μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων μειώνουν τουλάχιστον σε επίπεδο αντιγραφής, τον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση υποστρωμάτων προκαλεί αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της DDC πιθανώς για να είναι εφικτή η μετατροπή της περίσσειας των υποστρωμάτων στα αντίστοιχα προϊόντα. Η αύξηση αυτή φαίνεται να αναστρέφεται παρουσία του ιού.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ωστόσο, προκαλεί το γεγονός ότι κατόπιν επώασης των κυττάρων με τα υποστρώματα της DDC, η μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα αντιγραφής του ιού η οποία φτάνει στο 90% για την L-Dopa και στο 80% για το 5-HTP στα μολυσμένα κύτταρα ελέγχου, αναστρέφεται στα κύτταρα που υποεκφράζεται η DDC με την μεταβολή να είναι στο 46% και 33%, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως το μόριο της DDC είναι απαραίτητο για την μείωση των επιπέδων αντιγραφής του ιού και ο φαινότυπος αυτός δεν οφείλεται αποκλειστικά στην εξωγενή χορήγηση των υποστρωμάτων. Σημειώνεται δε, ότι η αναστροφή της μείωσης δεν φτάνει το 100% καθώς η καταστολή της έκφρασης της DDC με τον φορέα αποσιώπησης που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν πλήρης, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε για πρώτη φορά η αλληλεπίδραση της μόλυνσης με DENV με το εκατέρωθεν της βιοσύνθεσης μονοπάτι των βιογενών αμινών. Όπως είναι γνωστό, οι βιογενείς αμίνες οξειδώνονται όταν βρίσκονται ελεύθερες στο κυτταρόπλασμα από τις οξειδάσες των μονοαμινών A και B με αποτέλεσμα την αναπόφευκτη παραγωγή οξειδωμένων παραπροϊόντων [247]. Κατόπιν επώασης μολυσμένων κυττάρων με μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των αναστολέων clorgyline και phenelzine δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα αντιγραφής του ιού. Δεν ισχύει το ίδιο ωστόσο όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με τον ειδικό αναστολέα των MAO A, την clorgyline, με ταυτόχρονη εξωγενή χορήγηση των υποστρωμάτων της DDC σε συγκεντρώσεις που δεν επηρεάζουν τον ιικό πολλαπλασιασμό. Μάλιστα, στην περίπτωση αυτή τα επίπεδα αντιγραφής του DENV μειώθηκαν σημαντικά, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αναστολή της οξείδωσης των βιογενών αμινών που βρίσκονται ενδογενώς σε φυσιολογικές για το κύτταρο συγκεντρώσεις δεν είναι ικανή συνθήκη για την επίδραση στον ιό. Αντίθετα, με την εξωγενή χορήγηση L-Dopa και 5-HTP και την επακόλουθη αναστολή της ενζυματικής οξείδωσης των προϊόντων, ντοπαμίνη και σεροτονίνη, φαίνεται να δημιουργείται μία συνθήκη που δεν ευνοεί τον ιικό πολλαπλασιασμό.

Οι βιογενείς αμίνες προστατεύονται από την οξείδωση, ενζυματική και μη, κατά την αποθήκευση τους σε εκκριτικά κυστίδια, στο όξινο περιβάλλον των οποίων εισέρχονται μέσω της λειτουργίας των κυστιδιακών μεταφορέων μονοαμινών 1 και 2 (VMAT1,2). Για πρώτη φορά επιβεβαιώνεται η έκφραση των VMAT2 στην ηπατική καρκινική σειρά Huh7 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης ενώ οι VMAT1 δεν εκφράζονται ή πιθανώς εκφράζονται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Αναφορικά με το ήπαρ, από πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε ανθρώπινους ιστούς, έχει αποδειχθεί πως υπάρχει ένας μικρός αριθμός κυττάρων που εκφράζουν VMAT2 στα πυλαία κανάλια και στους ημιτονοειδείς αυλούς του ήπατος ενώ Real time RT-PCR ανάλυση επιβεβαίωσε την παρουσία mRNA των VMAT2 στους εν λόγω ιστούς [266].

Για περαιτέρω διερεύνηση, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός, μη αντιστρεπτός αναστολέας της αποθήκευσης βιογενών αμινών στα κυστίδια, η reserpine. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η επώαση κυττάρων με reserpine 4 ώρες μετά τη

μόλυνση με DENV, επηρεάζει θετικά τον ιϊκό πολλαπλασιασμό καθώς παρατηρείται αύξηση τουλάχιστον στα επίπεδα αντιγραφής όπως φαίνεται από τη μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης αλλά και από τη ποσοτικοποίηση του DENV RNA και της NS3 πρωτεΐνης του DENV. Παρόλα αυτά, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στη μολυσματικότητα του ιού. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί, ωστόσο, το γεγονός ότι όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση της reserpine τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση στα επίπεδα ιϊκής αντιγραφής με τη μέγιστη αύξηση να παρατηρείται στη συγκέντρωση 1,25μM. Αντίστοιχα η θετική επίδραση της reserpine στην αντιγραφή του ιού εξαρτάται από το MOI καθώς όσο αυξάνεται το ιϊκό φορτίο κατά την μόλυνση, η αναστολή της δράσης των VMAT2 δεν φαίνεται να επιδρά στην ικανότητα αντιγραφής του ιού. Ο αναστολέας των VMATs δεν φαίνεται να έχει επίδραση στο mRNA αλλά και στην πρωτεΐνη των VMAT2 όπως και η παρουσία του ιού όταν η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με χαμηλό MOI (MOI=0,1). Αντίθετα, διαφορά στην έκφραση των VMAT2 παρατηρήθηκε μόνο σε μολυσμένα κύτταρα που επώαστηκαν με reserpine 1,25μM με την μείωση στην έκφραση να αποδίδεται στα αυξημένα επίπεδα αντιγραφής του DENV επιβεβαιώνοντας, έτσι, την αρνητική σχέση μεταξύ της ιϊκής μόλυνσης και των VMAT2. Αντίθετα, σε κύτταρα όπου έχει πραγματοποιηθεί σίγηση της DDC με τον φορέα αποσιώπησης και ακολούθησε επώαση με reserpine δεν σημειώθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα αντιγραφής του ιού. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως η δράση της reserpine είναι ειδική για το υπό μελέτη μονοπάτι και πως το μόριο της DDC είναι για ακόμα μία φορά απαραίτητο για να επιφέρει την αύξηση των επιπέδων αντιγραφής του ιού παρουσία reserpine.

Στη συνέχεια και εφόσον στην περίπτωση της clorgyline παρατηρήθηκε διαφορά στην αντιγραφή του ιού μόνο κατόπιν εξωγενούς χορήγησης των υποστρωμάτων, στόχος ήταν να παρατηρηθεί η πιθανώς διαφορική επίδραση και στην περίπτωση της reserpine. Ωστόσο, όταν τα υποστρώματα προστέθηκαν σε περίσσεια με ταυτόχρονη αναστολή της αποθήκευσης των εκατέρωθεν προϊόντων παρατηρήθηκε μείωση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ιδιαίτερα χαμηλές. Ο φαινότυπος αυτός αποτελεί ένδειξη της φυσιολογικής λειτουργίας των VMAT2 στα ηπατικά κύτταρα εφόσον η περίσσεια των βιογενών αμινών στο κυτταρόπλασμα που δεν αποθηκεύεται, οξειδώνεται, ενζυμικά ή μη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό

ελευθέρων ριζών δημιουργώντας έτσι μία τοξική για το κύτταρο συνθήκη [247]. Ωστόσο, μειωμένα ήταν αντίστοιχα και τα επίπεδα αντιγραφής του ιού όπως φάνηκε από την ενεργότητα λουσιφεράσης σε αυτές τις συνθήκες. Η μείωση ενδεχομένως να οφείλεται εν μέρει στην μειωμένη κυτταρική βιωσιμότητα όπως φαίνεται από τα ATP επίπεδα. Εναλλακτικά, μπορεί να αποτελεί μία πρώτη ένδειξη πως η αρνητική επίδραση των υποστρωμάτων στον ιικό πολλαπλασιασμό οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα των διαθέσιμων αμινών στο κυτταρόπλασμα και στην επικείμενη οξειδωση τους και όχι στην εξωκυττάρωση τους και στη οποιαδήποτε σηματοδοτική πορεία που θα ακολουθούσε εκτός κυττάρου. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εξωγενούς χορήγησης ντοπαμίνης και σεροτονίνης 4 ώρες μετά την μόλυνση, παρακάμπτοντας έτσι την οποιαδήποτε επίδραση θα είχαν λόγω σηματοδότησης στην είσοδο του ιού [438]. Όπως φάνηκε, τόσο η ντοπαμίνη όσο και η σεροτονίνη δεν επιδρούν στην ιική μόλυνση τουλάχιστον σε επίπεδο αντιγραφής. Συνδυαστικά, τα παραπάνω αποτελέσματα συνιστούν πως η εξωκυττάρια σηματοδοτική πορεία των βιογενών αμινών ή η έλλειψη αυτής πιθανώς δεν επηρεάζουν τον ιικό πολλαπλασιασμό. Αντιθέτως, οι μεταβολές των ενδοκυτταρικών επιπέδων ντοπαμίνης και σεροτονίνης έχουν σημαντικότερο ρόλο στην ρύθμιση της ιικής αντιγραφής. Πρόσφατες μελέτες σε εγκεφάλους ποντικών αποκαλύπτουν νέους ρόλους αυτών των μορίων πέρα από την μεταγωγή σήματος. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η σεροτονίνη συνδέεται ομοιοπολικά με πρωτεΐνες ιστονών ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση ως τροποποιητής ιστονών, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται σεροτονυλίωση [439, 440]. Με τον ίδιο τρόπο, η ντοπαμίνη μέσω της διαδικασίας της ντοπαμινυλίωσης, τροποποιεί τις ιστόνες και κατ' επέκταση την γονιδιακή έκφραση [441]. Υπό το πρίσμα των νέων αυτών δεδομένων, δεν αποκλείεται η επίδραση της ντοπαμίνης και σεροτονίνης στην ιική αντιγραφή πιθανώς να περιλαμβάνει αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που με κάποιον τρόπο εμπλέκονται στον ιικό κύκλο ζωής, και σίγουρα αξίζει να μελετηθούν.

Εντούτοις, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης επικεντρωθήκαμε στην ενδοκυττάρια μεταβολική μοίρα των αμινών, η οποία περιλαμβάνει την οξειδωση τους, ενζυματική ή μη, σε περίπτωση αναστολής της αποθήκευσης του στα εκκριτικά

κυστίδια. Μία από τις σημαντικότερες παρενέργειες που προκαλεί η reserpine στο ίδιο το κύτταρο είναι το οξειδωτικό στρες. Η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω της υπέρμετρης συγκέντρωσης ROS που προέρχονται από τις οξειδωμένες στο κυτταρόπλασμα βιογενείς αμίνες που δεν αποθηκεύονται έχει περιγραφεί, μεταξύ άλλων, σε ηπατοκύτταρα [302]. Παρόλα αυτά πραγματοποιήθηκαν πειράματα προκειμένου να επιβεβαιωθεί πως η θετική επίδραση της reserpine στην αντιγραφή του DENV εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ROS λόγω των οξειδωμένων αμινών. Αρχικά, σε κύτταρα που επωάστηκαν με reserpine και clorgyline για την ταυτόχρονη αναστολή της αποθήκευσης και της οξείδωσης των ενδογενών αμινών παρατηρήθηκε αναστροφή της θετικής επίδρασης της reserpine στα επίπεδα αντιγραφής του DENV. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με reserpine και ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά μόρια. Όπως ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα, η αναστολή της δράσης των ROS μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της ιϊκής αντιγραφής παρουσία reserpine. Η αρνητική επίδραση της GSH στον πολλαπλασιασμό του DENV [442], που επιβεβαιώνεται στην παρούσα εργασία, συνιστά ότι οποιαδήποτε δράση της reserpine εξαρτάται από το οξειδωτικό στρες. Ως επιβεβαίωση, σε μολυσμένα και μη κύτταρα που επωάστηκαν με reserpine, ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA των MAO A και B. Η μείωση στην έκφραση των οξειδασών που παρατηρήθηκε πιθανώς αποτελεί ένα μηχανισμό ανάδρασης και αντικατοπτρίζει την ενδεχόμενη αύξηση στην ενζυμική ενεργότητα τους επιβεβαιώνοντας την συσχέτιση μεταξύ αποθήκευσης και οξείδωσης των αμινών στο υπό μελέτη σύστημα.

Παρόλη τη θετική επίδραση που έχει η reserpine στον ιϊκό κύκλο ζωής, αναπάντητο μένει το ερώτημα γιατί στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις όπου η αναστολή της αποθήκευσης των αμινών είναι θεωρητικά εκτενέστερη, η αύξηση στα επίπεδα του ιού φαίνεται να περιορίζεται. Προκειμένου να απαντηθεί το εύλογο αυτό ερώτημα και εφόσον αποδείχτηκε ότι η δράση της reserpine εξαρτάται από το οξειδωτικό στρες, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου που ενεργοποιούνται ως απόκριση στην επίδραση της reserpine σχετικά με την εμπλοκή τους στον κύκλο ζωής του DENV.

Αναλυτικότερα, μελετήθηκε ο πυρηνικός παράγοντας Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2p45-related factor 2, Nrf2) , ένα ευαίσθητο στην οξειδοαναγωγική ανισορροπία μόριο το οποίο ενεργοποιείται και επάγει μεταγραφικά μία σειρά κυτταροπροστατευτικών γονιδίων υπεύθυνων για την αποτοξίνωση του κυτάρου που φέρουν το στοιχείο απόκρισης ηλεκτρόφιλων ή στοιχείο απόκρισης αντιοξειδωτικών (electrophile response element ή antioxidant response element , ErRE ή ARE) [316]. Η έκφραση του Nrf2 επηρεάζεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο από τη reserpine καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που χρησιμοποιείται τόσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα mRNA του Nrf2. Με παρόμοιο τρόπο επηρεάζονται τα επίπεδα mRNA της οξυγενάσης της αίμης (HO1), ενός από τα αντιοξειδωτικά γονίδια των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται από τον Nrf2 [323, 324]. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [302] όσον αφορά τα μη μολυσμένα κύτταρα. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των μολυσμένων με DENV κυττάρων, αν και δεν σημειώνεται διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του Nrf2, η αύξηση έως και 2 φορές στα επίπεδα mRNA της HO-1 μαρτυρά την ενεργοποίηση του Nrf2 παρουσία της μόλυνσης όπως έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως σε δενδριτικά κύτταρα που έχουν προέλθει από ανθρώπινα πρωτογενή μονοκύτταρα [352] αλλά και σε μονοπύρηννα φαγοκύτταρα [344]. Στην περίπτωση των ηπατοκυττάρων της μελέτης, η επίδραση της reserpine στην έκφραση των δύο αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών γονιδίων παρουσία του DENV επηρεάζεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά με χαμηλότερο ρυθμό όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της reserpine. Ο χαμηλότερος ρυθμός επαγωγής των γονιδίων ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός ότι το Nrf2 μονοπάτι επάγεται πριν την εγκαθίδρυση της ιικής αντιγραφής συμβάλλοντας έτσι στην κυτταρική επιβίωση στα αρχικά στάδια της μόλυνσης αλλά καταστέλλεται 24 ώρες μετά με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της αντιφλεγμονώδους, αποπτωτικής κυτταρικής απάντησης σύμφωνα με ανάλυση ολικού μεταγραφώματος δενδριτικών κυττάρων κατόπιν μόλυνσης με DENV2 [352].

Συγχρόνως, η μόλυνση με DENV προκαλεί ενδοκυττάρια συσσώρευση ROS και μέσω του Nrf2 μονοπατιού ο ιός διατηρεί το οξειδωτικό στρες σε ένα ιδανικό επίπεδο,

το οποίο πρέπει να είναι αρκετά υψηλό έτσι ώστε να υποστηρίζεται ο ιϊκός μεταβολισμός αλλά όχι τόσο υψηλό ώστε να προκαλέσει πρόωρη απόπτωση του κυττάρου ξενιστή [352]. Ταυτόχρονα, το επαγόμενο από τον ιό οξειδωτικό στρες αποδεικνύεται απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της φυσικής ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού [352]. Η επαγωγή της HO-1 μέσω της ενεργοποίησης του Nrf2 ή με παράγοντες όπως η πρωτοπορφυρίνη κοβαλτίου (cobalt protoporphyrin, CoPP), το ανδρογραφολίδιο (andrographolide) και η lucidone, καταστέλλει την αντιγραφή του DENV και καθυστερεί την επαγόμενη από τον DENV απόπτωση σε μοντέλα ποντικών μέσω ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μορίων και καταστολής της NS2B/NS3 πρωτεάσης με παράλληλη επαγωγή της μεσολαβούμενης από την IFN αντιϊκής απάντησης [353, 354]. Όπως αποδεικνύεται για πρώτη φορά, στην ίδια κατηγορία ανήκει η reserpine. Χορήγηση του ειδικού, μη αντιστρεπτού αναστολέα των VMATs επάγει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την έκφραση του Nrf2 παράγοντα και του αντιοξειδωτικού γονιδίου HO-1 και παράλληλα του επαγόμενου από την ιντερφερόνη γονιδιακού προϊόντος 56 (Interferon Stimulated Gene 56, ISG56), ενός από τα 400 ISGs που επάγονται για την εγκαθίδρυση της αντιϊκής απάντησης [443]. Η έκφραση του ISG56 δεν επηρεάζεται από την παρουσία μόλυνσης όπως φαίνεται από το σταθερό ρυθμό μεταβολής DV/NI σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις reserpine.

Συνολικά, λόγω της αρνητικής συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ της μόλυνσης με DENV και του βιοσυνθετικού μονοπατιού βιογενών αμινών από τη DDC [197] αλλά και της εκατέρωθεν μεταβολικής πορείας τους, είναι εύλογο η reserpine, η οποία είναι υπεύθυνη για την αναστολή της αποθήκευσης των αμινών στα εκκριτικά κυστίδια, να έχει θετική επίδραση στον ιϊκό πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, το επαγόμενο από τη reserpine οξειδωτικό στρες, λόγω της οξείδωσης των ελευθέρων αμινών στο κυτταρόπλασμα φαίνεται να είναι η αιτία ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου μέσω του Nrf2 μονοπατιού. Τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες είναι καθοριστικά για τον έλεγχο τόσο του ιϊκού μεταβολισμού όσο και της αντιϊκής, αποπτωτικής απάντησης του κυττάρου τονίζοντας, έτσι, την σημασία της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στην έκβαση της μόλυνσης με DENV. Επομένως, η φυσική ανοσολογική απάντηση είναι ενδεχομένως

η αιτία που αναστέλλεται η εξαρτώμενη από το οξειδωτικό στρες, θετική επίδραση της reserpine στην ιϊκή αντιγραφή.

4.1.2. Επαγωγείς του μονοπατιού βιοσύνθεσης και μεταβολισμού των βιογενών αμινών

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση στην αντιγραφή του DENV δύο μορίων που είναι γνωστοί επαγωγείς του μονοπατιού. Οι επαγωγείς που χρησιμοποιήθηκαν, το PMA και η forskoline ενεργοποιούν τις κινάσες PKC και PKA, αντίστοιχα, οι οποίες στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την DDC [179, 182]. Ο VMAT2 φωσφορυλιώνεται στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο και το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι απαραίτητο για την πρόσληψη των μονοαμινών και πιθανώς για την έξοδο αυτών από το κυστίδιο κατόπιν διέγερσης [282, 283]. Οι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση του αμινοτελικού άκρου κινάσες δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί αν και βάση της δομής των VMAT2, οι πιο πιθανές υποψήφιες κινάσες φαίνεται να είναι η PKA και η PKC ενώ η φωσφορυλίωση από την PKA φαίνεται πως είναι απαραίτητη για την μετακίνηση των VMAT2 στα κατάλληλα εκκριτικά κυστίδια [444]. Επιπλέον, η PKC φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την γονιδιακή έκφραση των MAO B [445]. Όπως φάνηκε, οι επαγωγείς μειώνουν τα επίπεδα αντιγραφής του ιού με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι εκ των δύο επαγωγέων μόνο η forskoline επηρέασε την έκφραση της DDC μειώνοντας την τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η μείωση αυτή ίσως αποτελεί μηχανισμό ανάδρασης λόγω της αύξησης της ενζυμικής ενεργότητας της DDC. Όσον αφορά το PMA, μία ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα διέψευσε την επίδραση του στην ενζυμική ενεργότητα της DDC [446] και πιθανώς η έλλειψη επίδρασης της είναι η αιτία που δεν φαίνεται να επηρεάζεται η έκφραση της. Σχετικά με τη μείωση στα επίπεδα αντιγραφής του DENV, δεν αποκλείεται να πρόκειται για ένα γεγονός ανεξάρτητο της DDC καθώς είναι γνωστό ότι η PKC φωσφορυλιώνει και καταστέλλει την NS5 του DENV με αποτέλεσμα η επαγωγή της PKC με PMA να μειώνει τον ιϊκό πολλαπλασιασμό [447]. Παρόλα αυτά, σχετικά με την ενζυμική ενεργότητα, τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενα πειράματα όπου η επώαση των μολυσμένων κυττάρων με τον ειδικό

αναστολέα της DDC, την carbidopa, επέφερε αύξηση στα επίπεδα αντιγραφής και μολυσματικότητας του ιού.

4.1.3. Επίδραση των αναστολέων στην έκφραση της DDC

Μέχρι πρότινος, τα αποτελέσματα του εργαστηρίου υποστήριζαν την αλληλεπίδραση της μόλυνσης με DENV με το μονοπάτι βιοσύνθεσης των βιογενών αμινών καθορίζοντας την αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ιϊκής αντιγραφής και της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προσθέτουν την εκατέρωθεν ενδοκυττάρια μοίρα των αμινών, την οξειδωση και την αποθήκευσή τους σε κυστίδια, στη πολύπλοκη σχέση του υπό μελέτη συστήματος. Εντούτοις, είναι χρήσιμο να προσδιοριστεί η επίδραση των αναστολέων των MAO και VMAT στην έκφραση της DDC προκειμένου να εξακριβωθεί εάν ενεργοποιείται οποιοσδήποτε μηχανισμός αναδρασης που επηρεάζει τον ιϊκό πολλαπλασιασμό.

Η αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας των MAO A με τον αντιστρεπτό αναστολέα clorgyline δεν επηρέασε την έκφραση της DDC όπως άλλωστε έχει αποδειχθεί στο παρελθόν σε κύτταρα PC12 [258]. Επιπλέον, η clorgyline δεν επηρεάζει την έκφραση των MAO A σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα προστάτη [448] και το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται σε καλλιέργεια ηπατικών κυττάρων. Αντίστοιχα, ο αναστολέας των VMATs δεν φαίνεται να έχει επίδραση στην έκφραση της DDC. Εντούτοις, σημειώνεται ότι έχει παρατηρηθεί αύξηση στο mRNA του ενζύμου κατόπιν επώασης εγκεφάλων αρουραίων με reserpine [449]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, διαφορά στο mRNA της DDC παρατηρήθηκε μόνο σε μολυσμένα κύτταρα που επώαστηκαν με reserpine 1,25μM με την αναμενόμενη μείωση στην έκφραση να αποδίδεται στα αυξημένα επίπεδα αντιγραφής του DENV. Επομένως, η δράση της clorgyline και της reserpine στην αντιγραφή του DENV φαίνεται να είναι ειδική για το μονοπάτι.

4.1.4. Επίδραση του DENV στην έκφραση των DDC, MAO, VMAT2 και TH

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου φάνηκε πως η μόλυνση με DENV επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της DDC [197]. Εν συνεχεία των πειραμάτων αυτών, στόχος ήταν η εξακρίβωση του ακριβούς σταδίου του ιϊκού

κύκλου ζωής που επηρεάζει την έκφραση του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση των ηπατοκυττάρων με το δισιστρονικό ρετλικόνιο αναφοράς sgDVR2A παρακάμπτοντας έτσι το στάδιο της εισόδου αλλά και της εξόδου εφόσον δεν σχηματίζονται ιϊκά σωματίδια. Εξαρχής, είναι φανερό πως η παρουσία του δισιστρονικού ιϊκού RNA που αντιγράφεται και μεταφράζεται στις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού προκαλεί μείωση στα επίπεδα mRNA της DDC και μάλιστα από τα αρχικά στάδια της μόλυνσης (24h p.i.). Ο φαινότυπος παραμένει ίδιος σε σχέση με την μόλυνση με πλήρη ιϊκά σωματίδια του DENV και σε επίπεδο πρωτεΐνης. Αναλυτικότερα, φαίνεται να προκαλεί συσσώρευση μίας ανοσοενοτοπιζόμενης μορφής της DDC που εμφανίζεται στα 50kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το ανενεργό μονομερές του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα μειώνει τα επίπεδα ενός υδρόφοβου και ανθεκτικού στο SDS συμπλόκου που εμφανίζεται στα 120kDa και πιθανώς αντιπροσωπεύει το λειτουργικό διμερές ένζυμο [127]. Ωστόσο, η επίδραση της μόλυνσης στην έκφραση της DDC δεν φαίνεται να εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA ή την εκατέρωθεν μετάφραση των ιϊκών πρωτεϊνών καθώς σε κύτταρα που εισήχθη το μη αντιγραφόμενο δισιστρονικό ρετλικόνιο του DENV (sgDVR2A-GND) που φέρει μία μετάλλαξη στο ενεργό κέντρο της ιϊκής πολυμεράσης, τα επίπεδα έκφρασης της DDC επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο αν και σε μικρότερο βαθμό. Επομένως, η μείωση στην έκφραση της DDC πιθανώς είναι απόρροια κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού που ενεργοποιείται αμέσως μετά την είσοδο του DENV στο κύτταρο και στα αρχικά στάδια της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος. Άλλωστε, είναι γνωστό ότι η DDC κατέχει καθοριστικό ρόλο σε κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη κυτταρική βιωσιμότητα και απόπτωση [157], τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζονται από την ιϊκή μόλυνση.

Σχετικά με τα εκατέρωθεν στάδια του μονοπατιού, οι δύο ισομορφές MAO A και B, η ιστοειδική έκφραση των οποίων αντικατοπτρίζει μία λειτουργική ανάγκη, φαίνεται να εκφράζονται εξίσου στα ηπατοκύτταρα και μάλιστα η έκφραση τους δεν επηρεάζεται από την μόλυνση με DENV. Αντίθετα, η έκφραση των VMAT2 στα ηπατοκύτταρα φαίνεται να ρυθμίζεται αρνητικά από την ιϊκή μόλυνση. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα του ολικού mRNA των VMAT2 (RTqPCR) αλλά

και της πρωτεΐνης κατά τη μόλυνση με DENV σε κύτταρα Huh7 με την μείωση να είναι εμφανής από τις 24 ώρες μετά την μόλυνση και να φτάνει έως και το 50% στις 48 ώρες μετά την μόλυνση. Σημειώνεται πως το πρότυπο της επίδρασης της ιϊκής μόλυνσης στην έκφραση των VMAT2 παρομοιάζει με το πρότυπο έκφρασης της DDC κατόπιν μόλυνσης με DENV όπου η αρνητική συσχέτιση ήταν εμφανής από τα αρχικά στάδια της μόλυνσης [197]. Επιπλέον, μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα πρωτεΐνης της υδροξυλάσης της τυροσίνης (TH) παρουσία μόλυνσης. Η ομοιότητα αυτή στα πρότυπα έκφρασης δεν αποκλείεται να οφείλεται στο σύμπλοκο που πιθανώς δημιουργείται μεταξύ VMAT2, TH και DDC όπως έχει φανεί σε συναπτικά κυστίδια που έχουν απομονωθεί από ντοπαμινεργικές περιοχές εγκεφάλου αρουραίου [290]. Τα σύμπλοκα αυτά υποδεικνύουν ότι η αποθήκευση των βιογενών αμινών έπεται άμεσα της σύνθεσης τους εφόσον η παραμονή τους στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην δημιουργία ελευθέρων ριζών που είναι τοξικές για το κύτταρο. Επομένως, η σύνθεση των βιογενών αμινών από τις TH και DDC και στη συνέχεια η αποθήκευσή τους από τους VMAT2 είναι διαδικασίες αλληλένδετες οι οποίες φαίνεται να συνεντοπίζονται χωρικά και χρονικά και επηρεάζονται ως προς την έκφραση και πιθανώς την λειτουργία τους με παρόμοιο τρόπο από την μόλυνση με DENV.

4.2. ANTI-HBV ΔΡΑΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα βρίσκονται στην πρώτη γραμμή έρευνας στην αντι-HBV θεραπεία και μία κατηγορία αυτών, τα παράγωγα βενζιμιδαζολών που φέρουν μία ευρεία ποικιλία πιθανών υποκαταστάσεων έχει αποδειχθεί ότι κατέχουν ικανή αντι-HBV δραστηριότητα [427]. Με βάση αυτό το σκεπτικό και εν συνεχεία πειραμάτων από την ομάδα των Καθηγητών Π. Μαράκος και Ν. Πουλή (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) που οδήγησαν στην ανακάλυψη βιοενεργών ισοστέρων πουρίνης [428-430], σχεδιάστηκε και συντέθηκε μία σειρά καινοτόμων ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών προκειμένου να μελετηθεί η βιολογική δράση τους ως πιθανοί αναστολείς του HBV. Η αντί-HBV δραστηριότητα τους εκτιμήθηκε σε *in vitro* σύστημα μόλυνσης χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά HepG2 στην οποία υπερεκφράζεται ο υποδοχέας NTCP. Από τα αρχικά πειράματα αξιολόγησης της πιθανής κυτταροτοξικότητας των αναλόγων προκύπτει πως τα ολεφινικά παράγωγα **23** και **24** είναι άκρως κυτταροτοξικά, πιθανώς επειδή ο διπλός δεσμός τους υπόκειται

εύκολα σε νουκλεοφιλική επίθεση και για το λόγο αυτό περαιτέρω έμφαση δόθηκε στην αξιολόγηση των ενώσεων **19a-d - 22a-d**.

Όπως παρουσιάστηκε, τα εν λόγω ανάλογα φαίνεται να έχουν ικανοποιητική αντί-*HBV* δράση. Εξ 'αυτών, οι ιμιδαζοπυριδίνες **19a-d** και **21a-d** που φέρουν ένα μονόχλωρο υποκαταστάτη είναι προτιμότερες των ενώσεων **20a-d** και **22a-d** που φέρουν δίχλωρο υποκαταστάτη. Από τη τελευταία ομάδα μόνο το ανάλογο **20a** εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντί-*HBV* δραστηριότητα ($EC_{50} = 14.08 \mu M$) με αποδεκτή τιμή $SI > 14.2$. Από δομικής άποψης και με εξαίρεση το **20a**, φαίνεται πως ο συνδέτης αιθυλενίου και η υποκατάσταση με την ευλύγιστη διαιθυλαμίνη είναι πιο ανεκτά στην θέση 2 του δακτυλίου ιμιδαζόλης. Συγκεκριμένα, το ανάλογο 2-διαιθυλαμινοαιθυλίου **21d** εμφανίζει 3 φορές μεγαλύτερη αντί-*HBV* δραστηριότητα ($EC_{50} = 13.53 \mu M$) σε σύγκριση με το ανάλογο 2-διαιθυλοαμινομεθυλίου **19d**, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει χαμηλή κυτταροτοξικότητα με αποτέλεσμα την άκρως ικανοποιητική τιμή $SI > 14.8$. Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τις τελικές αμίνες προκύπτει πως το **21d** ανάλογο με υποκατάσταση διαιθυλαμίνης είναι 2 φορές πιο δραστικό από τα ανάλογα **21a** και **21b** με υποκατάσταση πιπεριδίνης και *N*-μεθυλ-πιπεραζίνης, αντίστοιχα. Σημειώνεται πως κανένα από τα παράγωγα που φέρουν μορφολίνη ως υποκαταστάτη δεν φαίνεται να έχουν αντί-*HBV* δράση. Βάση των αποτελεσμάτων αυτών, ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα πιο δραστικά ανάλογα **19d**, **20a**, **21a,b** και **21d**, τα οποία προκαλούν μείωση στα επίπεδα του εκκρινόμενου *rcDNA* με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Κατόπιν, έγινε προσπάθεια εξακρίβωσης του σταδίου που στοχεύουν τα χημικά ανάλογα στον *ϊικό κύκλο ζωής*. Το **21d**, το πιο ενεργό ανάλογο που φέρει μονόχλωρο υποκαταστάτη διαιθυλαμινοαιθυλίου, καθώς και το **19d**, το συγγενικό ανάλογο διαιθυλοαμινομεθυλίου, όπως και το **20a**, ένα αντιπροσωπευτικό παράγωγο με δίχλωρο υποκαταστάτη, επιλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε εις βάθος μελέτη της επίδρασης τους. Εκτός της αποτελεσματικότητας των ενώσεων στην μείωση του εκκρινόμενου *HBV rcDNA*, τα παράγωγα αυτά φαίνεται να προκαλούν μείωση στα επίπεδα του *HBV pgRNA* αλλά και του *cccDNA*, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η αδυναμία ελέγχου του *cccDNA* αποτελεί τη σημαντικότερη τροχοπέδη στην

εξάλειψη της χρόνιας HBV μόλυνσης [450]. Ταυτόχρονα, ωστόσο, παρατηρείται συσσώρευση του rcDNA εντός των καψιδίων. Το φαινόμενο αυτό μαρτυρά πιθανή επίδραση των αναλόγων σε μετέπειτα στάδια της αντιγραφής του HBV DNA, της ωρίμανσης του νουκλεοκαψιδίου ή ακόμα και της εξόδου του από το κύτταρο. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα αυτή είναι αντίθετη με τον τρόπο δράσης των NAs, τα οποία στοχεύουν νωρίτερα στάδια στη σύνθεση του ιϊκού DNA [450]. Για εξακρίβωση της παραπάνω υπόθεσης, πραγματοποιήθηκε ενζυμική δοκιμασία της ενδογενούς πολυμεράσης του HBV (EPA) από την οποία προκύπτει το συμπέρασμα ότι η *in vitro* σύνθεση του HBV DNA δεν αναστέλλεται από το δραστικότερο ανάλογο **21d** και επομένως είναι φανερό ότι ο αναστολέας δεν στοχεύει άμεσα την ιϊκή πολυμεράση. Ταυτόχρονα, πειράματα κινητικής της σύνθεσης του cccDNA παρουσία του δραστικότερου αναστολέα, **21d**, φανέρωσαν πως τα επίπεδα του cccDNA δεν μειώθηκαν στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (1-2 ημέρες μετά την μόλυνση), όπου το cccDNA προέρχεται κυρίως από *de novo* HBV μόλυνση. Αντιθέτως, η μείωση στη σύνθεση του cccDNA παρατηρείται 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, ενισχύοντας την πιθανότητα το **21d** να συμβάλλει στην αναστολή της ενδοκυττάριας αντιγραφής του HBV cccDNA, παρά στην αποτροπή της εισόδου νέου HBV rcDNA. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η γενικότερη ανασταλτική δράση που φαίνεται να έχουν οι ενώσεις διαφέρει με αυτή που παρατηρείται στις δομικά παρόμοιες διχλωροβενζιμιδαζόλες, οι οποίες προκαλούν μείωση του εκκρινόμενου HBV DNA αλλά δεν επηρεάζουν την μεταγραφή και την σύνθεση του DNA [451].

Επιπλέον, στο πλαίσιο πειραμάτων αλληλεπίδρασης φαρμάκων, το πιο δραστικό παράγωγο **21d** φάνηκε να έχει ανταγωνιστική αντί-HBV δράση με τη πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη a2b. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι το **21d** εμποδίζει τη σηματοδότηση της ιντερφερόνης μέσω αναστολής της ωρίμανσης του ιϊκού σωματιδίου και της επακόλουθης περίσσειας των ελευθέρων HBsAg και HBeAg, δύο ιϊκές πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι παρεμβαίνουν σε πολλαπλά σημεία της σηματοδότησης με ιντερφερόνη αλλά και της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης [452]. Ωστόσο, το γεγονός αυτό έρχεται και πάλι σε αντίθεση με την συνεργιστική αντί-HBV επίδραση που φαίνεται να έχει ο συνδυασμός NAs και ιντερφερόνης [453, 454].

Συνολικά, τα αποτελέσματα φανερώνουν πως οι καινοτόμες ιμιδαζο [4,5-b] πυριδίνες αναστέλλουν την έκκριση του HBV στοχεύοντας ένα μετέπειτα στάδιο της αντιγραφής του HBV DNA, όχι άμεσα την ιϊκή πολυμεράση αλλά την αλληλεπίδραση του HBV DNA με το καψίδιο ή την μετακίνηση του νουκλεοκαψιδίου μετά την ωρίμανση του. Παρόλο που έχουν μικρότερη αντί-HBV δραστικότητα σε σχέση με αυτή που έχει καταγραφεί για τα NAs Tenofovir (TFV) και το εγκεκριμένο παράγωγο του Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), φαίνεται να έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης. Άμεση σύγκριση με τα NAs είναι αδύνατη καθώς η δραστικότητά τους (TFV EC50 = 1.1 μ M, TDF EC50 = 0.02 μ M) έχει προσδιοριστεί κατόπιν ποσοτικοποίησης του ενδοκυττάρου HBV rcDNA [455], το οποίο στην περίπτωση των ιμιδαζο [4,5-b] πυριδινών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεν αναστέλλεται. Επιπροσθέτως, οι πιο δραστικές ιμιδαζοπυριδίνες εμφανίζουν τιμές CC50 > 200 μ M, όπως και το Tenofovir [456]. Βάση της μοναδικής ανασταλτικής δράσης που παρουσιάζουν τα **20a** και **21d**, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν ως βασικές ενώσεις για περαιτέρω βελτιστοποίηση της αντί-HBV απάντησης.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Simmonds, P., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae*. Journal of General Virology, 2017. **98**(1): p. 2-3.
2. Tautz, N., B.A. Tews, and G. Meyers, *The Molecular Biology of Pestiviruses*. 2015. **93**: p. 47-160.
3. Stapleton, J.T., et al., *The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae*. Journal of General Virology, 2010. **92**(2): p. 233-246.
4. Hartlage, A.S., J.M. Cullen, and A. Kapoor, *The Strange, Expanding World of Animal Hepaciviruses*. Annu Rev Virol, 2016. **3**(1): p. 53-75.
5. *Flavivirus*: <https://www.creative-diagnostics.com/Flavivirus.htm>.
6. Guzman, A. and R.E. Isturiz, *Update on the global spread of dengue*. Int J Antimicrob Agents, 2010. **36 Suppl 1**: p. S40-2.
7. Vasilakis, N. and S.C. Weaver, *The history and evolution of human dengue emergence*. Adv Virus Res, 2008. **72**: p. 1-76.
8. Fried, J.R., et al., *Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(3): p. e617.
9. Grange, L., et al., *Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 280.
10. *World Health Organization, 2018, Dengue virus*
<http://www.who.int/topics/dengue/en/>.
11. Chen, R. and N. Vasilakis, *Dengue--quo tu et quo vadis?* Viruses, 2011. **3**(9): p. 1562-608.
12. Vasilakis, N. and S.C. Weaver, *Flavivirus transmission focusing on Zika*. Curr Opin Virol, 2017. **22**: p. 30-35.
13. Higa, Y., *Dengue Vectors and their Spatial Distribution*. Trop Med Health, 2011. **39**(4 Suppl): p. 17-27.
14. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(4): p. 564-81.
15. Whitehorn, J. and C.P. Simmons, *The pathogenesis of dengue*. Vaccine, 2011. **29**(42): p. 7221-8.
16. Puccioni-Sohler, M. and C. Rosadas, *Advances and new insights in the neuropathogenesis of dengue infection*. Arq Neuropsiquiatr, 2015. **73**(8): p. 698-703.
17. [WHO], W.H.O., *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control New Edition*. 2009, World Health Organization Press: Geneva.
18. Bopeththa, B. and U. Ralapanawa, *Post encephalitic parkinsonism following dengue viral infection*. BMC Res Notes, 2017. **10**(1): p. 655.
19. Ng, D.H.L. and S.P. Sadarangani, *"Locked in a cage"-A case of dengue virus 4 encephalitis*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(5): p. e0005369.
20. Mota, M.T., et al., *Transverse Myelitis as an Unusual Complication of Dengue Fever*. Am J Trop Med Hyg, 2017. **96**(2): p. 380-381.

21. Domingues, R.B., et al., *Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection*. J Neurol Sci, 2008. **267**(1-2): p. 36-40.
22. Soares, C.N., et al., *Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case*. Int J Infect Dis, 2010. **14**(2): p. e150-2.
23. Ramos, C., et al., *Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever*. J Neurovirol, 1998. **4**(4): p. 465-8.
24. Bordignon, J., et al., *Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains*. J Med Virol, 2007. **79**(10): p. 1506-17.
25. Hapuarachchi, H.C., et al., *Clinico-genetic characterisation of an encephalitic Dengue virus 4 associated with multi-organ involvement*. J Clin Virol, 2013. **57**(1): p. 91-4.
26. Thisyakorn, U., et al., *Dengue infection with central nervous system manifestations*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1999. **30**(3): p. 504-6.
27. Solomon, T., et al., *Neurological manifestations of dengue infection*. Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1053-9.
28. Jackson, S.T., et al., *Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population*. West Indian Med J, 2008. **57**(4): p. 373-6.
29. Le, V.T., et al., *Viral etiology of encephalitis in children in southern Vietnam: results of a one-year prospective descriptive study*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(10): p. e854.
30. Tan le, V., et al., *Viral aetiology of central nervous system infections in adults admitted to a tertiary referral hospital in southern Vietnam over 12 years*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(8): p. e3127.
31. Kumar, R., et al., *Prevalence and clinical differentiation of dengue fever in children in northern India*. Infection, 2008. **36**(5): p. 444-9.
32. Chokephaibulkit, K., et al., *Viral etiologies of encephalitis in Thai children*. Pediatr Infect Dis J, 2001. **20**(2): p. 216-8.
33. Soares, C.N., et al., *Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region*. J Neurol Sci, 2011. **303**(1-2): p. 75-9.
34. Murthy, J.M., *Neurological complication of dengue infection*. Neurol India, 2010. **58**(4): p. 581-4.
35. Mardekian, S.K. and A.L. Roberts, *Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 1-8.
36. Muller, D.A., A.C.I. Depelsenaire, and P.R. Young, *Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection*. The Journal of Infectious Diseases, 2017. **215**(suppl_2): p. S89-S95.
37. Silva, J.V.J., et al., *Current status, challenges and perspectives in the development of vaccines against yellow fever, dengue, Zika and chikungunya viruses*. Acta Tropica, 2018. **182**: p. 257-263.
38. Kamau, E., et al., *Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Strains from Kilifi, Kenya*. Microbiol Resour Announc, 2019. **8**(4).

39. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Molecular biology of flaviviruses*. Adv Virus Res, 2003. **59**: p. 23-61.
40. Mazeaud, C., W. Freppel, and L. Chatel-Chaix, *The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis*. Frontiers in Genetics, 2018. **9**.
41. Filomatori, C.V., et al., *RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase*. J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 6929-39.
42. Filomatori, C.V., et al., *A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2238-49.
43. Ng, W.C., et al., *The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome*. Viruses, 2017. **9**(6).
44. Byk, L.A. and A.V. Gamarnik, *Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein*. Annu Rev Virol, 2016. **3**(1): p. 263-281.
45. Jones, C.T., et al., *Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 7143-9.
46. Hsieh, S.C., et al., *The C-terminal helical domain of dengue virus precursor membrane protein is involved in virus assembly and entry*. Virology, 2011. **410**(1): p. 170-80.
47. Zhang, X., et al., *Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections*. Viruses, 2017. **9**(11): p. 338.
48. Rastogi, M., N. Sharma, and S.K. Singh, *Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein*. Virology Journal, 2016. **13**(1).
49. Xie, X., et al., *Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein*. J Virol, 2013. **87**(8): p. 4609-22.
50. Luo, D., S.G. Vasudevan, and J. Lescar, *The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development*. Antiviral Res, 2015. **118**: p. 148-58.
51. Nemesio, H., F. Palomares-Jerez, and J. Villalain, *NS4A and NS4B proteins from dengue virus: membranotropic regions*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(11): p. 2818-30.
52. El Sahili, A. and J. Lescar, *Dengue Virus Non-Structural Protein 5*. Viruses, 2017. **9**(4).
53. Pugachev, K.V., et al., *High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 1032-8.
54. Best, S.M., *The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling*. J Virol, 2017. **91**(3).
55. Hasan, S.S., et al., *Structural biology of Zika virus and other flaviviruses*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(1): p. 13-20.
56. Heinz, F.X. and K. Stiasny, *The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2017. **81**(1).
57. Salazar, M.I., et al., *Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 9.
58. Wikan, N. and D.R. Smith, *Zika virus: history of a newly emerging arbovirus*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(7): p. e119-e126.

59. Back, A.T. and A. Lundkvist, *Dengue viruses - an overview*. Infect Ecol Epidemiol, 2013. **3**.
60. Rodenhuis-Zybert, I.A., J. Wilschut, and J.M. Smit, *Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(16): p. 2773-86.
61. Acosta, E.G., A. Kumar, and R. Bartenschlager, *Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology*. Adv Virus Res, 2014. **88**: p. 1-109.
62. St. John, A.L., S.N. Abraham, and D.J. Gubler, *Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis*. Nature Reviews Microbiology, 2013. **11**(6): p. 420-426.
63. Guzman, M.G., et al., *Dengue infection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16055.
64. Kinney, R.M., et al., *Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53*. Virology, 1997. **230**(2): p. 300-8.
65. Sriburi, R., et al., *Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid*. Journal of Virological Methods, 2001. **92**(1): p. 71-82.
66. Fischl, W. and R. Bartenschlager, *High-throughput screening using dengue virus reporter genomes*. Methods Mol Biol, 2013. **1030**: p. 205-19.
67. Kato, F. and T. Hishiki, *Dengue Virus Reporter Replicon is a Valuable Tool for Antiviral Drug Discovery and Analysis of Virus Replication Mechanisms*. Viruses, 2016. **8**(5).
68. Masse, N., et al., *Dengue virus replicons: production of an interserotypic chimera and cell lines from different species, and establishment of a cell-based fluorescent assay to screen inhibitors, validated by the evaluation of ribavirin's activity*. Antiviral Res, 2010. **86**(3): p. 296-305.
69. Leardkamolkarn, V., et al., *Development of Dengue type-2 virus replicons expressing GFP reporter gene in study of viral RNA replication*. Virus Res, 2012. **163**(2): p. 552-62.
70. Zou, G., et al., *Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening*. Antiviral Res, 2011. **91**(1): p. 11-9.
71. An, J., et al., *Development of a novel mouse model for dengue virus infection*. Virology, 1999. **263**(1): p. 70-7.
72. Zellweger, R.M. and S. Shresta, *Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 151.
73. Zompi, S. and E. Harris, *Animal models of dengue virus infection*. Viruses, 2012. **4**(1): p. 62-82.
74. Sarathy, V.V., et al., *Mouse models of dengue virus infection for vaccine testing*. Vaccine, 2015. **33**(50): p. 7051-60.
75. Baharuddin, A., et al., *Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(21): p. 3428-44.
76. Tian, Y.S., et al., *Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2018. **66**(3): p. 191-206.
77. Panya, A., et al., *Peptide inhibitors against dengue virus infection*. Chem Biol Drug Des, 2014. **84**(2): p. 148-57.

78. Schmidt, A.G., et al., *Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry*. PLoS Pathog, 2012. **8**(4): p. e1002627.
79. Takagi, Y., et al., *Discovery of novel cyclic peptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 protease with antiviral activity*. Bioorg Med Chem Lett, 2017. **27**(15): p. 3586-3590.
80. Raut, R., et al., *A small molecule inhibitor of dengue virus type 2 protease inhibits the replication of all four dengue virus serotypes in cell culture*. Virol J, 2015. **12**: p. 16.
81. Brecher, M., et al., *A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease*. PLoS Pathog, 2017. **13**(5): p. e1006411.
82. Pambudi, S., et al., *A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits dengue virus replication*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **440**(3): p. 393-8.
83. Lim, S.P., et al., *Small Molecule Inhibitors That Selectively Block Dengue Virus Methyltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 6233-6240.
84. Byrd, C.M., et al., *Novel benzoxazole inhibitor of dengue virus replication that targets the NS3 helicase*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(4): p. 1902-12.
85. Carroll, S.S., et al., *Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 11979-84.
86. Lim, S.P., et al., *Potent Allosteric Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors: Mechanism of Action and Resistance Profiling*. PLoS Pathog, 2016. **12**(8): p. e1005737.
87. Takhampunya, R., et al., *Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 1947-52.
88. Teixeira, R.R., et al., *Natural products as source of potential dengue antivirals*. Molecules, 2014. **19**(6): p. 8151-76.
89. Holtz, P., R. Heise, and K. Lüdtkke, *Fermentativer Abbau von l-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere*. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1938. **191**(1): p. 87-118.
90. Gillbro, J.M., et al., *Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(2): p. 346-53.
91. Lancaster, G.A. and T.L. Sourkes, *Purification and Properties of Hog-Kidney 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase*. Canadian Journal of Biochemistry, 1972. **50**(7): p. 791-797.
92. Christenson, J.G., W. Dairman, and S. Udenfriend, *Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney*. Arch Biochem Biophys, 1970. **141**(1): p. 356-67.
93. Paterson, I.A., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *2-Phenylethylamine: A Modulator of Catecholamine Transmission in the Mammalian Central Nervous System?* Journal of Neurochemistry, 1990. **55**(6): p. 1827-1837.

94. Dyck, L.E. and K.M. Dewar, *Inhibition of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase and Tyrosine Aminotransferase by the Monoamine Oxidase Inhibitor Phenelzine*. Journal of Neurochemistry, 2006. **46**(6): p. 1899-1903.
95. Jones, R.S.G. and A.A. Boulton, *Interactions between p-tyramine, m-tyramine, or β -phenylethylamine and dopamine on single neurones in the cortex and caudate nucleus of the rat*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1980. **58**(2): p. 222-227.
96. Guillot, T.S. and G.W. Miller, *Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons*. Mol Neurobiol, 2009. **39**(2): p. 149-70.
97. Linert, W., et al., *Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1316**(3): p. 160-8.
98. Munoz, P., et al., *Dopamine oxidation and autophagy*. Parkinsons Dis, 2012. **2012**: p. 920953.
99. Beauchaine, T.P., et al., *Multifinality in the development of personality disorders: a Biology x Sex x Environment interaction model of antisocial and borderline traits*. Dev Psychopathol, 2009. **21**(3): p. 735-70.
100. Eaton, M.J., et al., *Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology*. The Journal of Comparative Neurology, 1993. **337**(4): p. 640-654.
101. Christenson, J.G., W. Dairman, and S. Udenfriend, *On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(2): p. 343-7.
102. Crow, T.J., *Positive and negative schizophrenia symptoms and the role of dopamine*. Br J Psychiatry, 1981. **139**(3): p. 251-4.
103. Tison, F., et al., *Aromatic l-amino-acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in dopaminergic and serotonergic cells of the rat brainstem*. Neuroscience Letters, 1991. **127**(2): p. 203-206.
104. Beltramo, M., et al., *Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) immunohistochemistry in vertebrate brainstem with an antiserum raised against AADC made in E. coli*. Brain Research Bulletin, 1993. **32**(2): p. 123-132.
105. Snyder, S.H., *Catecholamines in the Brain as Mediators of Amphetamine Psychosis*. Archives of General Psychiatry, 1972. **27**(2): p. 169.
106. Fahn, S., L.R. Libsch, and R.W. Cutler, *Monoamines in the human neostriatum: Topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor*. Journal of the Neurological Sciences, 1971. **14**(4): p. 427-455.
107. Kandel, D.B. and M. Davies, *Cocaine Use in a National Sample of U.S. Youth (NLSY): Ethnic Patterns, Progression, and Predictors*. Substance Use & Misuse, 2009. **32**(12-13): p. 1757-1762.
108. Lindstrom, P.E.R. and J. Sehlin, *Mechanisms Underlying the Effects of 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxytryptophan in Pancreatic Islets. A Proposed*

- Role for L-Aromatic Amino Acid Decarboxylase**. *Endocrinology*, 1983. **112**(4): p. 1524-1529.
109. Mappouras, D.G. and E.G. Fragoulis, *L-DOPA decarboxylase in Ceratitis capitata white puparia and human: A comparative study*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1990. **97**(2): p. 301-306.
 110. Rahman, M.K., N. Toshiharu, and K. Takeshi, *Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-dopa and L-5-hydroxytryptophan as substrates*. *Biochemical Pharmacology*, 1981. **30**(6): p. 645-649.
 111. Eisenhofer, G., et al., *Substantial Production of Dopamine in the Human Gastrointestinal Tract*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997. **82**(11): p. 3864-3871.
 112. Lauweryns, J.M. and L. Van Ranst, *Immunocytochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in human, rat, and mouse bronchopulmonary and gastrointestinal endocrine cells*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2017. **36**(9): p. 1181-1186.
 113. Dockray, G.J., A. Varro, and R. Dimaline, *Gastric endocrine cells: gene expression, processing, and targeting of active products*. *Physiol Rev*, 1996. **76**(3): p. 767-98.
 114. Hussein, H.S. and H.O. Balzer, *Use of Tsk-Sw Columns for the High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Proteins, Isolated from Sympathetic-Nerves and Fractionated by Fractogel Tsk-Hw Chromatography - Purification of L-Dopa Decarboxylase*. *Journal of Chromatography*, 1984. **297**(Aug): p. 375-383.
 115. Borri Voltattorni, C., et al., *Purification and Characterization of 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase from Pig Kidney*. *European Journal of Biochemistry*, 1979. **93**(1): p. 181-188.
 116. Ichinose, H., et al., *Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase*. *Biochemistry*, 1992. **31**(46): p. 11546-50.
 117. Maneckjee, R. and S.B. Baylin, *Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase*. *Biochemistry*, 2002. **22**(26): p. 6058-6063.
 118. Mappouras, D., J. Stiakakis, and E. Fragoulis, *Purification and characterization of L-DOPA decarboxylase from human kidney*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1990. **94**(2): p. 147-156.
 119. Ando-Yamamoto, M., et al., *Purification of L-dopa decarboxylase from rat liver and production of polyclonal and monoclonal antibodies against it*. *J Biochem*, 1987. **101**(2): p. 405-14.
 120. Nishigaki, I., et al., *Purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody*. *Biochemical Journal*, 1988. **252**(2): p. 331-335.
 121. Shirota, K. and H. Fujisawa, *Purification and Characterization of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase from Rat Kidney and Monoclonal Antibody to the Enzyme*. *Journal of Neurochemistry*, 1988. **51**(2): p. 426-434.

122. Siow, Y. and K. Dakshinamurti, *Purification of DOPA decarboxylase from bovine striatum*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1990. **94**(2): p. 121-131.
123. Nasrin, S., H. Ichinose, and T. Nagatsu, *Comparison of characteristics of bovine aromatic l-amino acid decarboxylase with human enzyme*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1118**(3): p. 318-322.
124. Dominici, P., P.S. Moore, and C.B. Voltattorni, *Modified purification of L-aromatic amino acid decarboxylase from pig kidney*. Protein Expr Purif, 1993. **4**(4): p. 345-7.
125. Maras, B., et al., *Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) decarboxylase. Primary structure and relationship to other amino acid decarboxylases*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(2): p. 385-391.
126. Burkhard, P., et al., *Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(11): p. 963-7.
127. Bertoldi, M., *Mammalian Dopa decarboxylase: structure, catalytic activity and inhibition*. Arch Biochem Biophys, 2014. **546**: p. 1-7.
128. John, R.A., *Pyridoxal phosphate-dependent enzymes*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1248**(2): p. 81-96.
129. Ichinose, H., et al., *Simple Purification of Aromatic L-Amino-Acid Decarboxylase from Human Pheochromocytoma Using High-Performance Liquid-Chromatography*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(2): p. 408-414.
130. Siow, Y.L. and K. Dakshinamurti, *Effect of pyridoxine deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase in adult rat brain*. Experimental Brain Research, 1985. **59**(3).
131. Rahman, M.K. and T. Nagatsu, *Demonstration of aromatic l-amino acid decarboxylase activity in human brain with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Neurochemistry International, 1982. **4**(1): p. 1-6.
132. Sims, K.L., G.A. Davis, and F.E. Bloom, *ACTIVITIES OF 3,4-DIHYDROXY-I-PHENYLALANINE AND 5-HYDROXY-I-TRYPTOPHAN DECARBOXYLASES IN RAT BRAIN: ASSAY CHARACTERISTICS AND DISTRIBUTION*. Journal of Neurochemistry, 1973. **20**(2): p. 449-464.
133. Rahman, M.K., et al., *AROMATIC L-AMINO ACID DECARBOXYLASE ACTIVITY IN BRAINS FROM NORMAL HUMAN SUBJECTS AND FROM PATIENTS WITH EXTRAPYRAMIDAL DISEASES*. Biomedical Research, 1981. **2**(5): p. 560-566.
134. Bender, D.A. and W.F. Coulson, *Variations in aromatic amino acid decarboxylase activity towards DOPA and 5-hydroxytryptophan caused by pH changes and denaturation*. J Neurochem, 1972. **19**(12): p. 2801-10.
135. Srinivasan, K. and J. Awapara, *Substrate specificity and other properties of DOPA decarboxylase from guinea pig kidneys*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, 1978. **526**(2): p. 597-604.
136. Bowsher, R.R. and D.P. Henry, *Decarboxylation of p-tyrosine: a potential source of p-tyramine in mammalian tissues*. J Neurochem, 1983. **40**(4): p. 992-1002.

137. Dairman, W., et al., *Proportionate Loss of L-3,4-Dihydroxyphenylalanine and L-5-Hydroxytryptophan Decarboxylating Activity in Rat Central Nervous-System Following Intracisternal Administration of 5,6-Dihydroxytryptamine or 6-Hydroxydopamine*. Journal of Neurochemistry, 1975. **24**(4): p. 619-623.
138. Melamed, E., et al., *Aromatic L-amino acid decarboxylase in rat corpus striatum: Implications for action of L-dopa in parkinsonism*. Neurology, 1981. **31**(6): p. 651-651.
139. Tanaka, T., et al., *Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(20): p. 8142-8146.
140. Sumi, C., H. Ichinose, and T. Nagatsu, *Characterization of Recombinant Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Expressed in COS Cells*. Journal of Neurochemistry, 1990. **55**(3): p. 1075-1078.
141. Jebai, F., et al., *Expression, purification, and characterization of rat aromatic L-amino acid decarboxylase in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 1997. **11**(2): p. 185-94.
142. Coge, F., et al., *Comparative and quantitative study of L-dopa decarboxylase mRNA in rat neuronal and non-neuronal tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(3): p. 1006-12.
143. Siaterli, M.-Z., Neurochemical Research, 2003. **28**(6): p. 797-803.
144. Porter, C.C., et al., *Inhibition of dopa decarboxylase by the hydrazino analog of α -methyl dopa*. Biochemical Pharmacology, 1962. **11**(11): p. 1067-1077.
145. Carlsson, A., *The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 1988. **1**(3): p. 179-86.
146. Maycock, A.L., S.D. Aster, and A.A. Patchett, *Inactivation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine decarboxylase by 2-(fluoromethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine*. Biochemistry, 2002. **19**(4): p. 709-718.
147. Jonkers, N., et al., *Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat*. J Neural Transm (Vienna), 2001. **108**(5): p. 559-70.
148. Black, B.C., E.S. Pentz, and T.R. Wright, *The alpha methyl dopa hypersensitive gene, 1(2)amd, and two adjacent genes in Drosophila melanogaster: physical location and direct effects of amd on catecholamine metabolism*. Mol Gen Genet, 1987. **209**(2): p. 306-12.
149. Bertoldi, M., M. Gonsalvi, and C.B. Voltattorni, *Green tea polyphenols: novel irreversible inhibitors of dopa decarboxylase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(1): p. 90-3.
150. Sumi-Ichinose, C., et al., *Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis*. Biochemistry, 2002. **31**(8): p. 2229-2238.
151. Bruneau, G., et al., *Preparation of a human DOPA decarboxylase cDNA probe by PCR and its assignment to chromosome 7*. Ann Genet, 1990. **33**(4): p. 208-13.

152. Craig, S.P., et al., *Localisation of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) to chromosome 7p13-->p11 by in situ hybridisation*. Cytogenet Cell Genet, 1992. **61**(2): p. 114-6.
153. Scherer, L.J., et al., *Human dopa decarboxylase: Localization to human chromosome 7p11 and characterization of hepatic cDNAs*. Genomics, 1992. **13**(2): p. 469-471.
154. Ichinose, H., et al., *Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **164**(3): p. 1024-30.
155. Jahng, J.W., et al., *Alternate Promoters in the Rat Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene for Neuronal and Nonneuronal Expression: An In Situ Hybridization Study*. Journal of Neurochemistry, 2002. **66**(1): p. 14-19.
156. Kokkinou, I., et al., *Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes*. Blood Cells Mol Dis, 2009. **42**(1): p. 92-8.
157. Vassiliou, A.G., et al., *L-Dopa decarboxylase interaction with the major signaling regulator PI3K in tissues and cells of neural and peripheral origin*. Biochimie, 2019. **160**: p. 76-87.
158. Vassilacopoulou, D., et al., *Identification and Characterization of a Novel Form of the Human L-Dopa Decarboxylase mRNA*. Neurochemical Research, 2004. **29**(10): p. 1817-1823.
159. Chalatsa, I., et al., *L-Dopa decarboxylase expression profile in human cancer cells*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(2): p. 1005-11.
160. O'Malley, K.L., et al., *The Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Can Be Alternatively Spliced To Generate Unique Protein Isoforms*. Journal of Neurochemistry, 2002. **65**(6): p. 2409-2416.
161. Chang, Y.T., G. Mues, and K. Hyland, *Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA*. Neurosci Lett, 1996. **202**(3): p. 157-60.
162. Kokkinou, I., E.G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, *The U937 macrophage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase*. J Neuroimmunol, 2009. **216**(1-2): p. 51-8.
163. Rorsman, F., et al., *Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(19): p. 8626-8629.
164. Adamopoulos, P.G., et al., *Identification of novel alternative splice variants of the human L-DOPA decarboxylase (DDC) gene in human cancer cells, using high-throughput sequencing approaches*. Gene, 2019. **719**: p. 144075.
165. Li, X.-M., et al., *Specific Irreversible Monoamine Oxidase B Inhibitors Stimulate Gene Expression of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase in PC12 Cells*. Journal of Neurochemistry, 2006. **59**(6): p. 2324-2327.
166. Li, X.-M., et al., *L-Deprenyl induces aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) mRNA in the rat substantia nigra and ventral tegmentum*. Molecular and Chemical Neuropathology, 1998. **35**(1-3): p. 149-155.

167. Kim, K.T., D.H. Park, and T.H. Joh, *Parallel up-regulation of catecholamine biosynthetic enzymes by dexamethasone in PC12 cells*. J Neurochem, 1993. **60**(3): p. 946-51.
168. Li, X.-M., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *Induction of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA by interleukin-1 β and prostaglandin E2 in PC12 cells*. Neurochemical Research, 1994. **19**(5): p. 591-595.
169. Li, X.-M., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *NSD-1015 alters the gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat PC12 pheochromocytoma cells*. Neurochemical Research, 1993. **18**(8): p. 915-919.
170. Buckland, P.R., M.C. O'Donovan, and P. McGuffin, *Changes in dopa decarboxylase mRNA but not tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain following antipsychotic treatment*. Psychopharmacology, 1992. **108**(1-2): p. 98-102.
171. Hadjiconstantinou, M., et al., *Dizocilpine enhances striatal tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activity*. Eur J Pharmacol, 1995. **289**(1): p. 97-101.
172. Wessel, T.C. and T.H. Joh, *Parallel upregulation of catecholamine-synthesizing enzymes in rat brain and adrenal gland: effects of reserpine and correlation with immediate early gene expression*. Molecular Brain Research, 1992. **15**(3-4): p. 349-360.
173. Li, X.-M., et al., *Amantadine increases aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in PC12 cells*. Journal of Neuroscience Research, 1998. **53**(4): p. 490-493.
174. Buckland, P.R., G. Spurlock, and P. McGuffin, *Amphetamine and vigabatrin down regulate aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA levels*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **35**(1-2): p. 69-76.
175. Li, X.M., et al., *Reciprocal regulation of the content of aromatic L-amino acid decarboxylase and tyrosine hydroxylase mRNA by NGF in PC12 cells*. Journal of Neuroscience Research, 1997. **47**(4): p. 449-454.
176. Li, X.M., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *NSD-1015 alters the gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat PC12 pheochromocytoma cells*. Neurochem Res, 1993. **18**(8): p. 915-9.
177. Gudehithlu, K.P., et al., *Expression of cloned aromatic L-amino acid decarboxylase in Xenopus laevis oocytes*. Neurochem Int, 1992. **21**(2): p. 275-9.
178. Kang, S.H., M.S. Fuchs, and P.M. Webb, *Purification and Characterization of Dopa-Decarboxylase from Adult Gravid Aedes-Aegypti*. Insect Biochemistry, 1980. **10**(5): p. 501-508.
179. Young, E.A., N.H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, *Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain*. J Neurochem, 1993. **60**(6): p. 2331-3.
180. Young, E.A., N.H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, *Evidence for Cyclic AMP-Mediated Increase of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Activity in the Striatum and Midbrain*. Journal of Neurochemistry, 1993. **60**(6): p. 2331-2333.

181. Duchemin, A.M., et al., *Phosphorylation and activation of brain aromatic L-amino acid decarboxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Neurochem, 2000. **75**(2): p. 725-31.
182. Young, E.A., N.H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, *Phorbol ester administration transiently increases aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the mouse striatum and midbrain*. J Neurochem, 1994. **63**(2): p. 694-7.
183. Kebabian, P.R., J.W. Kebabian, and D.O. Carpenter, *Regulation of cyclic AMP in heart and gill of Aplysia by the putative neurotransmitters dopamine and serotonin*. Life Sci, 1979. **24**(19): p. 1757-64.
184. Rubi, B. and P. Maechler, *Minireview: new roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5570-81.
185. Lu, M., et al., *Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 1543-52.
186. Zou, J., et al., *Dopamine-induced SUL1A3/4 promotes EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma*. Tumour Biol, 2017. **39**(10): p. 1010428317719272.
187. Liu, X.F., et al., *Fisetin inhibits liver cancer growth in a mouse model: Relation to dopamine receptor*. Oncol Rep, 2017. **38**(1): p. 53-62.
188. He, S., et al., *Repurposing of the antihistamine chlorcyclizine and related compounds for treatment of hepatitis C virus infection*. Sci Transl Med, 2015. **7**(282): p. 282ra49.
189. Cao, L., et al., *Identification of serotonin 2A receptor as a novel HCV entry factor by a chemical biology strategy*. Protein Cell, 2019. **10**(3): p. 178-195.
190. Smith, J.L., et al., *Inhibition of Dengue Virus Replication by a Class of Small-Molecule Compounds That Antagonize Dopamine Receptor D4 and Downstream Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling*. Journal of Virology, 2014. **88**(10): p. 5533-5542.
191. Ramos, M.M., et al., *Early clinical features of dengue infection in Puerto Rico*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2009. **103**(9): p. 878-884.
192. Simanjuntak, Y., et al., *Repurposing of Prochlorperazine for Use Against Dengue Virus Infection*. Journal of Infectious Diseases, 2015. **211**(3): p. 394-404.
193. Gastaminza, P., C. Whitten-Bauer, and F.V. Chisari, *Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 291-6.
194. Ishida, H., et al., *Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **412**(1): p. 92-7.
195. Pramod, A.B., et al., *SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics*. Molecular Aspects of Medicine, 2013. **34**(2-3): p. 197-219.
196. Jia, X., et al., *miR-137 and miR-491 Negatively Regulate Dopamine Transporter Expression and Function in Neural Cells*. Neurosci Bull, 2016. **32**(6): p. 512-522.

197. Frakolaki, E., et al., *Emerging Role of L-Dopa Decarboxylase in Flaviviridae Virus Infections*. Cells, 2019. **8**(8).
198. Holden, P. and W.A. Horton, *Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines*. BMC Res Notes, 2009. **2**(1): p. 243.
199. Mannova, P. and L. Beretta, *Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR Pathway by Hepatitis C Virus: Control of Cell Survival and Viral Replication*. Journal of Virology, 2005. **79**(14): p. 8742-8749.
200. Street, A., et al., *Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 5006-16.
201. He, Y., et al., *Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9207-17.
202. Liu, Y., et al., *Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway*. Virology, 2014. **448**: p. 15-25.
203. Lee, C.J., C.L. Liao, and Y.L. Lin, *Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection*. J Virol, 2005. **79**(13): p. 8388-99.
204. Chen, H.H., et al., *AR-12 suppresses dengue virus replication by down-regulation of PI3K/AKT and GRP78*. Antiviral Res, 2017. **142**: p. 158-168.
205. Hare, M.L., *Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver*. Biochem J, 1928. **22**(4): p. 968-79.
206. Fowler, C.J., T.J. Mantle, and K.F. Tipton, *The nature of the inhibition of rat liver monoamine oxidase types A and B by the acetylenic inhibitors clorgyline, l-deprenyl and pargyline*. Biochem Pharmacol, 1982. **31**(22): p. 3555-61.
207. Bach, A.W., et al., *cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4934-8.
208. Chiba, K., A. Trevor, and N. Castagnoli, Jr., *Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(2): p. 574-8.
209. Glover, V., et al., *Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man*. Nature, 1977. **265**(5589): p. 80-1.
210. Neff, N.H. and H.Y. Yang, *Another look at the monoamine oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs*. Life Sci, 1974. **14**(11): p. 2061-74.
211. Johnston, J.P., *Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue*. Biochem Pharmacol, 1968. **17**(7): p. 1285-97.
212. O'Carroll, A.M., et al., *The deamination of dopamine by human brain monoamine oxidase. Specificity for the two enzyme forms in seven brain regions*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1983. **322**(3): p. 198-202.
213. Tipton, K.F., A.M. O'Carroll, and J.M. McCrodden, *The catalytic behaviour of monoamine oxidase*. J Neural Transm Suppl, 1987. **23**: p. 25-35.
214. Jahng, J.W., et al., *Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization*. Synapse, 1997. **25**(1): p. 30-6.

215. Luque, J.M., et al., *Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 1995. **363**(4): p. 665-680.
216. Saura, J., J.G. Richards, and N. Mahy, *Differential age-related changes of MAO-A and MAO-B in mouse brain and peripheral organs*. Neurobiol Aging, 1994. **15**(4): p. 399-408.
217. Saura, J., J.G. Richards, and N. Mahy, *Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radioautographic study*. J Neural Transm Suppl, 1994. **41**: p. 89-94.
218. Willoughby, J., V. Glover, and M. Sandler, *Histochemical localisation of monoamine oxidase A and B in rat brain*. J Neural Transm, 1988. **74**(1): p. 29-42.
219. Westlund, K.N., et al., *Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem*. Neuroscience, 1988. **25**(2): p. 439-56.
220. Minamiura, N. and K.T. Yasunobu, *Bovine liver monoamine oxidase. A modified purification procedure and preliminary evidence for two subunits and one FAD*. Arch Biochem Biophys, 1978. **189**(2): p. 481-9.
221. Denney, R.M., et al., *Human liver MAO-A and MAO-B separated by immunoaffinity chromatography with MAO-B-specific monoclonal antibody*. Science, 1982. **215**(4538): p. 1400-3.
222. Erwin, V.G. and L. Hellerman, *Mitochondrial monoamine oxidase. I. Purification and characterization of the bovine kidney enzyme*. J Biol Chem, 1967. **242**(18): p. 4230-8.
223. Weyler, W. and J.I. Salach, *Purification and properties of mitochondrial monoamine oxidase type A from human placenta*. J Biol Chem, 1985. **260**(24): p. 13199-207.
224. Masini-Repiso, A.M., et al., *Monoamine oxidase in bovine thyroid tissue*. Horm Metab Res, 1986. **18**(11): p. 750-3.
225. Saura, J., et al., *Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry*. Neuroscience, 1996. **70**(3): p. 755-74.
226. Kumar, M.J., D.G. Nicholls, and J.K. Andersen, *Oxidative alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition via subtle elevations in monoamine oxidase B levels results in loss of spare respiratory capacity: implications for Parkinson's disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46432-9.
227. Maurel, A., et al., *Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(4): p. H1460-7.
228. Lan, N.C., C.H. Chen, and J.C. Shih, *Expression of functional human monoamine oxidase A and B cDNAs in mammalian cells*. J Neurochem, 1989. **52**(5): p. 1652-4.
229. Lan, N.C., et al., *Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease*. Genomics, 1989. **4**(4): p. 552-9.

230. Levy, E.R., et al., *Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease*. Genomics, 1989. **5**(2): p. 368-70.
231. Derry, J.M., et al., *Localization of monoamine oxidase A and B genes on the mouse X chromosome*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(20): p. 8403.
232. Sims, K.B., et al., *Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion*. Neuron, 1989. **2**(1): p. 1069-76.
233. Brunner, H.G., et al., *Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A*. Science, 1993. **262**(5133): p. 578-80.
234. Collins, F.A., et al., *Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes*. Am J Med Genet, 1992. **42**(1): p. 127-34.
235. Grimsby, J., et al., *Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3637-41.
236. Zhu, Q.S., et al., *Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes*. J Neurosci, 1992. **12**(11): p. 4437-46.
237. Zhu, Q.S., K. Chen, and J.C. Shih, *Bidirectional promoter of human monoamine oxidase A (MAO A) controlled by transcription factor Sp1*. J Neurosci, 1994. **14**(12): p. 7393-403.
238. Schreuder, H.A., et al., *Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with its reaction product 3,4-dihydroxybenzoate*. J Mol Biol, 1988. **199**(4): p. 637-48.
239. Wierenga, R.K., et al., *Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase*. J Mol Biol, 1979. **131**(1): p. 55-73.
240. Binda, C., et al., *Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(1): p. 22-6.
241. Ma, J., et al., *Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors*. J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 103-14.
242. Upadhyay, A.K., et al., *Determination of the oligomeric states of human and rat monoamine oxidases in the outer mitochondrial membrane and octyl beta-D-glucopyranoside micelles using pulsed dipolar electron spin resonance spectroscopy*. Biochemistry, 2008. **47**(6): p. 1554-66.
243. De Colibus, L., et al., *Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(36): p. 12684-9.
244. Rebrin, I., et al., *Effects of carboxyl-terminal truncations on the activity and solubility of human monoamine oxidase B*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29499-506.
245. Binda, C., et al., *Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs*. J Med Chem, 2007. **50**(23): p. 5848-52.
246. Son, S.Y., et al., *Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-A resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(15): p. 5739-44.

247. Edmondson, D.E., A.K. Bhattacharyya, and M.C. Walker, *Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N,N-dimethylamino)benzylamine analogues by monoamine oxidase B*. *Biochemistry*, 1993. **32**(19): p. 5196-202.
248. Gaweska, H. and P.F. Fitzpatrick, *Structures and Mechanism of the Monoamine Oxidase Family*. *Biomol Concepts*, 2011. **2**(5): p. 365-377.
249. Al-Nuaimi, S.K., E.M. Mackenzie, and G.B. Baker, *Monoamine oxidase inhibitors and neuroprotection: a review*. *Am J Ther*, 2012. **19**(6): p. 436-48.
250. Dezsi, L. and L. Vecsei, *Monoamine Oxidase B Inhibitors in Parkinson's Disease*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017. **16**(4): p. 425-439.
251. Binda, C., et al., *Lights and shadows on monoamine oxidase inhibition in neuroprotective pharmacological therapies*. *Curr Top Med Chem*, 2011. **11**(22): p. 2788-96.
252. Riederer, P. and G. Laux, *MAO-inhibitors in Parkinson's Disease*. *Exp Neurobiol*, 2011. **20**(1): p. 1-17.
253. Riederer, P., L. Lachenmayer, and G. Laux, *Clinical applications of MAO-inhibitors*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(15): p. 2033-43.
254. Teo, K.C. and S.L. Ho, *Monoamine oxidase-B (MAO-B) inhibitors: implications for disease-modification in Parkinson's disease*. *Transl Neurodegener*, 2013. **2**(1): p. 19.
255. Bartl, J., et al., *Chronic monoamine oxidase-B inhibitor treatment blocks monoamine oxidase-A enzyme activity*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014. **121**(4): p. 379-83.
256. Feinberg, S.S., *Combining stimulants with monoamine oxidase inhibitors: a review of uses and one possible additional indication*. *J Clin Psychiatry*, 2004. **65**(11): p. 1520-4.
257. Tabi, T., et al., *The pharmacokinetic evaluation of selegiline ODT for the treatment of Parkinson's disease*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(5): p. 629-36.
258. Li, X.M., et al., *Specific irreversible monoamine oxidase B inhibitors stimulate gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in PC12 cells*. *J Neurochem*, 1992. **59**(6): p. 2324-7.
259. Eiden, L.E., et al., *The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 636-40.
260. Schuldiner, S., *A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters*. *J Neurochem*, 1994. **62**(6): p. 2067-78.
261. Gasnier, B., *The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles*. *Biochimie*, 2000. **82**(4): p. 327-37.
262. Hiasa, M., et al., *Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 6836.
263. Schuldiner, S., A. Shirvan, and M. Linial, *Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans*. *Physiol Rev*, 1995. **75**(2): p. 369-92.

264. Erickson, J.D., et al., *Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 5166-71.
265. Wimalasena, K., *Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry*. Med Res Rev, 2011. **31**(4): p. 483-519.
266. Anlauf, M., et al., *Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression in hematopoietic cells and in patients with systemic mastocytosis*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(2): p. 201-13.
267. Weihe, E., et al., *Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 659-78.
268. Peter, D., et al., *The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors*. J Biol Chem, 1994. **269**(10): p. 7231-7.
269. Liu, Y., et al., *A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter*. Cell, 1992. **70**(4): p. 539-51.
270. Liu, Y., A. Roghani, and R.H. Edwards, *Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9074-8.
271. Gros, Y. and S. Schuldiner, *Directed evolution reveals hidden properties of VMAT, a neurotransmitter transporter*. J Biol Chem, 2010. **285**(7): p. 5076-84.
272. Blaschko, H. and A.D. Welch, *Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla*. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol, 1953. **219**(1-2): p. 17-22.
273. Hillarp, N.A., S. Lagerstedt, and B. Nilson, *The isolation of a granular fraction from the suprarenal medulla, containing the sympathomimetic catechol amines*. Acta Physiol Scand, 1953. **29**(2-3): p. 251-63.
274. De Robertis, E.D. and H.S. Bennett, *Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm*. J Biophys Biochem Cytol, 1955. **1**(1): p. 47-58.
275. Holtzman, E., A.R. Freeman, and L.A. Kashner, *Stimulation-dependent alterations in peroxidase uptake at lobster neuromuscular junctions*. Science, 1971. **173**(3998): p. 733-6.
276. Ceccarelli, B., W.P. Hurlbut, and A. Mauro, *Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation*. J Cell Biol, 1972. **54**(1): p. 30-8.
277. Erickson, J.D., L.E. Eiden, and B.J. Hoffman, *Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10993-7.
278. Erickson, J.D. and L.E. Eiden, *Functional identification and molecular cloning of a human brain vesicle monoamine transporter*. J Neurochem, 1993. **61**(6): p. 2314-7.
279. Saier, M.H., Jr., et al., *The major facilitator superfamily*. J Mol Microbiol Biotechnol, 1999. **1**(2): p. 257-79.

280. Yan, N., *Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters*. Annu Rev Biophys, 2015. **44**: p. 257-83.
281. Paulsen, I.T., M.H. Brown, and R.A. Skurray, *Proton-dependent multidrug efflux systems*. Microbiol Rev, 1996. **60**(4): p. 575-608.
282. Krantz, D.E., et al., *Phosphorylation of a vesicular monoamine transporter by casein kinase II*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6752-9.
283. Torres, B. and A.E. Ruoho, *N-terminus regulation of VMAT2 mediates methamphetamine-stimulated efflux*. Neuroscience, 2014. **259**: p. 194-202.
284. Fei, H., et al., *Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters*. Traffic, 2008. **9**(9): p. 1425-36.
285. Waites, C.L., et al., *An acidic motif retains vesicular monoamine transporter 2 on large dense core vesicles*. J Cell Biol, 2001. **152**(6): p. 1159-68.
286. Nirenberg, M.J., et al., *The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8773-7.
287. Nirenberg, M.J., et al., *Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine*. J Neurosci, 1996. **16**(13): p. 4135-45.
288. Nirenberg, M.J., et al., *Vesicular monoamine transporter-2: immunogold localization in striatal axons and terminals*. Synapse, 1997. **26**(2): p. 194-8.
289. Yao, J. and L.B. Hersh, *The vesicular monoamine transporter 2 contains trafficking signals in both its N-glycosylation and C-terminal domains*. J Neurochem, 2007. **100**(5): p. 1387-96.
290. Cartier, E.A., et al., *A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 1957-66.
291. Requena, D.F., et al., *The molecular chaperone Hsc70 interacts with the vesicular monoamine transporter-2*. J Neurochem, 2009. **110**(2): p. 581-94.
292. Floor, E. and L. Meng, *Amphetamine releases dopamine from synaptic vesicles by dual mechanisms*. Neurosci Lett, 1996. **215**(1): p. 53-6.
293. Chu, P.W., et al., *Methamphetamine alters vesicular monoamine transporter-2 function and potassium-stimulated dopamine release*. J Neurochem, 2010. **115**(2): p. 325-32.
294. Brown, J.M., G.R. Hanson, and A.E. Fleckenstein, *Methamphetamine rapidly decreases vesicular dopamine uptake*. J Neurochem, 2000. **74**(5): p. 2221-3.
295. Pletscher, A., *Effect of neuroleptics and other drugs on monoamine uptake by membranes of adrenal chromaffin granules*. Br J Pharmacol, 1977. **59**(3): p. 419-24.
296. Frank, S. and J. Jankovic, *Advances in the pharmacological management of Huntington's disease*. Drugs, 2010. **70**(5): p. 561-71.
297. Ruyter, C.M., et al., *Investigation of the Alkaloid Content of Rauwolfia serpentina Roots from Regenerated Plants*. Planta Med, 1991. **57**(4): p. 328-30.

298. Weaver, J.A. and J.D. Deupree, *Conditions required for reserpine binding to the catecholamine transporter on chromaffin granule ghosts*. Eur J Pharmacol, 1982. **80**(4): p. 437-8.
299. Scherman, D. and J.P. Henry, *Reserpine binding to bovine chromaffin granule membranes. Characterization and comparison with dihydrotetabenazine binding*. Mol Pharmacol, 1984. **25**(1): p. 113-22.
300. Rudnick, G., et al., *Energetics of reserpine binding and occlusion by the chromaffin granule biogenic amine transporter*. Biochemistry, 1990. **29**(3): p. 603-8.
301. Varoqui, H. and J.D. Erickson, *Vesicular neurotransmitter transporters. Potential sites for the regulation of synaptic function*. Mol Neurobiol, 1997. **15**(2): p. 165-91.
302. Hong, B., et al., *Reserpine Inhibit the JB6 P+ Cell Transformation Through Epigenetic Reactivation of Nrf2-Mediated Anti-oxidative Stress Pathway*. AAPS J, 2016. **18**(3): p. 659-69.
303. Parsons, S.M., *Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2423-34.
304. Knoth, J., M. Zallakian, and D. Njus, *Stoichiometry of H⁺-linked dopamine transport in chromaffin granule ghosts*. Biochemistry, 1981. **20**(23): p. 6625-9.
305. Darchen, F., D. Scherman, and J.P. Henry, *Reserpine binding to chromaffin granules suggests the existence of two conformations of the monoamine transporter*. Biochemistry, 1989. **28**(4): p. 1692-7.
306. Henry, J.P., et al., *Molecular pharmacology of the vesicular monoamine transporter*. Adv Pharmacol, 1998. **42**: p. 236-9.
307. Yaffe, D., L.R. Forrest, and S. Schuldiner, *The ins and outs of vesicular monoamine transporters*. J Gen Physiol, 2018. **150**(5): p. 671-682.
308. Yaffe, D., et al., *Emulating proton-induced conformational changes in the vesicular monoamine transporter VMAT2 by mutagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(47): p. E7390-E7398.
309. Hayyan, M., M.A. Hashim, and I.M. AlNashef, *Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications*. Chem Rev, 2016. **116**(5): p. 3029-85.
310. Strengert, M., et al., *Mucosal reactive oxygen species are required for antiviral response: role of Duox in influenza a virus infection*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(17): p. 2695-709.
311. Soucy-Faulkner, A., et al., *Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression*. PLoS Pathog, 2010. **6**(6): p. e1000930.
312. Narayanan, A., et al., *Reactive oxygen species activate NFkappaB (p65) and p53 and induce apoptosis in RVFV infected liver cells*. Virology, 2014. **449**: p. 270-86.
313. Kim, H.J., et al., *Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-lambda regulation in human nasal epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **49**(5): p. 855-65.
314. Winterbourn, C.C. and M.B. Hampton, *Thiol chemistry and specificity in redox signaling*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(5): p. 549-61.

315. Day, R.M. and Y.J. Suzuki, *Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione*. Dose Response, 2006. **3**(3): p. 425-42.
316. Moi, P., et al., *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9926-30.
317. Kim, J. and Y.S. Keum, *NRF2, a Key Regulator of Antioxidants with Two Faces towards Cancer*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 2746457.
318. Kobayashi, M., et al., *The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(2): p. 493-502.
319. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
320. Kobayashi, A., et al., *Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7130-9.
321. Kobayashi, A., et al., *Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(1): p. 221-9.
322. Cho, H.Y., et al., *Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(3): p. 325-43.
323. Das, B.N., Y.W. Kim, and Y.S. Keum, *Mechanisms of Nrf2/Keap1-dependent phase II cytoprotective and detoxifying gene expression and potential cellular targets of chemopreventive isothiocyanates*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 839409.
324. Jin, C.H., et al., *Isoegomaketone Upregulates Heme Oxygenase-1 in RAW264.7 Cells via ROS/p38 MAPK/Nrf2 Pathway*. Biomol Ther (Seoul), 2016. **24**(5): p. 510-6.
325. Solis, W.A., et al., *Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(9): p. 1739-54.
326. Lee, C., *Therapeutic Modulation of Virus-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-Dependent Antioxidative Pathway*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 6208067.
327. Reddy, P.V., et al., *HIV-1 gp120 induces antioxidant response element-mediated expression in primary astrocytes: role in HIV associated neurocognitive disorder*. Neurochem Int, 2012. **61**(5): p. 807-14.
328. Reddy, P.V., et al., *Inhibition of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 exacerbates HIV-1 gp120-induced oxidative and inflammatory response: role in HIV associated neurocognitive disorder*. Neurochem Res, 2012. **37**(8): p. 1697-706.
329. Paracha, U.Z., et al., *Oxidative stress and hepatitis C virus*. Virol J, 2013. **10**: p. 251.

330. Lee, Y.H., et al., *Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model*. *Virus Res*, 2013. **178**(2): p. 411-22.
331. Kalinowska, M., et al., *Decreased IL-7 responsiveness is related to oxidative stress in HIV disease*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e58764.
332. Isaguliant, M., et al., *Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization*. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. **9**(10): p. 2111-9.
333. Ibeh, B.O. and I.K. Emeka-Nwabunnia, *Increased oxidative stress condition found in different stages of HIV disease in patients undergoing antiretroviral therapy in Umuahia (Nigeria)*. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012. **34**(6): p. 1060-6.
334. Hagen, T.M., et al., *Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12808-12.
335. Rehmann, B. and M. Nascimbeni, *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(3): p. 215-29.
336. Imai, Y., et al., *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury*. *Cell*, 2008. **133**(2): p. 235-49.
337. Garofalo, R.P., D. Kolli, and A. Casola, *Respiratory syncytial virus infection: mechanisms of redox control and novel therapeutic opportunities*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(2): p. 186-217.
338. Cho, H.Y., et al., *Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(2): p. 138-50.
339. Lee, J., et al., *Upregulation of Nrf2 expression by human cytomegalovirus infection protects host cells from oxidative stress*. *J Gen Virol*, 2013. **94**(Pt 7): p. 1658-68.
340. Komaravelli, N., et al., *Respiratory syncytial virus induces NRF2 degradation through a promyelocytic leukemia protein - ring finger protein 4 dependent pathway*. *Free Radic Biol Med*, 2017. **113**: p. 494-504.
341. Kosmider, B., et al., *Nrf2 protects human alveolar epithelial cells against injury induced by influenza A virus*. *Respir Res*, 2012. **13**: p. 43.
342. Gjyshi, O., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces Nrf2 during de novo infection of endothelial cells to create a microenvironment conducive to infection*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(10): p. e1004460.
343. Liu, B., et al., *Hepatitis B virus stimulates G6PD expression through HBx-mediated Nrf2 activation*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1980.
344. Cheng, Y.L., et al., *Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A, which enhances TNF-alpha production by mononuclear phagocytes*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 32000.
345. Burdette, D., M. Olivarez, and G. Waris, *Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 3): p. 681-690.

346. Hosakote, Y.M., et al., *Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(11): p. 1550-60.
347. Carvajal-Yepes, M., et al., *Hepatitis C virus impairs the induction of cytoprotective Nrf2 target genes by delocalization of small Maf proteins*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 8941-51.
348. Davinelli, S., et al., *Altered expression pattern of Nrf2/HO-1 axis during accelerated-senescence in HIV-1 transgenic rat*. Biogerontology, 2014. **15**(5): p. 449-61.
349. Fan, X., et al., *Activating the Nrf2-mediated antioxidant response element restores barrier function in the alveolar epithelium of HIV-1 transgenic rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(3): p. L267-77.
350. Peiffer, K.H., et al., *Intracellular accumulation of subviral HBsAg particles and diminished Nrf2 activation in HBV genotype G expressing cells lead to an increased ROI level*. J Hepatol, 2015. **62**(4): p. 791-8.
351. Staitieh, B.S., et al., *HIV-1 decreases Nrf2/ARE activity and phagocytic function in alveolar macrophages*. J Leukoc Biol, 2017. **102**(2): p. 517-525.
352. Olagnier, D., et al., *Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004566.
353. Chen, W.C., et al., *Lucidone suppresses dengue viral replication through the induction of heme oxygenase-1*. Virulence, 2018. **9**(1): p. 588-603.
354. Tseng, C.K., et al., *Celastrol inhibits hepatitis C virus replication by upregulating heme oxygenase-1 via the JNK MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells*. Antiviral Res, 2017. **146**: p. 191-200.
355. Yu, C.Y., et al., *Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity*. PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002780.
356. Schaefer, S., *Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 14-21.
357. Mavilia, M.G. and G.Y. Wu, *HBV-HCV Coinfection: Viral Interactions, Management, and Viral Reactivation*. J Clin Transl Hepatol, 2018. **6**(3): p. 296-305.
358. World Health Organization, 2018, *Hepatitis B* <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
359. Gerlich, W.H., *Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now*. Virol J, 2013. **10**(1): p. 239.
360. Shepard, C.W., et al., *Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination*. Epidemiol Rev, 2006. **28**: p. 112-25.
361. Shiffman, M.L., *Management of acute hepatitis B*. Clin Liver Dis, 2010. **14**(1): p. 75-91; viii-ix.
362. Glebe, D. and S. Urban, *Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 22-38.
363. McMahon, B.J., et al., *Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state*. J Infect Dis, 1985. **151**(4): p. 599-603.

364. McMahon, B.J., *Chronic hepatitis B virus infection*. Med Clin North Am, 2014. **98**(1): p. 39-54.
365. Desmet, V.J., et al., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
366. Norder, H., et al., *Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes*. Intervirology, 2004. **47**(6): p. 289-309.
367. Sunbul, M., *Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(18): p. 5427-34.
368. Fujiwara, K., et al., *Distribution of HBV genotypes among HBV carriers in Benin: phylogenetic analysis and virological characteristics of HBV genotype E*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(41): p. 6410-5.
369. Gerlich, W.H. and W.S. Robinson, *Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand*. Cell, 1980. **21**(3): p. 801-9.
370. Seeger, C. and W.S. Mason, *Molecular biology of hepatitis B virus infection*. Virology, 2015. **479-480**: p. 672-86.
371. Grimm, D., R. Thimme, and H.E. Blum, *HBV life cycle and novel drug targets*. Hepatol Int, 2011. **5**(2): p. 644-53.
372. Lee, A.T. and C.G. Lee, *Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma--the etiopathogenic link*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 234-45.
373. Glebe, D. and C.M. Bremer, *The molecular virology of hepatitis B virus*. Semin Liver Dis, 2013. **33**(2): p. 103-12.
374. Bruss, V., *Hepatitis B virus morphogenesis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(1): p. 65-73.
375. Vanlandschoot, P. and G. Leroux-Roels, *Viral apoptotic mimicry: an immune evasion strategy developed by the hepatitis B virus?* Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 144-7.
376. Diab, A., et al., *The diverse functions of the hepatitis B core/capsid protein (HBc) in the viral life cycle: Implications for the development of HBc-targeting antivirals*. Antiviral Res, 2018. **149**: p. 211-220.
377. Verrier, E.R., C. Schuster, and T.F. Baumert, *Advancing hepatitis B virus entry inhibitors*. J Hepatol, 2017. **66**(4): p. 677-679.
378. Henkler, F., et al., *Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 4): p. 871-82.
379. Kumar, V. and D.P. Sarkar, *Hepatitis B Virus X Protein: Structure-Function Relationships and Role in Viral Pathogenesis*. 2004. **166**: p. 377-407.
380. Chaturvedi, V.K., et al., *Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma*. Microb Pathog, 2019. **128**: p. 184-194.
381. Clark, D.N. and J. Hu, *Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies*. Future Virol, 2015. **10**(3): p. 283-295.
382. Kaito, M., et al., *The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus*. Med Mol Morphol, 2006. **39**(3): p. 136-45.
383. Chai, N., et al., *Properties of subviral particles of hepatitis B virus*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7812-7.

384. Tan, W.S. and K.L. Ho, *Phage display creates innovative applications to combat hepatitis B virus*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(33): p. 11650-70.
385. Leistner, C.M., S. Gruen-Bernhard, and D. Glebe, *Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus*. Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 122-33.
386. Yan, H., et al., *NTCP opens the door for hepatitis B virus infection*. Antiviral Res, 2015. **121**: p. 24-30.
387. Urban, S., et al., *The replication cycle of hepatitis B virus*. J Hepatol, 2010. **52**(2): p. 282-4.
388. Nassal, M., *Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way*. Virus Res, 2008. **134**(1-2): p. 235-49.
389. Levrero, M., et al., *Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection*. J Hepatol, 2009. **51**(3): p. 581-92.
390. Ganem, D. and A.M. Prince, *Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1118-29.
391. Knaus, T. and M. Nassal, *The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(17): p. 3967-75.
392. Tu, T., et al., *HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications*. Viruses, 2017. **9**(4).
393. Inoue, T. and Y. Tanaka, *Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update*. Microb Cell, 2016. **3**(9): p. 420-437.
394. Sandhu, P., et al., *Hepatitis B Virus Immunopathology, Model Systems, and Current Therapies*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**.
395. Chang, C.M., et al., *Production of hepatitis B virus in vitro by transient expression of cloned HBV DNA in a hepatoma cell line*. EMBO J, 1987. **6**(3): p. 675-80.
396. Sells, M.A., M.L. Chen, and G. Acs, *Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(4): p. 1005-1009.
397. Hantz, O., et al., *Persistence of the hepatitis B virus covalently closed circular DNA in HepaRG human hepatocyte-like cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 127-35.
398. Ladner, S.K., et al., *Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997. **41**(8): p. 1715-1720.
399. Ni, Y., et al., *Hepatitis B and D Viruses Exploit Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide for Species-Specific Entry into Hepatocytes*. Gastroenterology, 2014. **146**(4): p. 1070-1083.e6.
400. Wieland, S.F., *The Chimpanzee Model for Hepatitis B Virus Infection*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2015. **5**(6): p. a021469-a021469.
401. Dienstag, J.L., H. Popper, and R.H. Purcell, *The pathology of viral hepatitis types A and B in chimpanzees. A comparison*. Am J Pathol, 1976. **85**(1): p. 131-48.
402. Li, H., et al., *HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP*. Cellular & Molecular Immunology, 2014. **11**(2): p. 175-183.

403. Larkin, J., et al., *Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease*. *Nature Medicine*, 1999. **5**(8): p. 907-912.
404. Dandri, M., et al., *Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus*. *Hepatology*, 2001. **33**(4): p. 981-8.
405. Lavanchy, D., *Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention*. *J Clin Virol*, 2005. **34 Suppl 1**: p. S1-3.
406. Liaw, Y.F. and C.M. Chu, *Hepatitis B virus infection*. *Lancet*, 2009. **373**(9663): p. 582-92.
407. Lok, A.S. and B.J. McMahon, *Chronic hepatitis B*. *Hepatology*, 2007. **45**(2): p. 507-39.
408. Gish, R.G., et al., *Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities*. *Antiviral Res*, 2015. **121**: p. 47-58.
409. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. *J Gen Virol*, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
410. Craxi, A. and W.G. Cooksley, *Pegylated interferons for chronic hepatitis B*. *Antiviral Res*, 2003. **60**(2): p. 87-9.
411. Terrault, N.A., et al., *Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance*. *Hepatology*, 2018. **67**(4): p. 1560-1599.
412. Stein, L.L. and R. Loomba, *Drug targets in hepatitis B virus infection*. *Infect Disord Drug Targets*, 2009. **9**(2): p. 105-16.
413. Tacke, F. and D.C. Kroy, *Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance*. *Ann Transl Med*, 2016. **4**(18): p. 334.
414. Tuttleman, J.S., C. Pourcel, and J. Summers, *Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells*. *Cell*, 1986. **47**(3): p. 451-60.
415. Wu, T.T., et al., *In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway*. *Virology*, 1990. **175**(1): p. 255-61.
416. Newbold, J.E., et al., *The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes*. *J Virol*, 1995. **69**(6): p. 3350-7.
417. Chang, J. and J.T. Guo, *Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure*. *Antiviral Res*, 2015. **121**: p. 152-9.
418. Zhang, F. and G. Wang, *A review of non-nucleoside anti-hepatitis B virus agents*. *Eur J Med Chem*, 2014. **75**: p. 267-81.
419. Pei, Y., et al., *Past, Current, and Future Developments of Therapeutic Agents for Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection*. *J Med Chem*, 2017. **60**(15): p. 6461-6479.
420. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Hepatitis B Vaccine (Recombinant)*. 2018]; Available from:

<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm094041.htm>.

421. Manzoor, S., et al., *Hepatitis B virus therapy: What's the future holding for us?* World J Gastroenterol, 2015. **21**(44): p. 12558-75.
422. Blank, A., et al., *First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B*. J Hepatol, 2016. **65**(3): p. 483-9.
423. Tang, L., et al., *The current status and future directions of hepatitis B antiviral drug discovery*. Expert Opin Drug Discov, 2017. **12**(1): p. 5-15.
424. Wu, G., et al., *Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(11): p. 5344-54.
425. Qiu, Z., et al., *Design and Synthesis of Orally Bioavailable 4-Methyl Heteroaryldihydropyrimidine Based Hepatitis B Virus (HBV) Capsid Inhibitors*. J Med Chem, 2016. **59**(16): p. 7651-66.
426. Simanjuntak, Y., et al., *Repurposing of prochlorperazine for use against dengue virus infection*. J Infect Dis, 2015. **211**(3): p. 394-404.
427. Li, Y.F., et al., *Synthesis and anti-hepatitis B virus activity of novel benzimidazole derivatives*. J Med Chem, 2006. **49**(15): p. 4790-4.
428. Lougiakis, N., et al., *Novel nucleoside analogues targeting HCV replication through an NS5A-dependent inhibition mechanism*. Chem Biol Drug Des, 2017. **90**(3): p. 352-367.
429. Lougiakis, N., et al., *Design and synthesis of purine analogues as highly specific ligands for FcyB, a ubiquitous fungal nucleobase transporter*. Bioorg Med Chem, 2016. **24**(22): p. 5941-5952.
430. Michailidou, M., et al., *Novel pyrazolopyridine derivatives as potential angiogenesis inhibitors: Synthesis, biological evaluation and transcriptome-based mechanistic analysis*. Eur J Med Chem, 2016. **121**: p. 143-157.
431. Scaturro, P., et al., *Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins*. PLoS Pathog, 2015. **11**(11): p. e1005277.
432. Dufner-Beattie, J., et al., *Identification of AP80978, a novel small-molecule inhibitor of hepatitis C virus replication that targets NS4B*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(6): p. 3399-410.
433. Kalantzis, E.D., A. Scorilas, and D. Vassilacopoulou, *Evidence for L-Dopa Decarboxylase Involvement in Cancer Cell Cytotoxicity Induced by Docetaxel and Mitoxantrone*. Curr Pharm Biotechnol, 2018. **19**(13): p. 1087-1096.
434. Siaterli, M.Z., D. Vassilacopoulou, and E.G. Fragoulis, *Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase*. Neurochem Res, 2003. **28**(6): p. 797-803.
435. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
436. Tang, L., et al., *DNA Polymerase alpha is essential for intracellular amplification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA*. PLoS Pathog, 2019. **15**(4): p. e1007742.

437. Cai, D., et al., *Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(8): p. 4277-88.
438. Smith, J.L., et al., *Inhibition of dengue virus replication by a class of small-molecule compounds that antagonize dopamine receptor d4 and downstream mitogen-activated protein kinase signaling*. *J Virol*, 2014. **88**(10): p. 5533-42.
439. Walther, D.J., et al., *Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet α 1-Granule Release*. *Cell*, 2003. **115**(7): p. 851-862.
440. Farrelly, L.A., et al., *Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3*. *Nature*, 2019. **567**(7749): p. 535-539.
441. Lepack, A.E., et al., *Dopaminylation of histone H3 in ventral tegmental area regulates cocaine seeking*. *Science*, 2020. **368**(6487): p. 197-201.
442. Frakolaki, E., et al., *The Role of Tissue Oxygen Tension in Dengue Virus Replication*. *Cells*, 2018. **7**(12).
443. Schoggins, J.W., et al., *A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response*. *Nature*, 2011. **472**(7344): p. 481-5.
444. Yao, J., J.D. Erickson, and L.B. Hersh, *Protein kinase A affects trafficking of the vesicular monoamine transporters in PC12 cells*. *Traffic*, 2004. **5**(12): p. 1006-16.
445. Wong, W.K., et al., *Activation of human monoamine oxidase B gene expression by a protein kinase C MAPK signal transduction pathway involves c-Jun and Egr-1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22222-30.
446. Waymire, J.C. and J.W. Haycock, *Lack of regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in intact bovine chromaffin cells*. *J Neurochem*, 2002. **81**(3): p. 589-93.
447. Noppakunmongkolchai, W., et al., *Inhibition of protein kinase C promotes dengue virus replication*. *Virol J*, 2016. **13**: p. 35.
448. Zhao, H., et al., *Inhibition of monoamine oxidase A promotes secretory differentiation in basal prostatic epithelial cells*. *Differentiation*, 2008. **76**(7): p. 820-30.
449. Wessel, T.C. and T.H. Joh, *Parallel upregulation of catecholamine-synthesizing enzymes in rat brain and adrenal gland: effects of reserpine and correlation with immediate early gene expression*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992. **15**(3-4): p. 349-60.
450. Yang, H.C. and J.H. Kao, *Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance*. *Emerg Microbes Infect*, 2014. **3**(9): p. e64.
451. Xu, Y.B., et al., *Benzimidazole derivative, BM601, a novel inhibitor of hepatitis B virus and HBsAg secretion*. *Antiviral Res*, 2014. **107**: p. 6-15.
452. Tan, G., et al., *When Hepatitis B Virus Meets Interferons*. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 1611.
453. Tsuge, M., et al., *Development of a Novel Site-Specific Pegylated Interferon Beta for Antiviral Therapy of Chronic Hepatitis B Virus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017. **61**(6).

454. Xie, Q.L., et al., *The Efficacy and Safety of Entecavir and Interferon Combination Therapy for Chronic Hepatitis B Virus Infection: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132219.
455. Delaney, W.E.t., et al., *Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(7): p. 2471-7.
456. Cihlar, T., et al., *Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors*. Antiviral Res, 2002. **54**(1): p. 37-45.