ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ $MAPK_S$ – ERK_S ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ HCV ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Μελέτη της τροποποίησης της σηματοδότησης των MAPKs – ERKs παρουσία των HCV δομικών πρωτεϊνών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ο. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ Ερευνήτρια Β΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ο. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ Ερευνήτρια Β΄, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
Κ. ΛΙΑΔΑΚΗ Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

‘Μελέτη της τροποποίησης της σηματοδότησης των MAPKs – ERKs παρουσία των HCV δομικών πρωτεϊνών’

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ $MAPK_S$ – ERK_S ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ HCV ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων : 19
Συνολικός αριθμός σελίδων : 165
Συνολικός αριθμός εικόνων : 92
Συνολικός αριθμός παραρτημάτων : 2
Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών : 289

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) ταυτοποιήθηκε το 1989 και υπάρχουν παγκοσμίως περίπου 170 εκατομμύρια φορείς του ιού. Ποσοστό που κυμαίνεται στο 80 με 85% καταλήγει σε χρόνια ηπατίτιδα και από αυτούς, το 20% αναπτύσσει κίρρωση του ήπατος. Ετησίως το 3-5% των κιρρωτικών ασθενών καταλήγει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Η θεραπεία βασίζεται στην ταυτόχρονη χορήγηση πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-α και ριμπαβιρίνης, αλλά ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία.

Ο HCV ανήκει στο γένος των Hepacivirus, στην οικογένεια των φλαβιιών (flaviviridae). Το ιικό του γονιδίωμα συνίσταται σε ένα μονόκλωνο, θετικής πολικότητας RNA μόριο μήκους 9,6 Kb το οποίο κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μήκους περίπου 3000 αμινοξέων η οποία πρωτεολύεται με την βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών σε τουλάχιστον τρία δομικά (core, E1, E2) και επτά μη δομικά πολυπεπτίδια (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Από αυτές τις πρωτεΐνες η core είναι υπεύθυνη, μεταξύ άλλων, για την δημιουργία του καψιδίου, ενώ οι πρωτεΐνες E1 και E2 σχηματίζουν τον φάκελο του ιού.

Στον ορό των ασθενών είναι κοινώς αποδεκτή η ύπαρξη καψιδίων όχι μόνο με φάκελο αλλά και χωρίς, των οποίων ο ρόλος παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών, μέσω των οποίων επιτεύχθηκε απομόνωση γυμνών core καψιδίων με ή χωρίς την ιδιότητα του φθορισμού. Ακολούθησε λεπτομερής μελέτη για τον χαρακτηρισμό των κατασκευασθέντων καψιδίων με την οποία αποδείχτηκε η λειτουργικότητα τους. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο τρόπος εισόδου τους σε κύτταρα, κυρίως ηπατικής προέλευσης, και αποδείχτηκε ότι τα καψίδια χρησιμοποιούν την ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης για να εισχωρήσουν στο κύτταρο-ξενιστή και να φτάσουν στα πρώιμα και όψιμα ενδοσώματα και τελικά στα λυσοσώματα. Επιπλέον, αποδείχτηκε πως κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης πορείας εμπλέκονται το χαμηλό pH, οι καθεψίνες B και L καθώς και διάφορες φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες όπως η p38, οι $ERK_{1/2}$ και διαφόρων ειδών φωσφατάσες.

Στη συνέχεια, τα γυμνά core καψίδια που απομονώθηκαν επωάστηκαν εξωγενώς με διάφορα είδη κυττάρων και μελετήθηκε η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPKs και ειδικότερα τα μονοπάτια των $ERK_{1/2}$ και ERK5. Παρατηρήθηκε πως ενεργοποιούν και τα δυο μονοπάτια, φωσφορυλιώνοντας τις ανάλογες πρωτεΐνες, μετά από επώαση τριάντα λεπτών. Το φαινόμενο αυτό είναι ποσοτικά εξαρτώμενο ενώ οι μάρτυρες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφάνισαν καμία ενεργοποίηση. Με τη χρήση διαλυτής core ή GFP πρωτεΐνης, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, καθώς και με τη χρήση διαφόρων χημικών αναστολέων, δεν ενεργοποιήθηκε κανένα από τα δύο μονοπάτια υποδηλώνοντας τη σημασία της καψιδιακής δομής και της διαδικασίας εισόδου του καψιδίου.

Ακολούθησε, μελέτη για τον κυτταρικό εντοπισμό των $ERK_{1/2}$ και ERK5 φωσφο-πρωτεϊνών, καθώς και της ιδιότητας ενεργοποίησης χαρακτηριστικών καθοδικών στόχων. Τα core καψίδια προκαλούν την πυρηνική μετατόπιση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών, επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1*. Επιπλέον, αποδείχτηκε πως η παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγούσε στην σταθεροποίηση της πρωτεΐνης c-Fos. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε πυρηνική μετακίνηση ή παρατεταμένη φωσφορυλίωση της ERK5 πρωτεΐνης, και επομένως η παρατηρούμενη ενεργοποίηση του γονιδίου *mef2,* γνωστού καθοδικού στόχου του μονοπατιού, φαίνεται να επιτυγχάνεται με έμμεσο τρόπο.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων στο σύνολό τους αποτελούν σημαντική συμβολή στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας που είναι πιθανό να διέπουν την λοίμωξη από τον ιό.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Στη μαμά μου και στο Γιάννη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ηπατίτιδα C αποτελεί ένα σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Η αναγνώριση του ιού της ηπατίτιδας C ως αιτιολογικού παράγοντα της μη-A, μη-B ηπατίτιδας υπήρξε ένα από τα σημαντικότερα σύγχρονα επιτεύγματα στον τομέα των ιογενών λοιμώξεων.

Η παρούσα διατριβή με θέμα 'Μελέτη της τροποποίησης των MAPKs-ERKs παρουσία των HCV δομικών πρωτεϊνών' εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ υπό την επίβλεψη της ερευνήτριας Β' Δρ. Ουρανίας Γεωργοπούλου, κατά το χρονικό διάστημα 2006-2009. Πέρα από την προσωπική μου προσπάθεια, για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διατριβής ιδιαίτερα σημαντική υπήρξε η συμβολή ανθρώπων οι οποίοι με στήριξαν και τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη μου Δρ. Ουρανία Γεωργοπούλου, για την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και τη συμπαράσταση που μου έδειξε, καθώς και την υπομονή της στις ατελείωτες 'τρελές' πειραματικές μου ιδέες και θεωρίες.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δρ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο για τη συμβολή και την καθοδήγηση του, καθώς και το τρίτο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δρ. Ζήση Μαμούρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Γ' του τμήματος Βιοχημείας Δρ. Λάβδα Αλέξανδρο με τον οποίο συνεργαστήκαμε σε κλίμα που περιελάμβανε πολύ δουλειά αλλά και πολύ χιούμορ. Ευχαριστώ επίσης τους Δρ. Μάριο Ζουριδάκη και Δρ. Κώστα Λαζαρίδη για την πολύτιμη βοήθεια τους σε 'κρίσιμες' στιγμές της παρούσας εργασίας, καθώς και την Δρ. Πέλλη Φωκά για τις ατελείωτες, βραδινές συνήθως, επιστημονικές συζητήσεις μας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει επίσης και στην Δρ. Τσίτουρα Παναγιώτα για την σημαντική τεχνική κατάρτιση και καθοδήγηση που απλόχερα μου προσέφερε.

Ευχαριστώ την υπεύθυνη του εργαστηρίου ερευνήτρια Α', Δρ. Μαυρομαρά Πηνελόπη και όλα τα μέλη του εργαστηρίου (Στεφανή Άικερ, Ελίνα Ασλάνογλου, Νίκη Βασιλάκη, Δωροθέα Καζάζη, Θάνο Κακκανά, Κατερίνα Καλλιαμπάκου, Ρανία Καντζίπα, Ειρήνη Καραμιχάλη, Ιόλη Κόττα-Λοΐζου, Βλάση Κουβάτση, Μάνο Κοχλιό, Γιώργο Πίσσα, Ελισάβετ Σέρτη, Ελίζα Τσιτούρα, Devrim Oz-Arslan) για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

συνεργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Νταλαγιώργου Τζίνα, Boumlic Anissa και Καραμήτρο Τίμο για τη βοήθεια, τη φιλία τους και κυρίως την συμπαράσταση τους.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιάννη που ήταν πάντα δίπλα μου και με στήριζε στα δύσκολα, και τη μαμά μου που χωρίς την αγάπη και την υποστήριξη της τίποτα από αυτό που είμαι δεν θα υπήρχε.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1
1. ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV) 2
1.1. ΓΕΝΙΚΑ 2
1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ 2
1.1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ 2
1.1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ 3
1.1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 3
1.1.5. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 4
1.1.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ 5
1.1.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ 5
1.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΟΛΟΓΙΑ 6
1.2.1.ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C 6
1.2.2. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ 6
1.2.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ HCV 7
1.2.3.1. Δομικές πρωτεΐνες του ιού 7
1.2.3.1.1. Καψιδιακή πρωτεΐνη core 7
1.2.3.1.2. E1 και E2 9
1.2.3.1.3. p7 9
1.2.3.2. Μη δομικές πρωτεΐνες 9
1.2.3.2.1. NS2-3 9
1.2.3.2.2. Σύμπλεγμα NS3-4A 10
1.2.3.2.3. NS4B 10
1.2.3.2.4. NS5A 11
1.2.3.2.5. NS5B 12
1.2.3.2.6. ARFP/F/core+1 12
1.2.4. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ 13
1.2.5. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ 13
1.2.6. ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ 14
1.2.7. ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ, ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ 15

2. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ 16
2.1.ΓΕΝΙΚΑ 16
2.2. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΚΛΑΘΡΙΝΗΣ 16
2.2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ 16
2.2.2. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ 17
2.2.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΚΑΛΥΜΜΑ ΚΛΑΘΡΙΝΗΣ 17
2.2.4. ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗ 18
2.3. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ 18
2.4. ΜΑΚΡΟΠΙΝΟΚΥΤΩΣΗ 19
2.5. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΧΩΡΙΣ ΚΛΑΘΡΙΝΗ Η ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ 19
2.6. ΠΡΩΙΜΟ ΕΝΔΟΣΩΜΑ 19
2.6.1. RAB5 20
2.6.2. ΚΑΘΕΨΙΝΕΣ B ΚΑΙ L 21
2.7. ΟΨΙΜΟ ΕΝΔΟΣΩΜΑ 21
2.8. ΛΥΣΟΣΩΜΑ 22

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

2.9. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΙΩΝ 22

3. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ 24
3.1. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ 24
3.2. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ 25
3.2.1. EGF 25
3.3. ΜΙΤΟΓΟΝΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ 25
3.3.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ 25
3.3.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ 26
3.3.2.1. Γονίδια πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1* 27
3.3.2.2. $ERK_{1/2}$ και μηχανισμός μετάφρασης 28
3.3.3. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ p38 28
3.3.4. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ JNK 29
3.3.5. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK5 29
3.3.5.1. MEF2 30
3.3.6. ΑΛΛΕΣ ERK ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ 31
3.4. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ 31
3.5. MAPK ΚΑΙ HCV 33

ΣΚΟΠΟΣ 34

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 37
1.ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ 38
2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ 38
3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ 38
4. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ – ΜΟΡΙΑ 'ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ' 39
4.1. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ 39
4.2. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ 39
5. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 40
5.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ 40
5.2. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΑΠΟ ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ 40
5.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΫΠΗΡΧΑΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 40
5.4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΚΑΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 41
6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ 44
7. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ 44
8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 44
9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΖΩΝΗΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 45
10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ 45
11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ 45
12. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ DNA (ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ CIAP) 46
13. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ DNA(ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ KLENOW/T4 ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ) 47
14. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣ ΥΠΟ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA 47

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

15. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ 47
16. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 48
17. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ NI-NTA 48
18. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 48
19. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ 49
20. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ–ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 50
21. ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ 50
22. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ – ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ 51
23. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 52
24. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ 52
25. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD 52
26. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ (LUCIFERASE) 52
27. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ 53
28. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS – ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ 54
29. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ 54
30. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΥΠΟΥ WESTERN (WESTERN BLOT 55
31. ΕΠΑΝΑΫΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ ΑΛΛΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ 55
32. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ 55
33. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ 56
34. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ 56
35. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 58
35.1. ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΤΟΜΩΝ 58
35.2. ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ 59
36. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ (ORTHOELISA) 59
37. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 59
38. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ 60
39. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ 60
40. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (LIVE-MICROSCOPY) 60
41. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ 61
42. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ RNA 61
43. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ 62
44. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΜΟ 62
45. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 62
46. ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ (SOFTWARES) 62

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 64
1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΨΙΔΙΩΝ HCV ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΜΕ Η ΧΩΡΙΣ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΤΗΝ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ GFP 65
1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ CORE ΚΑΙ GFP ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΝΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ 65
1.1.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ 65
1.1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ 65
1.1.3. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ 65
1.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ 66
1.3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ 66

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1.3.1. ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ E64 ΚΑΙ ΠΕΠΣΤΑΤΙΝΗ Α 67
1.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΓΥΜΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 68
1.4.1. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ 69
1.4.2. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ 70
1.4.3. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ 71
1.4.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ 71
1.4.5. ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 73

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 74
2.1. ΠΡΟΣΔΕΣΗ-ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ 74
2.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 75
2.3. ΕΙΣΟΔΟΣ ΧΩΡΙΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 76
2.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ CORE ΚΑΙ CORE ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΤΗ GFP ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 77
2.5. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 79

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ 80
3.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ 80
3.1.1. ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ 80
3.1.2. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 81
3.1.3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 82
3.2. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ RAB5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ 83
3.3. ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ 83
3.3.1. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΟΨΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ 84
3.3.2. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 84
3.3.3. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ 85
3.3.4. ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗΣ ΣΕ HEPG2 ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ 86
3.4. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ 87
3.5. ΠΙΘΑΝΗ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ 87
3.6. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ 88
3.6.1. ΜΙΚΡΟΪΝΙΔΙΑ ΑΚΤΙΝΗΣ 88
3.6.2. ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΙΣΚΟΙ 88
3.7. pH-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ 91
3.8. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΘΕΨΙΝΕΣ B ΚΑΙ L 92
3.9. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΗΝ ΚΛΑΘΡΙΝΗ 93
3.10. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΔΕΝ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΗΝ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ 94
3.11. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ 95
3.11.1. ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ - ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ 95
3.11.2. ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ – ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ 96
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 97

4. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ 98

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

4.1. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ 98
4.1.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ERK$_{1/2}$ 98
4.1.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ 99
4.1.3. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΜΕΣΩ ΑΝΟΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ MEK$_{1/2}$ 100
4.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ 101
4.3. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ 101
4.4. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ ERK$_{1/2}$ 102
4.5. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΩΙΜΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ *c-fos* ΚΑΙ *egr-1* 103
4.6. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΩΙΜΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ (*c-fos, egr-1*) ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ 104
4.7. ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ 104
4.8. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ERK5 106
4.9. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ERK5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ 106
4.10. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ CORE ΚΑΙ NS5A 107
4.11. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ 108
4.12. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ERK5 ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MEK5 109
4.13. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MEF2 110
4.14.ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ERK5 111
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 112

ΣΥΖΗΤΗΣΗ 113
1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ HCV ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΜΕ Η ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ 114
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ HCV ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ 116

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 124

SUMMARY 138

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ 141
ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ 142
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ 142

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ 143

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Κατάλογος εικόνων της διατριβής :

Εικόνα 1 : Ορόσημα στην έρευνα που αφορά στον ιό της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 2 : Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει όλες τις δημοσιευμένες αλληλουχίες πλήρους μήκους του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 3 : Γεωγραφική κατανομή του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 4 : Τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 5 : Η φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας C και η μεταβλητότητα από άτομο σε άτομο.
Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 7 : Οργάνωση του γονιδιώματος και ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ της δομής της πρωτεΐνης core του ιού HCV και ορισμένων ιδιοτήτων της.
Εικόνα 9 : Δομικά χαρακτηριστικά και επιλεγμένες λειτουργικές περιοχές της HCV NS5A πρωτεΐνης.
Εικόνα 10 : Καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C.
Εικόνα 11 : Τρέχον μοντέλο της εισόδου του ιού της ηπατίτιδας C στα κύτταρα.
Εικόνα 12 : Μοντέλο της παραγωγής μολυσματικού HCV. Η συγκρότηση του ιού λαμβάνει χώρα γύρω από τα λιποσταγονίδια.
Εικόνα 13 : Είδη ενδοκύτωσης.
Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής της κλαθρίνης (clathrin)
Εικόνα 15 : Καβεοσώματα (caveosomes).
Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση ενός πρώιμου ενδοσώματος (early endosome).
Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του GDP σε GTP μέσω της πρωτεΐνης GDI, η λειτουργία της οποίας εξαρτάται από το μονοπάτι σηματοδότησης p38
Εικόνα 18 : Απομονωμένα λυσοσώματα από συκώτι μυός.
Εικόνα 19 : Διαφορετικοί μηχανισμοί εισόδου ιών χωρίς φάκελο στα κύτταρα στόχους.
Εικόνα 20 : Μοντέλα ιών που χρησιμοποιούν τον κυτταρικό σκελετό κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.
Εικόνα 21 : Μονοπάτια σηματοδότησης των μιτογονο-ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών.
Εικόνα 22 : Μονοπάτι σηματοδότησης $ERK_{1/2}$.
Εικόνα 23 : Δομή των πρωτεϊνών ERK2 (A), p38 (B) και JNK2 (Γ) (121-123).
Εικόνα 24 : Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικών στοιχείων των προαγωγέων των γονιδίων πρώιμης απόκρισης (Immediate early genes) *c-fos* και *egr-1*.
Εικόνα 25 : Σηματοδοτικά μονοπάτια p38 και JNK.
Εικόνα 26 : Μονοπάτι σηματοδότησης ERK5.
Εικόνα 27 : 'Τυπικές' και 'άτυπες' MAP κινάσες.
Εικόνα 28 : Οι MAPΚινάσες ενεργοποιούνται κατά την ενδοκύτωση είτε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, είτε στα πρώιμα και όψιμα ενδοσώματα.
Εικόνα 29 : Σχηματική αναπαράσταση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση της κωδικής περιοχής της core πρωτεΐνης
Εικόνα 30 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pEGFP-C1.
Εικόνα 31 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBacPak8.
Εικόνα 32 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pAcSG2
Εικόνα 33 : Παραγωγή αντισωμάτων για την αναγνώριση των πρωτεϊνών core και GFP.
Εικόνα 34 : Έκφραση των πλασμιδίων pHPI 1737, 1742 και 1743 σε BHK κύτταρα.
Εικόνα 35 : Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C και των κατασκευασθέντων βακουλοϊών.
Εικόνα 36 : Έκφραση των κατασκευασθέντων βακουλοϊών σε κύτταρα εντόμων Sf9.
Εικόνα 37 : Μόλυνση HepG2 κυττάρων με τους βακουλοϊούς Bac1737, Bac1742 και Bac1743 και Sf9 κυττάρων με τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740, Bac1741 και Bac 1746.
Εικόνα 38 : Επίδραση των χημικών αναστολέων E64 και Πεπστατίνη A (pepstatin A) στην μόλυνση με τον βακουλοϊό Bac1741.
Εικόνα 39 : Απομόνωση καψιδίων μετά από μόλυνση κυττάρων εντόμων Sf9 με τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740, Bac1741, Bac1432 (core) και Bac1746 (GFP).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Εικόνα 40 : Ανάλυση σε διαβάθμιση πυκνότητας σακχαρόζης εκχυλισμάτων από κύτταρα Sf9 μολυσμένα με τους βακουλοϊούς Bac 1736, Bac1740, Bac1741, Bac1432 και Bac1746.
Εικόνα 41 : Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο των φθοριζόντων καψιδίων.
Εικόνα 42 : Πειράματα δυναμικής σκέδασης του φωτός με κλάσματα που περιέχουν ανασυνδυασμένα καψίδια.
Εικόνα 43 : Επιλεγμένες φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των θετικών κλασμάτων για core και GFP πρωτεΐνες των καψιδίων που προέρχονται από τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740 και Bac1432.
Εικόνα 44 : Μικροσκοπία ατομικής δύναμης για τα καψίδια που προέρχονται από το βακουλοϊό Bac1741.
Εικόνα 45 : Μελέτη της αντιγονικότητας των κατασκευασθέντων φθοριζόντων καψιδίων.
Εικόνα 46 : Ανάλυση της πρόσδεσης και εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα.
Εικόνα 47 : Ανάλυση της πρόσδεσης των καψιδίων σε κυτταρικές σειρές.
Εικόνα 48 : Ανάλυση της εισόδου των καψιδίων από διάφορες 'οπτικές γωνίες' σε Huh7 κύτταρα.
Εικόνα 49 : Είσοδος των φθοριζόντων καψιδίων σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7.
Εικόνα 50 : Συνεντοπισμός των φθοριζόντων καψιδίων 1736, 1740 και 1741 με το core αντίσωμα σε κύτταρα Huh7.
Εικόνα 51 : Κυτταροπλασματική μετατόπιση της πρωτεΐνης GFP-ERF παρουσία των καψιδιων core και 1740.
Εικόνα 52 : Απεικονιστική μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα (live-microscopy) των καψιδίων 1736 και 1740.
Εικόνα 53 : Εντοπισμός των core καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα.
Εικόνα 54 : Εντοπισμός των φθοριζόντων καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα.
Εικόνα 55 : Εντοπισμός των καψιδίων core (α) και 1736 (β) στα πρώιμα ενδοσώματα σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa.
Εικόνα 56 : Εντοπισμός των καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα σε ζωντανά ηπατικά κύτταρα Huh7.
Εικόνα 57 : Εμπλοκή της Rab5 πρωτεΐνης στην ενδοκύτωση των core καψιδίων.
Εικόνα 58 : Εντοπισμός των ενδοσωμάτων στα όψιμα ενδοσώματα.
Εικόνα 59 : Εντοπισμός των ενδοσωμάτων στα όψιμα ενδοσώματα σε ζωντανά Huh7 κύτταρα.
Εικόνα 60 : Εντοπισμός των core καψιδίων στα λυσοσώματα.
Εικόνα 61 : Εντοπισμός των φθοριζόντων καψιδίων στα λυσοσώματα.
Εικόνα 62 : Συνεντοπισμός core καψιδίων με την EEA1 πρωτεΐνη, Rab7 πρωτεΐνη και Lamp2 πρωτεΐνη.
Εικόνα 63 :Πιθανός εντοπισμός των καψιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο.
Εικόνα 64 : Πιθανός εντοπισμός των καψιδίων στα λιποσταγονίδια.
Εικόνα 65 : Μετακίνηση των καψιδίων με την βοήθεια των μικροινιδίων ακτίνης.
Εικόνα 66 : Μετακίνηση των καψιδίων μέσα στα ενδοσώματα με την βοήθεια των μικροσωληνισκων.
Εικόνα 67 : Αναγκαιότητα ακέραιων μικροσωληνίσκων στην μετακίνηση των core καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.
Εικόνα 68 : Ενδοκύτωση pH-εξαρτώμενη.
Εικόνα 69 : Ενδοκύτωση pH-εξαρτώμενη για τα φθορίζοντα καψίδια 1736, 1740 και 1714.
Εικόνα 70 : Εμπλοκή των καθεψινών (cathepsins) B και L στην ενδοκύτωση των core καψιδίων.
Εικόνα 71 : Ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης.
Εικόνα 72 : Τα core καψίδια δεν εισέρχονται με ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης.
Εικόνα 73 : Οι χημικοί αναστολείς ορθοβαναδικό νάτριο και SB202190 επηρεάζουν την είσοδο των καψίδιων.
Εικόνα 74 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης p38 από τα core καψίδια.
Εικόνα 75 : Εμπλοκή κυτταρικών πρωτεϊνών στη μετακίνηση των core καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.
Εικόνα 76 : Κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό των συνθηκών συγχρονισμού των κυττάρων.
Εικόνα 77 : Προσδιορισμός συνθηκών ελάχιστης ενεργοποίησης του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού.
Εικόνα 78 : Ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού σηματοδότησης από core καψίδια σε HepG2, Huh7 και SK-S-NH κύτταρα.
Εικόνα 79 : Ενεργοποίηση του $MEK_{1/2}$ - $ERK_{1/2}$ μονοπατιού η οποία παρουσιάζεται δοσοεξαρτώμενη.
Εικόνα 80 : Μη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ από διαλυτή πρωτεΐνη core βακτηριακής προέλευσης.
Εικόνα 81 : Ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού από την ενδοκύτωση των core καψιδίων.

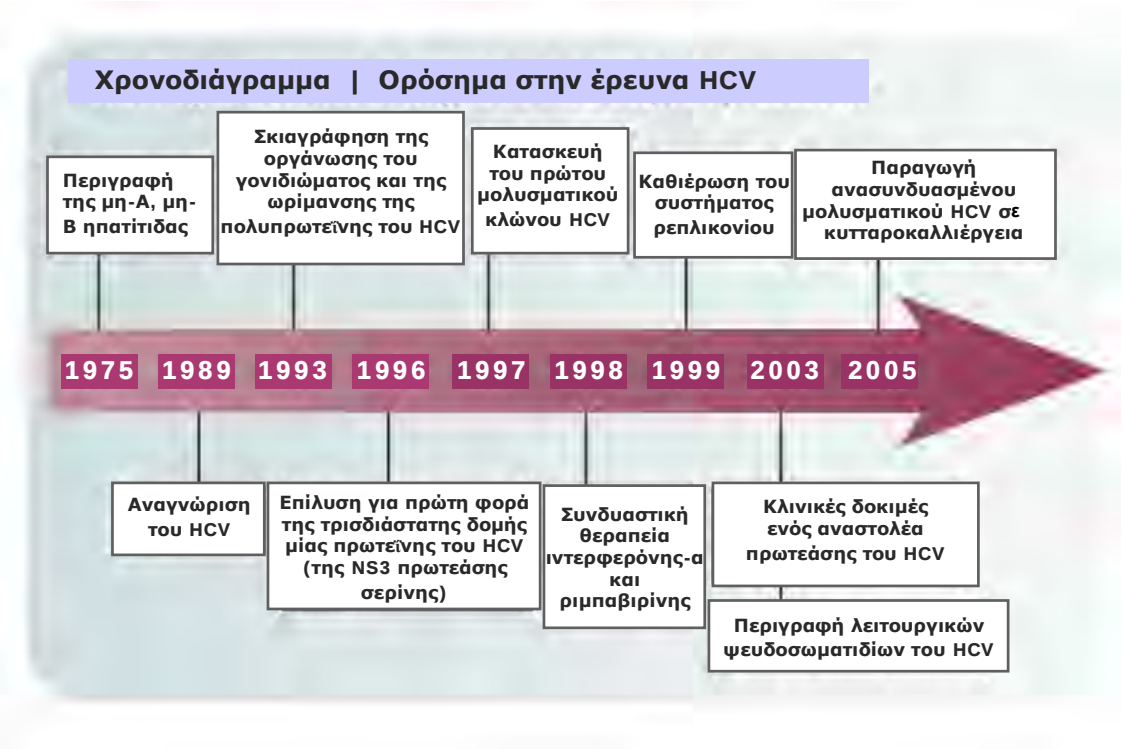
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Εικόνα 82 : Πυρηνικός εντοπισμός των ERK1/2 πρωτεϊνών παρουσία core καψιδίων.
Εικόνα 83 : Ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1* από τα core καψίδια.
Εικόνα 84 : Ενεργοποίηση της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων απόκρισης *c-fos* και *egr-1* από την ενδοκύτωση των core καψιδίων.
Εικόνα 85 : Παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ από τα core καψίδια.
Εικόνα 86 : Κυτταρικές σειρές που περιέχουν την πρωτεΐνη ERK5.
Εικόνα 87 : Μη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 από τις ιικές πρωτεΐνες core και NS5A.
Εικόνα 88 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 από τα core καψίδια σε HepG2 και Huh7 κύτταρα.
Εικόνα 89 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 γίνεται μέσω της MEK5 πρωτεΐνης.
Εικόνα 90 : Ενεργοποίηση του γονιδίου *mef*2 από τα core καψίδια.
Εικόνα 91 : Έλλειψη πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης ERK5.
Εικόνα 92 : Συνοπτικό σχήμα των παρουσιαζόμενων αποτελεσμάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 1 : Ορόσημα στην έρευνα που αφορά στον ιό της ηπατίτιδας C (6).

1. ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV)

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Όπως εκτιμάται το 3% του πληθυσμού παγκοσμίως (περισσότερα από 170 εκατομμύρια άνθρωποι) είναι μολυσμένοι με τον ιό της ηπατίτιδας C. Η λοίμωξη αποτελεί κύρια αιτία χρόνιας ηπατίτιδας, κίρρωσης του ήπατος και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (1). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει διαθέσιμο προστατευτικό εμβόλιο, ενώ είναι περιορισμένες και οι θεραπευτικές επιλογές. Η τρέχουσα θεραπεία περιλαμβάνει την χορήγηση πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-α σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη, όμως εμφανίζονται συχνά σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες και μόνο 50% των ασθενών παρουσιάζει μακροχρόνια ανταπόκριση (2).

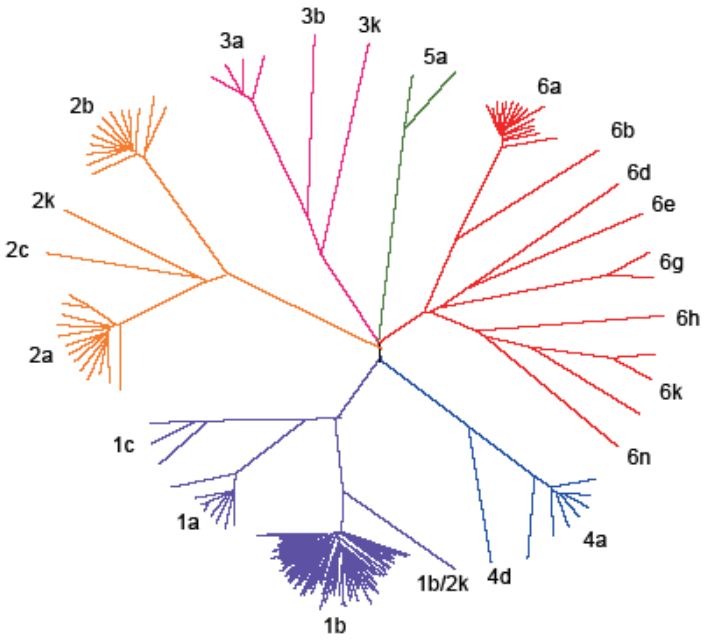
1.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Μετά την ανάπτυξη μεθόδων ορολογικής ανίχνευσης για τις λοιμώξεις από τους ιούς της ηπατίτιδας A και B το 1974, έγινε φανερό ότι η πλειονότητα των περιπτώσεων μετάδοσης ηπατίτιδας μετά από μετάγγιση δεν οφείλονταν στις λοιμώξεις από αυτούς τους ιούς, και γι' αυτό ονομάστηκε μη-A, μη-B ηπατίτιδα (non-A, non-B hepatitis/NANBH) (3,4). Αν και αρχικά θεωρήθηκε ως μία ήπια ασθένεια, αποδείχτηκε πως προκαλούσε χρόνια ηπατίτιδα, που μπορούσε να οδηγήσει σε κίρρωση του ήπατος και ηπατική ανεπάρκεια. Μετά από αρκετά χρόνια έρευνας αποδείχτηκε πως επρόκειτο για έναν νέο ιό, που ονομάστηκε 'ιός της ηπατίτιδας C' (Hepatitis C virus, HCV) και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1989 (5). Παρόλο που έχουν περάσει 20 χρόνια από τότε και σημαντικές ανακαλύψεις έχουν γίνει, υπάρχουν ακόμα αρκετά σημεία, τόσο στον κύκλο ζωής του ιού όσο και στην ασθένεια που προκαλεί, που παραμένουν αναπάντητα. Για παράδειγμα, μόλις το 2005 αναπτύχθηκε σύστημα κυτταροκαλλιέργειας που να υποστηρίζει ολόκληρο τον κύκλο ζωής του ιού (εικόνα1), που όμως αφορά μόνο συγκεκριμένους γονότυπους.

1.1.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας C κατατάσσεται στο γένος *Hepacivirus* και στην οικογένεια *Flaviviridae*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τους κλασικούς φλαβιιούς (*flaviviridae*) (όπως π.χ. τους ιούς του κίτρινου πυρετού, του δάγγειου και τον μεταδιδόμενο από κρότωνες ιό), τους πεστιιούς των ζώων *(pestivirus)* (π.χ. τον ιό της ιογενούς διάρροιας των βοοειδών) και τους ιούς GB (GBV-A, GBV-B, GBV-C).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 2 : Φυλογενετικό δέντρο που απεικονίζει όλες τις δημοσιευμένες αλληλουχίες του ιού της ηπατίτιδας C (7).

Εικόνα 3 : Γεωγραφική κατανομή του ιού της ηπατίτιδας C (10).

1.1.3. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ

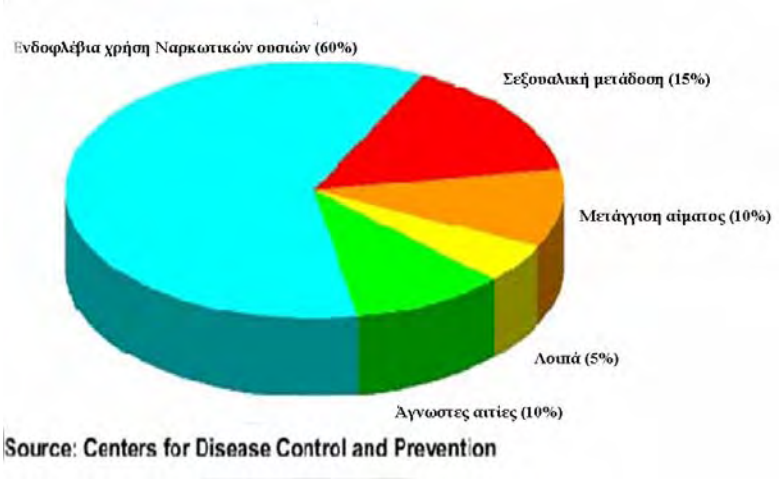
Η μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C είναι μία δυναμική διαδικασία με χρόνο ημιζωής του ιού μόλις λίγες ώρες, με παραγωγή και κάθαρση περίπου 10^{12} ιικών σωματιδίων την ημέρα σε έναν δεδομένο ασθενή. Αυτή η υψηλή αντιγραφική ενεργότητα, από κοινού με την έλλειψη επιδιορθωτικής ενεργότητας της ιικής RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, αποτελούν την βάση της υψηλής γενετικής ποικιλομορφίας του ιού. Οι ιδιότητες αυτές είναι παρόμοιες με εκείνες της λοίμωξης από τον ιό της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (HIV). Τα στελέχη του ιού κατατάσσονται σε γονότυπους και υπότυπους (εικόνα 2). Υπάρχουν έξι κύριοι γονότυποι που διαφέρουν στην νουκλεοτιδική τους αλληλουχία κατά 30-35%. Οι ασθενείς με λοίμωξη από τον γονότυπο 1 δεν αντιδρούν τόσο αποτελεσματικά στην θεραπεία με ιντερφερόνη-α όσο εκείνοι με λοίμωξη από τους γονοτύπους 2 ή 3. Η κατανομή των γονοτύπων διαφέρει τόσο γεωγραφικά όσο και στις διάφορες ομάδες υψηλού κινδύνου. Για κάθε γονότυπο του HCV, πολλοί υπότυποι μπορούν να οριστούν (ονομάζονται a, b, c, κ.ο.κ.), των οποίων η νουκλεοτιδική αλληλουχία διαφέρει κατά 20-25% (8,9).

1.1.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

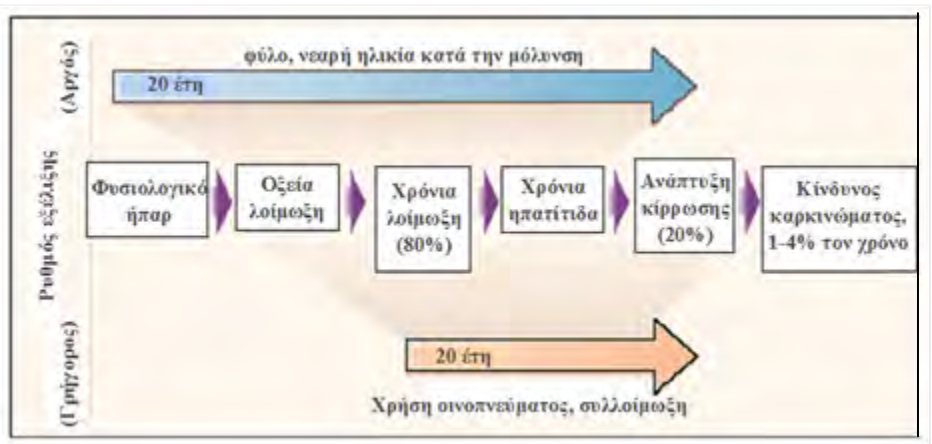
Η λοίμωξη με τον ιό της ηπατίτιδας C είναι παγκόσμιο φαινόμενο, και το ποσοστό ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού στον ορό στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες κυμαίνεται μεταξύ 1 και 2% (εικόνα 3). Υψηλότερα ποσοστά έχουν βρεθεί σε περιοχές της Ανατολικής Ευρώπης και της Αφρικής, ενώ η Αίγυπτος έχει από τα υψηλότερα ποσοστά επιπολασμού, φτάνοντας μέχρι και το 15% του γενικού πληθυσμού (10,11). Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι περίπου 200.000 άνθρωποι πάσχουν από ηπατίτιδα που οφείλεται στον συγκεκριμένο ιό (πηγή : Ελληνική μελέτη ήπατος).

Η ηπατίτιδα C είναι μία ιογενής λοίμωξη που μεταδίδεται κυρίως μέσω του αίματος. Σήμερα στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες το μεταγγιζόμενο αίμα ελέγχεται για τον HCV, με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των μολύνσεων. Άλλη συνήθης οδός μετάδοσης είναι η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών, η οποία ευθύνεται για τις περισσότερες νέες μολύνσεις στις ΗΠΑ. Ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί επίσης να μεταδοθεί από την μητέρα στο βρέφος (12). Οι υπόλοιπες πηγές δεν είναι πολύ συγκεκριμένες, και στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση σχετίζεται με τρόπους ζωής υψηλού κινδύνου ή με κάποιες ειδικές δημογραφικές ομάδες, παρά με συγκεκριμένη οδό μόλυνσης (10,11). Η σεξουαλική μετάδοση του ιού δεν είναι συνήθης, όμως τα άτομα με πολλούς σεξουαλικούς συντρόφους βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης. Οι εργαζόμενοι στα επαγγέλματα υγείας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 4 : Τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV).



Εικόνα 5 : Η φυσική ιστορία της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας C και η μεταβλητότητα από άτομο σε άτομο (13).

παρουσιάζουν ελαφρά αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό, αν και το ποσοστό μόλυνσης μετά από τραυματισμό (συνήθως τρύπημα με βελόνα) είναι μόνο 5-10%. Υπολογίζεται ότι στο 5% των μολυσμένων ατόμων δεν μπορεί να προσδιοριστεί η οδός της μόλυνσης ή ο παράγοντας κινδύνου (10,11) (εικόνα 4).

1.1.5. ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η εξέλιξη της μόλυνσης από τον ιό HCV συντελείται σε τρεις φάσεις, την οξεία λοίμωξη, την χρόνια λοίμωξη και τέλος την κίρρωση του ήπατος που σε μερικές περιπτώσεις καταλήγει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Τα κλινικά συμπτώματα της οξείας λοίμωξης εμφανίζονται συνήθως εντός 7 ή 8 εβδομάδων από την έκθεση στον ιό, αλλά η πλειονότητα των ατόμων είτε δεν παρουσιάζουν συμπτώματα ή τα συμπτώματα είναι πολύ ήπια όπως ναυτία, αδιαθεσία και ίκτερο. Έχει περιγραφεί η κεραυνοβόλος ηπατίτιδα, αλλά είναι πολύ σπάνια. Στο 80% περίπου των μολυσμένων ατόμων η λοίμωξη μεταβάλλεται σε χρόνια και είναι ασυμπτωματική για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σοβαρές επιπλοκές και θάνατος συνήθως συμβαίνουν μόνο στα άτομα με κίρρωση, που αναπτύσσεται σε ποσοστό 15-20% όσων μολύνθηκαν.

Από τις μέχρι τώρα μελέτες το χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης των διαφόρων σταδίων της ηπατικής νόσου παρουσιάζεται αρκετά μεταβλητό (εικόνα 5). Στο ένα τρίτο των ατόμων, η σοβαρή ηπατική νόσος αναπτύσσεται σε 20 (ή λιγότερα) χρόνια, ενώ στο άλλο ένα τρίτο καμία εξέλιξη δεν παρατηρείται για 30 χρόνια ή και περισσότερο. Οι παράγοντες που επιταχύνουν την κλινική εξέλιξη περιλαμβάνουν την κατανάλωση οινοπνεύματος, την συνλοίμωξη με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας ή της ηπατίτιδας Β, το ανδρικό φύλο, καθώς και την προχωρημένη ηλικία κατά την μόλυνση. Μετά την ανάπτυξη της κίρρωσης, ο κίνδυνος ηπατοκυτταρικού καρκινώματος είναι περίπου 1-4% το χρόνο. Η εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος χωρίς προϋπάρχουσα κίρρωση μπορεί να συμβεί αλλά είναι σπάνια (13).

Εκτός από την ηπατική νόσο, η λοίμωξη HCV συνοδεύεται και από σημαντικές εξωηπατικές εκδηλώσεις. Τα περισσότερα συμπτώματα αυτής της κατηγορίας σχετίζονται με αυτοάνοσες ή λεμφοβλαστικές καταστάσεις, πιθανόν λόγω της δυνητικής αναπαραγωγής του ιού σε λεμφοκύτταρα (14-16). Επίσης έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις νευρολογικών συμπτωμάτων (17,18).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1.1.6. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Υπάρχουν διάφορα διαγνωστικά τεστ για τον HCV, τα οποία διακρίνονται σε δυο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι δοκιμασίες ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του HCV που πραγματοποιείται σε δείγμα αίματος. Η ανίχνευση αντισωμάτων εκτελείται με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, η οποία ανιχνεύει αντισώματα έναντι δομικών η μη δομικών πρωτεϊνών του ιού (19).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μέθοδοι ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του ιικού RNA. Οι μέθοδοι ανίχνευσης βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και έχουν μεγάλη ευαισθησία καθώς επιτρέπουν την ανίχνευση λιγότερων των 1000 αντιγραφών ιικού RNA ανά ml δείγματος. Η μέθοδος αυτή συνίσταται για την επιβεβαίωση της λοίμωξης, για την παρακολούθηση της ιαιμίας κατά τη διάρκεια της αντι-ιικής θεραπείας, όπως επίσης και για τη διάγνωση της μόλυνσης σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα και από άλλους ιούς (19).

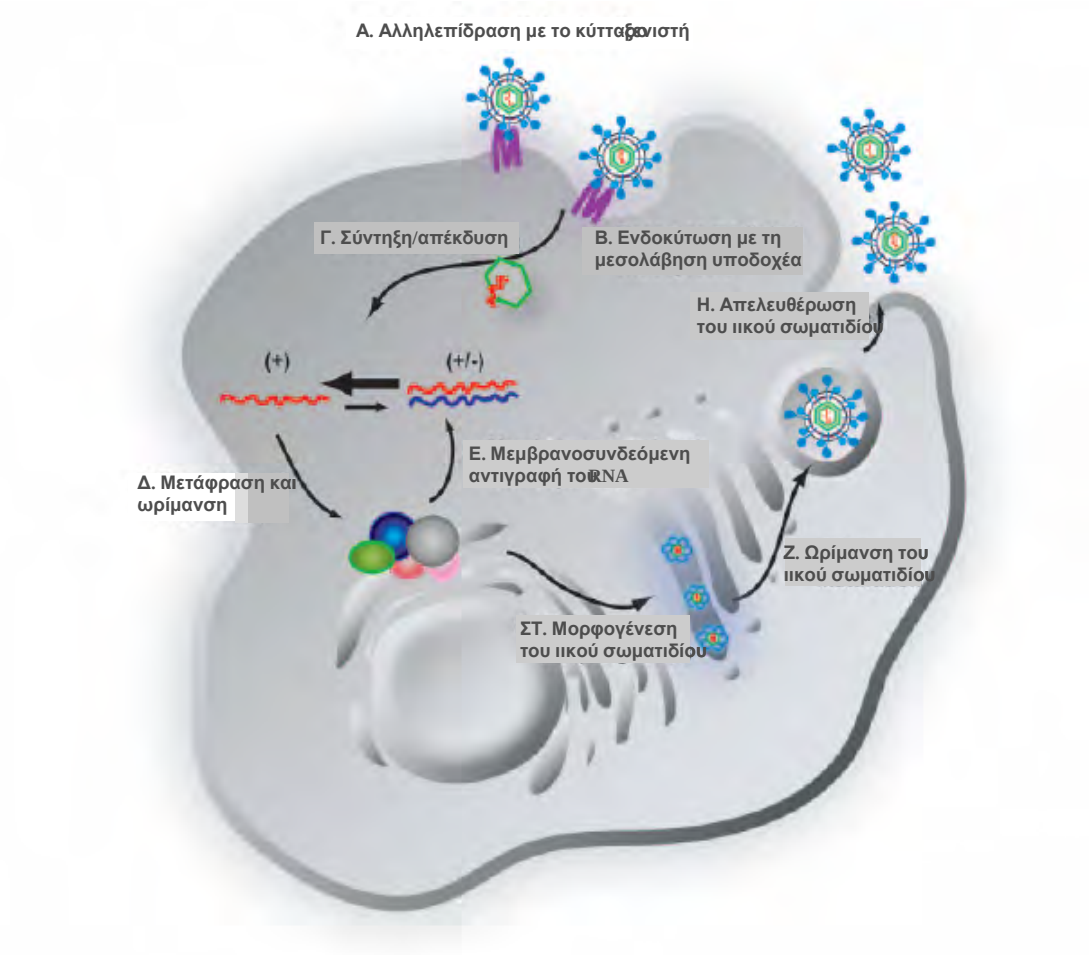
Επιπλέον, η μέτρηση των επιπέδων της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης στον ορό αποτελεί ένα σημαντικό διαγνωστικό τεστ καθώς χρησιμοποιείται κυρίως για την παρακολούθηση της αντι-ιικής θεραπείας. Αύξηση των επιπέδων της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης υποδηλώνει οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη και παρατηρείται 6-8 εβδομάδες μετά τη μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας C (8).

1.1.7. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία για τους ασθενείς με χρόνια HCV ηπατοπάθεια περιλαμβάνει χορήγηση του συνδυασμού ιντερφερόνης-α (IFN-α) και του αντι-ιικού παράγοντα ριμπαβιρίνη (νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανοσίνης) (2, 19, 20). Περαιτέρω βελτίωση της θεραπευτικής αγωγής επιτεύχθηκε πρόσφατα με την προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης στην ιντερφερόνη-α (PEG-IFN-α). Το συγκεκριμένο πολυμερές μειώνει την ανοσολογική αντίδραση συνεπώς και τις παρενέργειες της θεραπευτικής αγωγής. Παράλληλα, μειώνεται σε μεγάλο ποσοστό η διάσπαση του μορίου από πρωτεολυτικά ένζυμα με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ημίσειας ζωής του, άρα και τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα (20).

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας συσχετίζεται με τον γονότυπο του ιού, τα επίπεδα της ιαιμίας, και το ιστολογικό στάδιο της νόσου αλλά και από άλλες μεταβλητές (19). Παρά τις προσπάθειες βελτιώσεως των ποσοστών διατηρούμενης ιολογικής αποκρίσεως, με εξατομίκευση της θεραπείας από πλευράς διάρκειας και δόσεως ριμπαβιρίνης, τα ποσοστά των ασθενών που δεν ανταποκρίνονται η υποτροπιάζουν εξακολουθούν να είναι υψηλά. Συμπερασματικά, παρά τις εντατικές έρευνες και τη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 6 : Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C (21).

βελτιστοποίηση της θεραπείας, η ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικής θεραπείας καθώς και εμβολίου κατά της ηπατίτιδας C είναι πλέον επιτακτική.

1.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΟΛΟΓΙΑ

1.2.1.ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

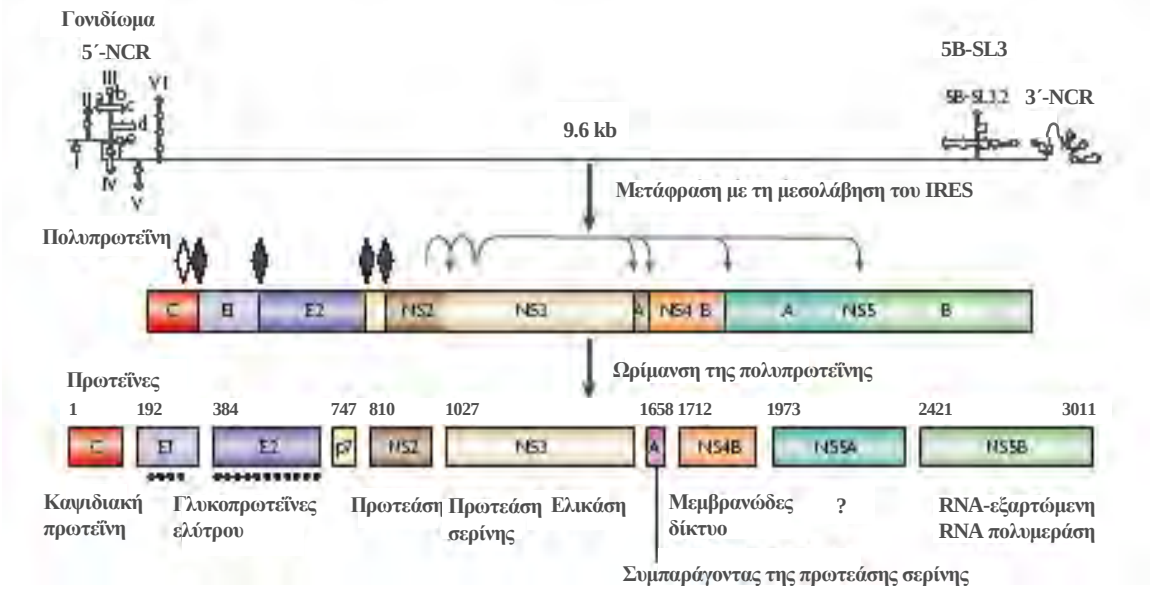
Ο κύκλος ζωής του ιού στο κύτταρο ξενιστή παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 6 και είναι παρόμοιος με εκείνους των υπολοίπων μελών της οικογένειας των φλαβιιών (*Flaviviridae*). Τα ιικά σωματίδια που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο αλληλεπιδρούν με μόρια υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου και υπόκεινται σε ενδοκύτωση μέσω υποδοχέων εντός κυστιδίων με χαμηλό pH. Ακολουθεί σύντηξη της μεμβράνης με τις γλυκοπρωτεΐνες του HCV, και το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Κατά την μετάφραση του γονιδιωματικού RNA του HCV παράγεται μία μοναδική μεγάλη πολυπρωτεΐνη που στη συνέχεια πρωτεολύεται σε δέκα ώριμες πρωτεΐνες και συνδέονται με μία μεβρανική δομή που μοιάζει με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι ώριμες πρωτεΐνες του HCV αντιγράφουν το γονιδιωματικό RNA μέσω ενός αντιγραφικού ενδιαμέσου μορίου αρνητικής πολικότητας για την παραγωγή θυγατρικών μορίων RNA. Ένα μέρος από τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA πακετάρονται σε νουκλεοκαψίδια και συνδέονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του HCV, καταλήγοντας σε εκβλάστηση εντός του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα ιικά σωματίδια ακολουθούν το κυτταρικό εκκριτικό μονοπάτι, και κατά την διάρκεια αυτής της μεταφοράς πραγματοποιείται η ωρίμανση των σωματιδίων. Η ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του ιού γίνεται με την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από το κύτταρο (21,22).

1.2.2. ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

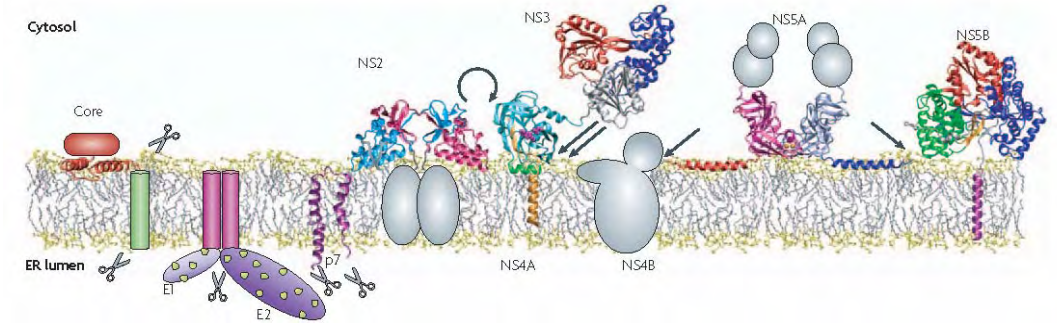
Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας C είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και μήκους 9,6 χιλιάδων βάσεων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7, αποτελείται από μία 5' μη κωδική περιοχή (5′-NCR), στην οποία υπάρχει μια εσωτερική θέση δέσμευσης του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site–IRES), ένα μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί μία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη περίπου 3.000 αμινοξικών καταλοίπων και μία 3' μη κωδική περιοχή (3′-NCR) (6,23).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

A



B



Εικόνα 7 : Οργάνωση του γονιδιώματος και ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C (6).

A : Στην κορυφή παρουσιάζεται σχηματικά το γονιδίωμα του ιού. Στη σχηματική αναπαράσταση περιλαμβάνονται απλοποιημένες οι δευτεροταγείς δομές του RNA στις 5’ και 3’ μη κωδικές περιοχές (NCR) και στο γονίδιο της καψιδιακής πρωτεΐνης. Κατά την μετάφραση παράγεται μία πολυπρωτεΐνη, που στη συνέχεια πρωτεολύεται στις ώριμες δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες. Η αρίθμηση των αμινοξικών καταλοίπων εμφανίζεται πάνω από κάθε πρωτεΐνη. Οι γεμάτοι ρόμβοι υποδηλώνουν τις θέσεις τομής της πολυπρωτεΐνης από την πεπτιδάση του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο άδειος ρόμβος δείχνει την επιπλέον τροποποίηση της καψιδιακής πρωτεΐνης από την πεπτιδάση του πεπτιδίου σηματοδότη. Τα τόξα υποδεικνύουν την πέψη από τις πρωτεάσες NS2-3 και NS3-4A του HCV. Τα κοκκία στις E1 και E2 αντιπροσωπεύουν την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών του φακέλου.

B : Δομές και μεμβρανική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών του ιού.

1.2.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ HCV

Οι πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C (εικόνα 7) καθώς και ο ρόλος τους στον κύκλο ζωής του ιού συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (6,23).

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

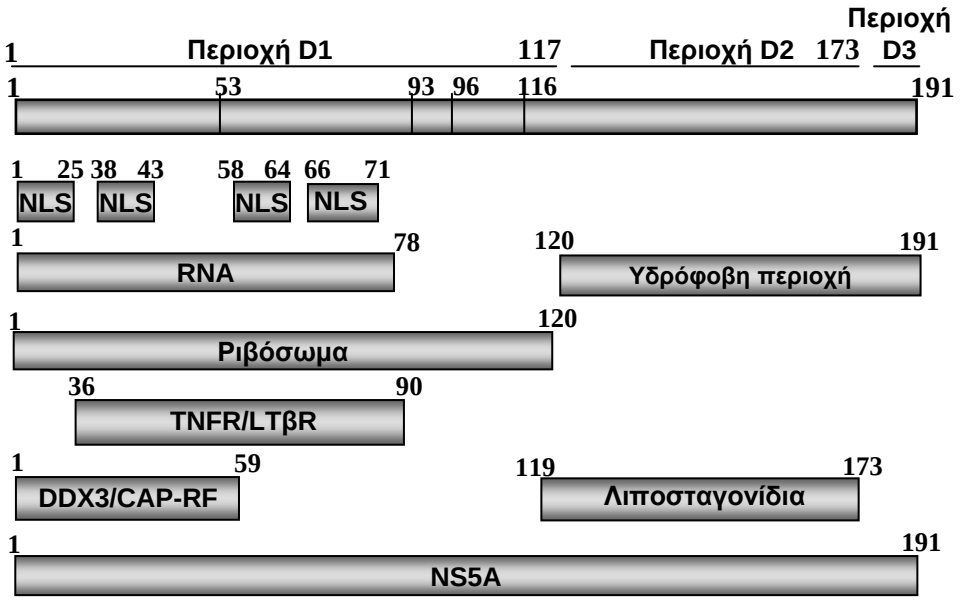
1.2.3.1. Δομικές πρωτεΐνες του ιού

1.2.3.1.1. Καψιδιακή πρωτεΐνη core

Η πρωτεΐνη core σχηματίζει το νουκλεοκαψίδιο του ιού και αποτελεί την πρώτη δομική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Το νεοσυντιθέμενο πολυπεπτίδιο μεταφράζεται-στοχεύεται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω της αλληλουχίας σηματος που εντοπίζεται μεταξύ της core και της E1. Η απομάκρυνση της αλληλουχίας από την πεπτιδάση σηματοδότη παράγει μία ανώριμη καψιδιακή πρωτεΐνη 191 αμινοξικών καταλοίπων. Η ώριμη καψιδιακή πρωτεΐνη μοριακής μάζας 21 kDa προκύπτει από μία επιπλέον πρωτεόλυση στο καρβοξυτελικό άκρο (24). Το ακριβές σημείο της πρωτεόλυσης δεν έχει πλήρως διερευνηθεί, βρίσκεται όμως ανάμεσα στα αμινοξέα 173 και 179 (25-26).

Η αμινοτελική υδροφιλική περιοχή της καψιδιακής πρωτεΐνης περιέχει μεγάλη αναλογία από βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, και έχει αναφερθεί η συμμετοχή της τόσο στην πρόσδεση του RNA όσο και στον ομο-ολιγομερισμό. Η πρωτεΐνη core είναι μία α-ελικοειδής πρωτεΐνη που ενεργεί ως μεμβρανική πρωτεΐνη (28). Χωρίζεται σε δυο περιοχές: την περιοχή D1 (1-117αα), που αποτελεί το αμινοτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης, την D2 (117-173αα) και την D3 (173-191αα), που αποτελεί και το κομμάτι που απομακρύνεται μετά την πρωτεόλυση από την πεπτιδάση (25,27). Η D1 περιοχή παρουσιάζει ομοιότητες με τις αντίστοιχες περιοχές άλλων ιών της οικογένειας των φλαβιιών (*flaviviridae*) και θεωρείται χωρίς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 8 : Σχηματική αναπαράσταση της σχέσης μεταξύ της δομής της πρωτεΐνης core του ιού HCV και ορισμένων ιδιοτήτων της (25-27,35-37).

ιδιαίτερη δομή (29). Έχει αποδειχτεί ότι αυτή η περιοχή είναι ικανή από μόνη της να σχηματίσει ιικό καψίδιο με ικανοποιητική αντιγονικότητα (30-32). Επιπλέον, είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε RNA, καθώς επίσης και για την αυτοσυγκρότηση της σε καψίδιο. Η περιοχή D2, είναι ιδιαίτερα υδρόφοβη και παρουσιάζει μεγάλη αντιγονικονικότητα.

Η πρωτεΐνη core εκτός από τη δημιουργία του καψιδίου, έχει την ικανότητα να επιδρά με άλλες πρωτεΐνες, ιικές ή κυτταρικές, και να επηρεάζει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (εικόνα 8). Έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες όπως η ριβονουκλεοπρωτεΐνη hnRNP K, οι υποδοχείς της λεμφοτοξίνης β (LT-βR) και του TNF (Tumor Necrosis Factor) και πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο DEAD Box, κυρίως ελικάσες (27,33). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 14-3-3 που αποτελεί συστατικό του μονοπατιού ενεργοποίησης MAPK-ERK$_{1/2}$ (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-signal Regulated Kinase-από εξωκυττάρια σήματα ρυθμιζόμενη κινάση) (34). Τέλος, είναι κοινά αποδεκτό ότι επιδρά με τα λιποσταγονίδια, μέσο της υδρόφοβης περιοχής της και πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον ιικό πολλαπλασιασμό ή/και στην μορφογένεση του ιικού σωματιδίου (26,35,36). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση της καψιδιακής πρωτεΐνης με τα λιποσταγονίδια πιθανά επηρεάζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στην ανάπτυξη της στεάτωσης του ήπατος, που συχνά παρατηρείται στην ηπατίτιδα C (37).

Με τις άμεσες ή/και έμμεσες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, έχει αποδειχθεί πως η πρωτεΐνη core επηρεάζει την απόπτωση καθώς επίσης και μονοπάτια σηματοδότησης (34,38,39). Επιπλέον, έχει προταθεί πως η πρωτεΐνη παρουσιάζει πυρηνικό εντοπισμό (μέσω των NLS-Nuclear Localization Signal-περιοχών) και ενδεχομένως έχει την ιδιότητα να προσκολλάται στο DNA και να επηρεάζει την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (40-42).

Πρόσφατα, ο Eng και συνεργάτες, πρότειναν την ύπαρξη μιας οικογένειας πρωτεϊνών (mini-cores) που αποτελείται από μικρά τμήματα της πρωτεΐνης, τα οποία όπως υποστηρίζουν προέρχονται από εσωτερική έναρξη σε μη κανονικά κωδικόνια έναρξης και όχι από πρωτεόλυση της πρωτεΐνης, μεγέθους από 8 έως 14kDa. Επιπλέον, υποστηρίζουν πως η πρωτεΐνη core είναι αυτή που συντονίζει την παραγωγή αυτών των πρωτεϊνών (43). Παρόλα αυτά ο μηχανισμός δημιουργίας των ισομορφών αυτών καθώς και ο ρόλος τους παραμένει αδιευκρίνιστος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1.2.3.1.2. E1 και E2

Οι πρωτεΐνες του φακέλου E1 και E2 είναι γλυκοζυλιωμένες και σχηματίζουν ένα μη ομοιοπολικό σύμπλεγμα, που θεωρείται ότι αποτελεί τον θεμέλιο λίθο για τον σχηματισμό του φακέλου του ιού. Η ωρίμανση και η αναδίπλωση των γλυκοπρωτεϊνών του HCV είναι μία σύνθετη πορεία, στην οποία εμπλέκεται ο μηχανισμός των συνοδών πρωτεϊνών (chaperones) του ενδοπλασματικού δικτύου, και η οποία εξαρτάται τόσο από τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών όσο και από την γλυκοζυλίωση. Οι διαμεμβρανικές περιοχές των E1 και E2, που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, συμμετέχουν στον ετεροδιμερισμό και έχουν ιδιότητες συγκράτησης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Οι εξω-περιοχές των E1 και E2 τροποποιούνται σε μεγάλο βαθμό με σάκχαρα. Οι E1 και E2 διαθέτουν μέχρι 6 και 11 δυνητικές θέσεις γλυκοζυλίωσης, αντίστοιχα, και οι περισσότερες από αυτές είναι καλά συντηρημένες. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετά από τα σάκχαρα αυτά διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην πτύχωση της γλυκοπρωτεΐνης ή στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Όπως είναι αυτονόητο, οι γλυκοπρωτεΐνες αποτελούν στόχο για την ανάπτυξη αντιικών μορίων που θα εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή (6,22,23,44).

1.2.3.1.3. p7

Πρόκειται για ένα πολυπεπτίδιο 63 αμινοξικών καταλοίπων που συχνά δεν απομακρύνεται πλήρως από την E2. Η πολυπρωτεΐνη βρίσκεται στο όριο μεταξύ δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του ιού, και απελευθερώνεται με την δράση της πεπτιδάσης σηματοδότη του ξενιστή. Έχει δύο διαμεμβρανικά τμήματα που συνδέονται με μία μικρή κυτταροπλασματική θηλιά, ενώ τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο είναι προσανατολισμένα προς τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η p7 του HCV δεν απαιτείται για την αντιγραφή του RNA *in vitro*, αλλά είναι απαραίτητη για την παραγωγική μόλυνση *in vivo*. Έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει ολιγομερή και ότι διαθέτει ενεργότητα καναλιού κατιόντων. Πιθανά λοιπόν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων, και αποτελεί ελκυστικό στόχο για την αντιική παρέμβαση (6,22,23,44).

1.2.3.2. Μη δομικές πρωτεΐνες

1.2.3.2.1. NS2-3

Η μελέτη της πρωτεάσης NS2-3 υπήρξε αρκετά δύσκολη. Δεν απαιτείται για την αντιγραφή του RNA *in vitro*, αλλά είναι απαραίτητη για τον πλήρη κύκλο αναδιπλασιασμού του ιού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η καταλυτική ενεργότητα της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό μισό της NS2 και στο αμινοτελικό ένα τρίτο της NS3. Όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες του HCV, η NS2 συνδέεται με ενδοκυτταρικές μεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, η αμινοτελική της περιοχή περιέχει τουλάχιστον ένα διαμεμβρανικό τμήμα (πιθανόν τρία), ενώ οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που στερούνται της περιοχής αυτής διατηρούν την ενζυμική ενεργότητα. Η επίλυση της δομής της αμινοτελικής μεμβρανικής περιοχής της NS2 πιθανά θα συμβάλει στην διαλεύκανση επιπλέον λειτουργιών της, καθώς πρόσφατα βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη για την παραγωγή μολυσματικού ιού, πιθανότατα επιδρώντας σε όψιμο στάδιο του κύκλου ζωής του ιού. Επιπλέον, έχει προταθεί πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες και πιθανά να επηρεάζει την κυτταρική μεταγραφή. Παρόλα αυτά περαιτέρω μελέτη είναι αναγκαία για να διευκρινισθούν όλες αυτές οι λειτουργίες (6,22,23,44).

1.2.3.2.2. Σύμπλεγμα NS3-4A

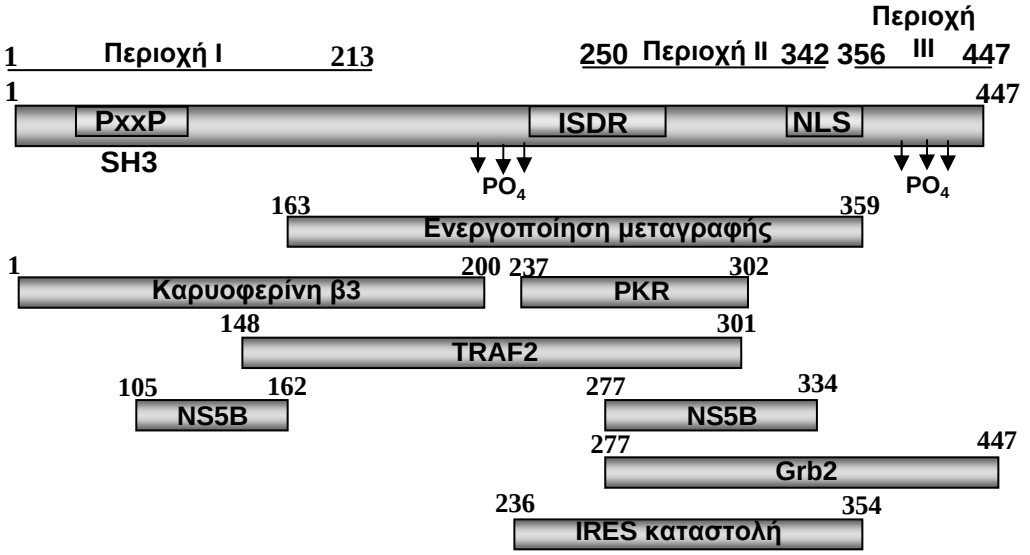
Η NS3 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη: στο αμινοτελικό ένα τρίτο της πρωτεΐνης εντοπίζεται η πρωτεάση σερίνης, και στα δύο τρίτα του καρβοξυτελικού άκρου η RNA ελικάση/NTPάση. Και οι δύο ενζυμικές ενεργότητες είναι καλά χαρακτηρισμένες, και επιπλέον έχουν λυθεί οι δομές με υψηλή διακριτικότητα. Το πολυπεπτίδιο NS4A λειτουργεί ως συμπαράγοντας για την NS3 πρωτεάση σερίνης. Η κεντρική περιοχή ενσωματώνεται σαν συστατικό στον πυρήνα του ενζύμου, και η αμινοτελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την σύνδεση του συμπλέγματος NS3-4A με τις μεμβράνες.

Η NS3-4A πρωτεάση σερίνης αποτελεί πρωταρχικό στόχο για τον σχεδιασμό ειδικών αναστολέων (ως αντιικών παραγόντων) επειδή διαθέτει μία ασυνήθιστα ρηχή 'τσέπη πρόσδεσης' του υποστρώματος που απαιτεί εκτεταμένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα. Αυτό αποτελεί πρόκληση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών και ειδικών αναστολέων. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η NS3-4A πρωτεάση σερίνης πρωτεολύει, και με αυτό τον τρόπο απενεργοποιεί, δύο καθοριστικής σημασίας πρωτεΐνες, προσαρμοστές στην ανίχνευση της έμφυτης ανοσίας, τις Triff77 και Cardif78. Η Cardif είναι μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου. Έχει επίσης αναφερθεί ότι ένα μικρό κλάσμα της NS3-4A εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Τα αποτελέσματα αυτά έχουν μείζονες συνέπειες για την εμμένουσα λοίμωξη και παθογένεση του ιού της ηπατίτιδας C (6,22,23,44).

1.2.3.2.3. NS4B

Η NS4B είναι μία πολύ υδρόφοβη πρωτεΐνη, που προβλέπεται ότι περιέχει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές. Γενικά η πρωτεΐνη αυτή των 27 kDa δεν είναι καλά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 9 : Δομικά χαρακτηριστικά και επιλεγμένες λειτουργικές περιοχές της HCV NS5A πρωτεΐνης (44-47).

χαρακτηρισμένη. Πρόσφατα δείχθηκε ότι παλμιτυλιώνεται στην καρβοξυτελική περιοχή και ότι σχηματίζει ολιγομερή. Τα άκρα της πρωτεΐνης (αμινοτελικό και καρβοξυτελικό) εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, αλλά ένα κλάσμα του αμινοτελικού άκρου μπορεί επίσης να βρεθεί και στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η δυνητική παρουσία κάποιων δομικών περιοχών της NS4B και στις δύο πλευρές της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη αυτή διαδραματίζει ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυταροπλάσματος (6,22,23,44).

1.2.3.2.4. NS5A

Η NS5A, μια από τις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού, είναι μία φωσφοπρωτεΐνη που μπορεί να βρίσκεται τόσο σε υπερφωσφορυλιωμένη μορφή (58 kDa) όσο και φωσφορυλιωμένη σε βασικά επίπεδα (56 kDa). Η φωσφορυλίωση της NS5A είναι ένα συντηρημένο χαρακτηριστικό στα γένη *Hepacivirus* και *Pestivirus*, καθώς και στις NS5 πρωτεΐνες του γένους των φλαβιιών (*Flavivirus*), φανερώνοντας ότι έχει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού (22,23,45). Πράγματι πολύ συχνά οι προσαρμοστικές μεταλλάξεις στην κυτταροκαλλιέργεια επηρεάζουν τα εντοπιζόμενα στο κέντρο της πρωτεΐνης κατάλοιπα σερίνης που είναι απαραίτητα για την υπερφωσφορυλίωση, προτείνοντας ότι η κατάσταση της φωσφορυλίωσης της NS5A ρυθμίζει την απόδοση της αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας C. Πρόσφατες μελέτες ενοχοποιούν την α-ισομορφή της πρωτεϊνικής κινάσης CKI για την υπερφωσφορυλίωση της NS5A, αλλά μπορεί να εμπλέκονται και άλλες κυτταρικές κινάσες (46).

Η NS5A αποτελείται από τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές (I, II, III) (εικόνα 9). Στην περιοχή I (1-213αα), που αποτελεί το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, βρίσκεται μια αμφιπαθητική α-έλικα μέσω της οποίας η πρωτεΐνη αγκυροβολεί στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και πιθανά συμμετέχει σε ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του λειτουργικού συμπλέγματος αντιγραφής του ιού (47,48). Δομικές αναλύσεις της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής I αποκαλύπτουν ότι η συγκεκριμένη περιοχή διμερίζεται και δημιουργεί δακτύλιο ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα να καθιστά την NS5A μια μεταλλοπρωτεΐνη (45).

Μια σημαντική λειτουργία στην οποία συμμετέχει η NS5A είναι η ανθεκτικότητα του ιού στην ιντερφερόνη μέσω της παρέμβασης της στα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγουν οι ιντερφερόνες και καταστέλλουν τη σύνθεση ιικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, έχει εντοπιστεί περιοχή της πρωτεΐνης (μέσα στην περιοχή II) που ονομάζεται περιοχή ευαισθησίας-ανθεκτικότητας του ιού στην ιντερφερόνη (ISDR-Interferon Sensitivity-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Determining Region), η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση PKR και την καταστέλλει. Το μονοπάτι ενεργοποίησης της PKR αποτελεί κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης των ιντερφερονών. Μεταλλάξεις στην περιοχή ISDR συνδέονται με την επιτυχία απάντησης στην θεραπεία με ιντερφερόνη λόγω ενεργοποίησης του μονοπατιού της (46).

Όπως η καψιδιακή πρωτεΐνη core, έτσι και η NS5A αλληλεπιδρά με πληθώρα πρωτεϊνών, τόσο ιικών (π.χ. NS5B) όσο και κυτταρικών όπως η καρυοφερίνη β3 (caryoferin β3) και η απολιποπρωτεΐνη A1 (apolipoprotein A1). Έχει επίσης αποδειχτεί ότι το μοτίβο PxxP που περιέχει αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που περιέχουν μια SH3 (Src homology 3) περιοχή, επηρεάζοντας διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης (46,47). Επιπλέον δρα σε κυτταρικούς και ιικούς υποκινητές, με αποτέλεσμα να ρυθμίζει τη μεταγραφή πολυάριθμων γονιδίων (46). Τέλος, πρόσφατα προτάθηκε πως η NS5A πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του καψιδίου, και πιο συγκεκριμένα στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται οι σερίνες που βρίσκονται στην περιοχή III, στο καρβοξυτελικό της άκρο (49).

1.2.3.2.5. NS5B

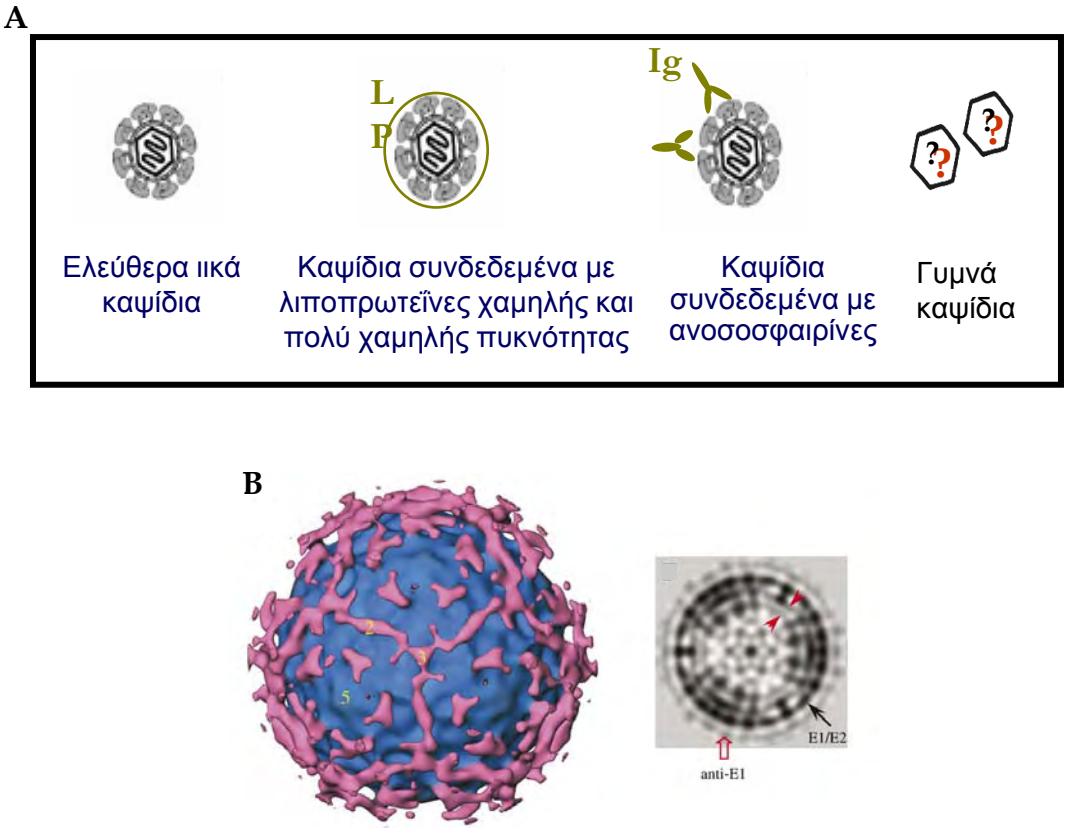
Η NS5B είναι μία RNA - εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase - RdRp). Αποτελεί το καταλυτικό συστατικό του μηχανισμού αντιγραφής του ιικού RNA. Η αντιγραφή του ιού της ηπατίτιδας C περιλαμβάνει την σύνθεση ενός συμπληρωματικού RNA αρνητικής πολικότητας χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα ως μήτρα, και την επακόλουθη σύνθεση των γονιδιωματικών μορίων RNA, θετικής πολικότητας, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τα μόρια αρνητικής πολικότητας. Το ένζυμο 'κλειδί' και για τα δύο αυτά στάδια είναι η NS5B. Η NS5B μπορεί να αρχίσει την σύνθεση RNA *de novo*, τουλάχιστον *in vitro*, και για το λόγο αυτό αποτελεί κύριο στόχο αντιικής παρέμβασης.

Η ενεργότητα της πολυμεράσης φέρεται να ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση με άλλες ιικές πρωτεΐνες (NS3 και NS5A), ενώ και ο ολιγομερισμός της NS5B φαίνεται ότι είναι σημαντικός, παρόμοια με την RdRp του ιού της πολιομυελίτιδας (poliovirus). Όπως οι περισσότερες πρωτεΐνες του HCV, η NS5B ανιχνεύεται σε σύνδεση με το ενδοπλασματικό δίκτυο ή σε μεμβράνες που προέρχονται από αυτό. Η στόχευση των μεμβρανών πραγματοποιείται μετα-μεταφραστικά (6,22,23,44).

1.2.3.2.6. ARFP / F / core+1

Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας C περιέχει, πέρα από το μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη, ένα επικαλυπτόμενο +1 πλαίσιο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 10 : Καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C.

A : Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών ειδών καψιδίων που συνυπάρχουν σε ορό ασθενών (55-58).

B : Καψίδιο με φάκελο του ιού ορατό με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (54).

στην περιοχή της αλληλουχίας για την καψιδιακή πρωτεΐνη. Το εναλλακτικό αυτό πλαίσιο ανάγνωσης (έχει ονομαστεί ARF/F/core+1) στερείται κωδικονίου έναρξης, υποδηλώνοντας ότι στην έκφρασή του εμπλέκονται ασυνήθιστοι μηχανισμοί μετάφρασης. Η ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης έναντι της πρωτεΐνης ARF/F/core+1 σε ασθενείς με λοίμωξη HCV (50) υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κατά την φυσική λοίμωξη, παρόλα αυτά ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής, αν υπάρχει, στον κύκλο ζωής του ιού ή/και την παθογένεση της λοίμωξης παραμένει αδιευκρίνιστος (51-53).

1.2.4. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Η διάμετρος των σωματιδίων του ιού παρουσία φακέλου, βάσει μελετών διήθησης και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, κυμαίνεται από 40 έως 70 nm (εικόνα 10). Τα κύρια πρωτεϊνικά συστατικά του είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη και οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου σε ένα διπλό λιπιδικό φάκελο (έλυτρο) που προέρχεται από το κύτταρο ξενιστή. Ο φάκελος αυτός περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο που αποτελείται από πολλαπλά αντίγραφα της καψιδιακής πρωτεΐνης και από το γονιδιωματικό RNA (54).

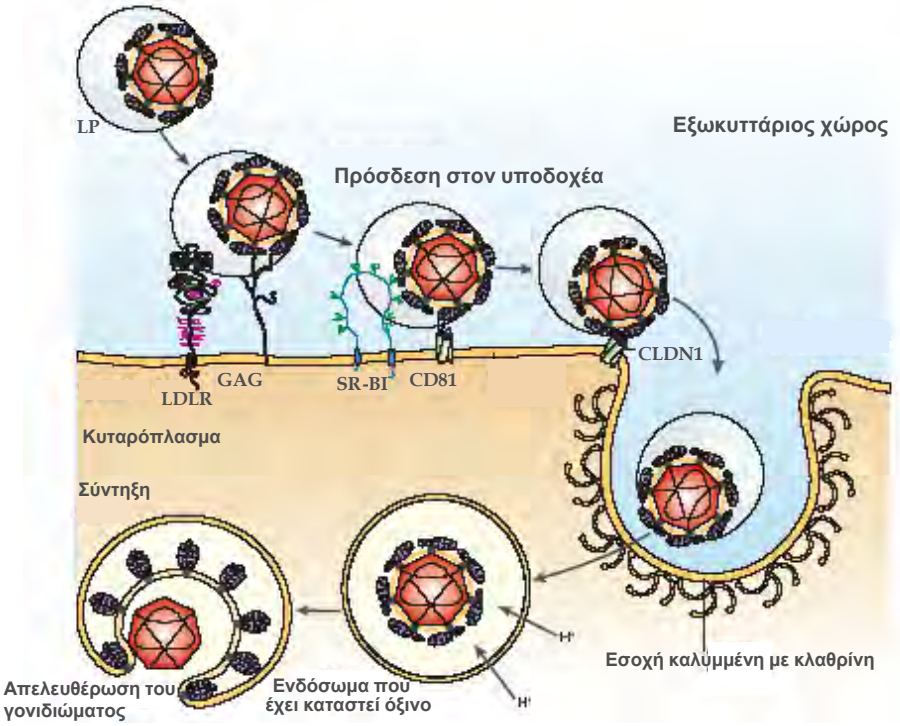
Ο ιός της ηπατίτιδας C κυκλοφορεί σε διάφορες μορφές στον ξενιστή και μπορεί να συνδέεται με λιποπρωτεΐνες χαμηλής (Low Density Lipoproteins-LDL) και πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoproteins-VLDL), καθώς και ως ελεύθερα σωματίδια ή σωματίδια προσδεδεμένα σε ανοσοσφαιρίνες (55). Τα δεδομένα αυτά πιθανόν εξηγούν την ασυνήθιστη ετερογένεια του ιού, καθώς και την χαμηλή πυκνώτητα άνωσης. Τέλος, έχει αναφερθεί και η ύπαρξη γυμνών νουκλεοκαψιδίων πάνω στα οποία έχει βασιστεί και η συγκεκριμένη εργασία (55-58).

1.2.5. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Ο ιός της ηπατίτιδας C μολύνει μόνο ανθρώπους και χιμπαντζήδες. Ο κύριος στόχος του ιού είναι τα ηπατοκύτταρα, αλλά έχει αναφερθεί και η μόλυνση δενδριτικών, B και T κυττάρων, καθώς και κάποιων άλλων κυτταρικών τύπων. Ως υποδοχείς του ιού έχουν προταθεί ο CD81 (μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των τετρασπανινών (tetraspanins) που απαντάται στην επιφάνεια πολλών κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των ηπατικών), ο υποδοχέας των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low density lipoproteins receptor-LDLR), ο υποδοχέας SR τάξης B τύπου I (SR-BI) και, πιο πρόσφατα, η κλαυδίνη-1 (claudin-1) (εικόνα 11) (6,59-61).

Ο υποδοχέας LDLR αποτελεί ελκυστικό υποψήφιο υποδοχέα, λόγω της σύνδεσης του σωματιδίου του ιού με τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας. Ο LDLR

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 11 : Τρέχον μοντέλο της εισόδου του ιού της ηπατίτιδας C στα κύτταρα (6).

Τα καψίδια του ιού που κυκλοφορούν στον ορό μπορεί να συνδέονται με λιποπρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (LP). Η πρόσδεση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να περιλαμβάνει τον υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDLR), τις γλυκοζαμινογλυκάνες (GAG), τον υποδοχέα SR τάξης B τύπου I (SR-BI), την πρωτεΐνη τετρασπανίνη CD81 και την κλαυδίνη-1 (CLDN1). Η μεταφορά του ιού μέσα στο κύτταρο εξαρτάται από ενδοκύτωση που γίνεται μέσω της κλαθρίνης. Η όξυνση του ενδοσώματος επάγει την σύντηξη των γλυκοπρωτεϊνών του HCV με την μεμβράνη.

μαζί με άλλες πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκονται στην πρόσδεση των λιποπρωτεϊνών του ορού, από κοινού με τις γλυκοζαμινογλυκάνες, πιθανόν λειτουργούν ως πρωταρχικοί συλλέκτες των σωματιδίων του ιού για την περαιτέρω στόχευση στον CD81 και τα άλλα συστατικά των υποδοχέων. Η πρωτεΐνη E2 επιπλέον προσδένεται στα μόρια DC-SIGN και L-SIGN. Το μόριο L-SIGN είναι μία ασβεστο-εξαρτώμενη λεκτίνη που εκφράζεται σε κολποειδή επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, και πιθανόν διευκολύνει την μόλυνση παγιδεύοντας τον ιό για την επακόλουθη αλληλεπίδραση με τα ηπατικά κύτταρα.

Τόσο το μόριο CD81 όσο και ο SR-BI προσδένουν την E2 και είναι απαραίτητα αλλά όχι επαρκή για την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Η έκφραση του CD81 σε ηπατικές κυτταρικές σειρές που τον στερούνται, προσδίδει επιδεκτικότητα στα σωματίδια και καψίδια του ιού. Με την χρήση αντισωμάτων έναντι του CD81 ή του SR-BI, ή με την χρήση ανασυνδυασμένου διαλυτού CD81 ή οξειδωμένου LDL, η μολυσματικότητα μπορούσε να μειωθεί, όπως επίσης και με την μείωση των επιπέδων έκφρασης του CD81 μέσω siRNA (small interfering RNA). Εντούτοις, η έκφραση των CD81 και SR-BI σε μη ηπατικές κυτταρικές σειρές δεν προσδίδει επιδεκτικότητα στην μόλυνση από τον HCV, υποδηλώνοντας ότι επιπλέον παράγοντες, ειδικοί για τα ηπατοκύτταρα, απαιτούνται για την είσοδο του ιού στα κύτταρα (6).

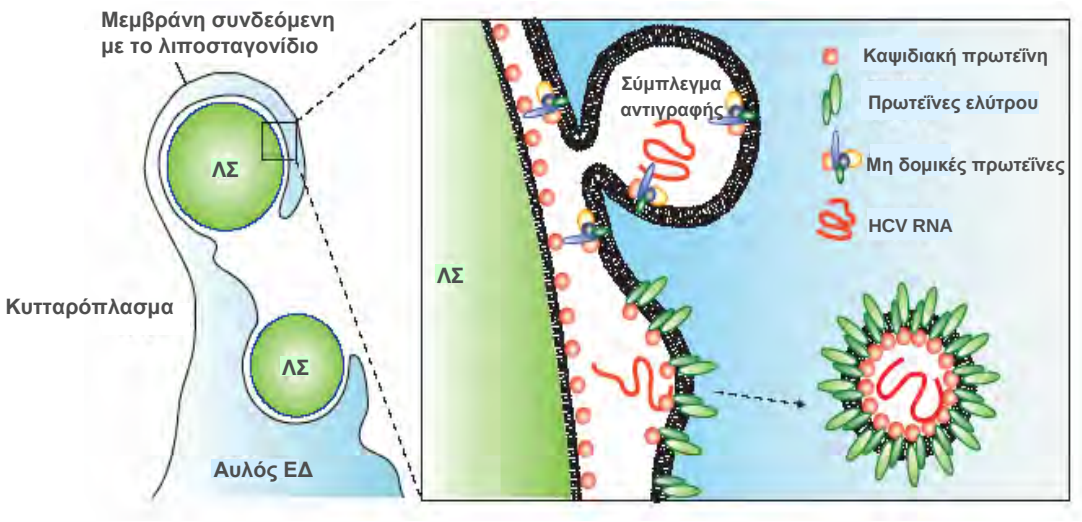
Πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως συν-υποδοχέας του HCV η κλαυδίνη-1 (claudin-1), συστατικό των στενοσυνδέσμων. Η κλαυδίνη-1 είναι απαραίτητη για την είσοδο του ιού σε ηπατικά κύτταρα και επιπλέον καθιστά μη ηπατικά κύτταρα επιτρεπτά στην μόλυνση από τον HCV. Η κλαυδίνη-1 εμπλέκεται σε όψιμο στάδιο της διαδικασίας εισόδου στο κύτταρο, μετά από την πρόσδεση του ιού και την αλληλεπίδραση της με τον CD81. Εντούτοις, το φαινόμενο της εισόδου είναι ιδιαίτερα πολύπλοκο μιας και υπάρχουν κυτταρικές σειρές που ενώ παρουσιάζουν και τα τρία περιγραφόμενα είδη υποδοχέων-μορίων δεν μολύνονται από τον ιό (61).

Η είσοδος του HCV πραγματοποιείται με ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης, και περιλαμβάνει την μετάβαση σε ενδοσωμικό διαμέρισμα χαμηλού pH και πιθανότατα σύντηξη με τις μεμβράνες του ενδοσώματος. Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της σύντηξης, το στάδιο της σύντηξης και η ταυτότητα των πεπτιδίων σύντηξης δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί (59,60).

1.2.6. ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο σχηματισμός μεμβρανοσυνδεόμενου συμπλέγματος αντιγραφής, που αποτελείται από ιικές πρωτεΐνες, αντιγραφόμενο RNA και τροποποιημένες κυτταρικές μεμβράνες,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 12 : Μοντέλο της παραγωγής μολυσματικού HCV όπου η συγκρότηση του ιού λαμβάνει χώρα γύρω από τα λιποσταγονίδια (6).

Η καψιδιακή πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στην μονοστιβάδα της μεμβράνης που περιβάλει το λιποσταγονίδιο. Ο ιός HCV επάγει την παράθεση του λιποσταγονιδίου στην προερχόμενη από το ενδοπλασματικό δίκτυο μεμβρανική διπλοστιβάδα. Η πρωτεΐνη core στρατολογεί τις μη δομικές πρωτεΐνες, καθώς και τα συμπλέγματα της αντιγραφής, στην συνδεόμενη με το λιποσταγονίδιο μεμβράνη ενώ οι μη δομικές πρωτεΐνες μπορούν να συμμετάσχουν στην παραγωγή ιού.
(ΛΣ: λιποσταγονίδιο).

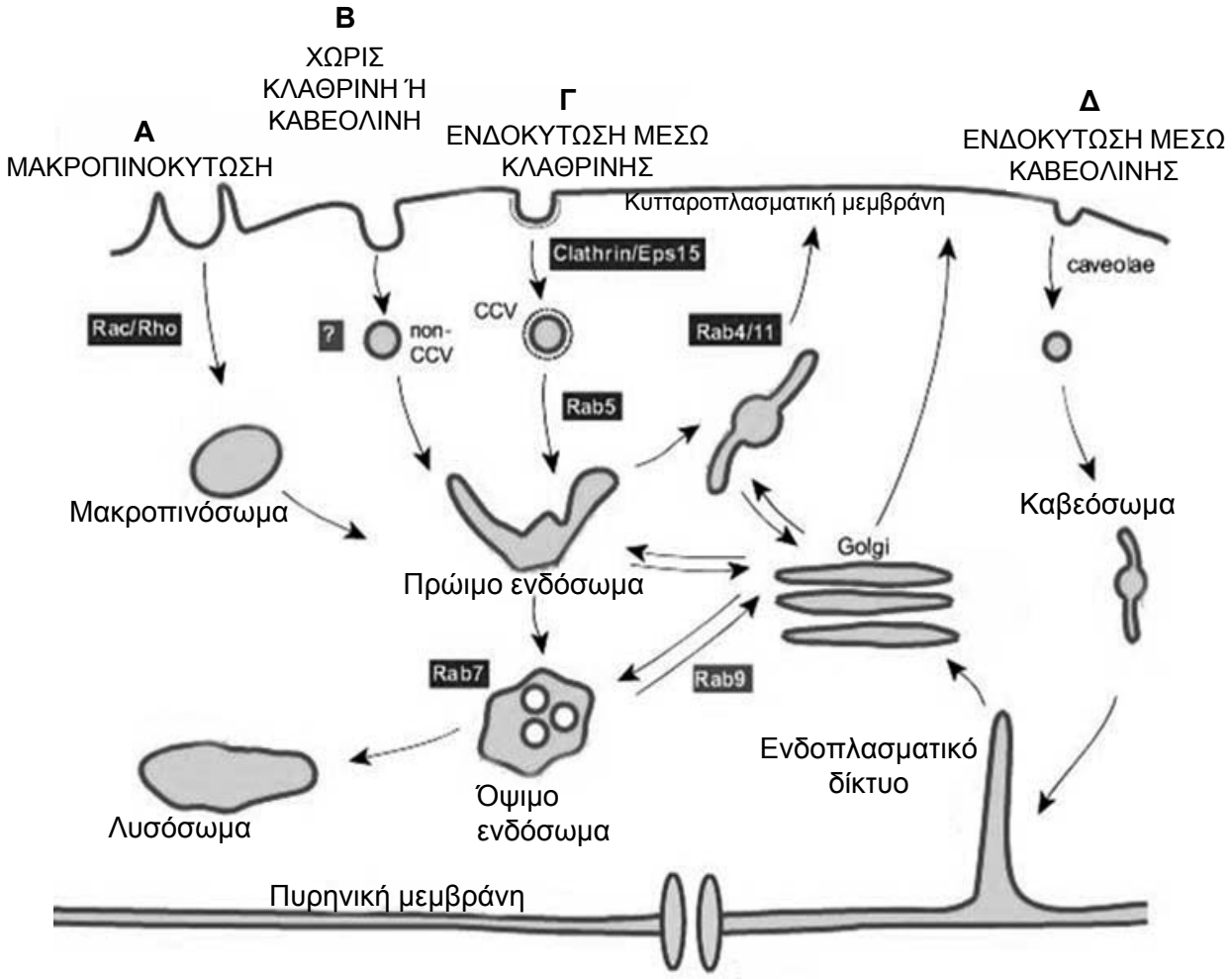
αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα όχι μόνο του ιού της ηπατίτιδας C αλλά όλων των RNA ιών που έχουν μελετηθεί έως τώρα. Η αντιγραφή μπορεί να λαμβάνει χώρα σε μεμβράνες που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi, τα μιτοχόνδρια ή και τα λυσοσώματα, ανάλογα με τον ιό. Ο ρόλος των μεμβρανών στην σύνθεση του ιικού RNA δεν έχει κατανοηθεί επαρκώς. Μπορεί να περιλαμβάνει την φυσική υποστήριξη και οργάνωση του συμπλέγματος της αντιγραφής, την διαμερισματοποίηση και τοπική συγκέντρωση των προϊόντων του ιού, την συγκράτηση του ιικού RNA κατά το ξετύλιγμα, την προμήθεια με λιπιδικά συστατικά στοιχεία σημαντικά για τον πολλαπλασιασμό, καθώς και την προστασία του RNA από αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή που εξαρτώνται από την παρουσία δίκλωνων μορίων (gene silencing).

Πρόσφατα αποδείχθηκε μία σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ της αντιγραφής του RNA του HCV και του μεταβολισμού των λιπιδίων, πιθανότατα μέσω της διακίνησης και της σύνδεσης πρωτεϊνών του ιού και του ξενιστή με τις ενδοκυττάριες μεμβράνες. Στην κυτταροκαλλιέργεια, η αντιγραφή του RNA του HCV διεγείρεται από κορεσμένα μονο-ακόρεστα λιπαρά οξέα, και αναστέλλεται από τα πολυακόρεστα ή από καταστολή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα αυτά υπονοούν ότι η ρευστότητα της μεμβράνης είναι σημαντική για την λειτουργία του συμπλέγματος της αντιγραφής και πως ο φαρμακολογικός χειρισμός του μεταβολισμού των λιπιδίων μπορεί να αποτελέσει μία θεραπευτική προσέγγιση της λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας C (6,62).

1.2.7. ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ, ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟΥ

Πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τα όψιμα στάδια του κύκλου ζωής του ιού, καθώς μόνο πολύ πρόσφατα αναπτύχθηκε το σύστημα με το οποίο μπορούν πλέον να μελετηθούν συστηματικά (63,64). Στα στάδια αυτά εμπλέκονται η NS2 και πιθανώς και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες, όπως και ακόμη μη προσδιορισμένες δομές RNA. Τα ιικά σωματίδια κατά πάσα πιθανότητα σχηματίζονται με εκβλάστηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ή σε κυτταρικό διαμέρισμα προερχόμενο από το ενδοπλασματικό δίκτυο, και βγαίνουν από το κύτταρο μέσω του εκκριτικού μονοπατιού (6,35). Έχει προταθεί πιθανός σύνδεσμος μεταξύ του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και της συγκρότησης και απελευθέρωσης του ιού. Στην εικόνα 12 παρουσιάζεται το πρόσφατο μοντέλο της συγκρότησης στην περιοχή γύρω από τα λιποσταγονίδια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 13 : Είδη ενδοκύτωσης (65).

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί μηχανισμοί εισόδου, η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης (clathrin-mediated endocytosis) (Γ), η ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (caveolin-mediated endocytosis) (Δ), η ενδοκύτωση που δεν εμπλέκει ούτε κλαθρίνη ούτε καβεολίνη (non clathrin non caveolin-mediated endocytosis) (Β) και η μακροπινοκύτωση (macropinocytosis) (Α).

2. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ

2.1.ΓΕΝΙΚΑ

Το κύτταρο για τη σωστή λειτουργία του χρειάζεται να επικοινωνεί με τον εξωκυττάριο χώρο και να ανταλλάσσει ουσίες-πληροφορίες. Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους είναι δυνατόν να μετακινηθούν μόρια, η ελεύθερη διάχυση (παθητικά), η υποβοηθούμενη διάχυση και η ενεργή μεταφορά (ενεργητικά). Η ελεύθερη διάχυση ουσιών εξαρτάται από τη 'διαφορά συγκέντρωσης' της ουσίας έξω και μέσα από την πλασματική μεμβράνη, και πραγματοποιείται χωρίς την κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο. Τα άλλα δυο είδη χρειάζονται ενέργεια με τη μορφή ATP.

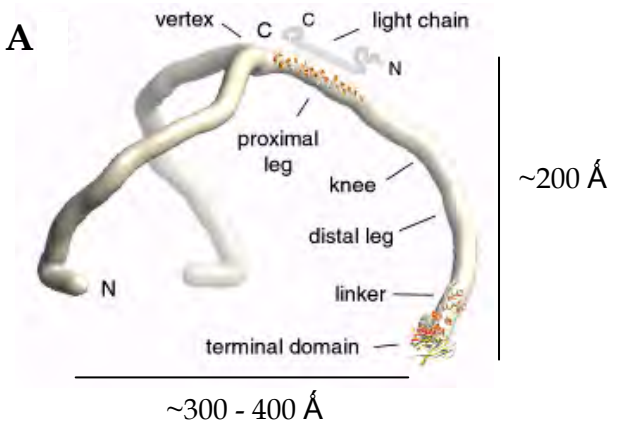
Τα μεγάλα μόρια-σωματίδια (›250nM) εισέρχονται στο κύτταρο μέσω φαγοκύτωσης. Σε κάποιους οργανισμούς όπως στα πρωτόζωα η φαγοκύτωση αποτελεί το μοναδικό τρόπο πρόσληψης τροφής. Μικρότερα μόρια αλλά και διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης. Υπάρχουν διάφορα είδη ενδοκύτωσης που έχουν ονομαστεί ανάλογα με τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν (εικόνα 12). Πιο γνωστή και πιο μελετημένη είναι η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης (clathrin-mediated endocytosis) και ακολουθεί η ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (caveolin-dependent endocytosis) και η μακροπινοκύτωση (macropinocytosis). Τα τελευταία χρόνια όμως είναι αποδεκτό πως υπάρχει και ένας νέος επιπλέον μηχανισμός εισόδου στο κύτταρο που δεν χρειάζεται ούτε κλαθρίνη ούτε καβεολίνη (non-clathrin non-caveolin depedent endocytosis) για τον οποίο δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αρκετές πληροφορίες (65).

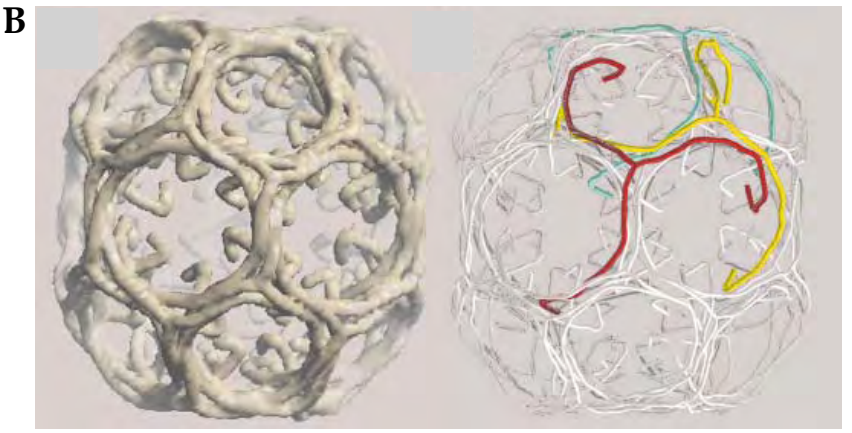
2.2. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΚΛΑΘΡΙΝΗΣ (Clathrin-mediated endocytosis)

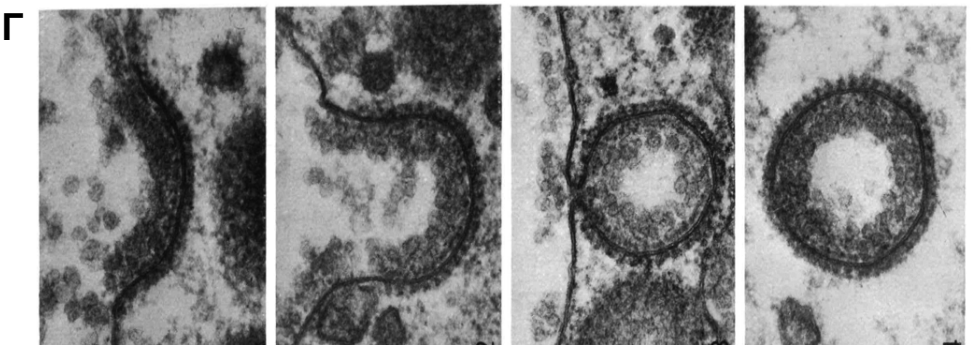
2.2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η λέξη κλαθρίνη (clathrin) προέρχεται από την ελληνική λέξη 'κλήθρα' (γένος κυπελλοφόρων παραποτάμιων δέντρων) και μαζί με άλλες πρωτεΐνες δημιουργεί ένα 'καλάθι' στο οποίο πακετάρονται οι προς ενδοκύτωση πρωτεΐνες. Η ύπαρξη κυστιδίων με καλυμμένες από κλαθρίνη εσοχές πρωτοαναφέρθηκε το 1964 από τους Roth και Porter, οι οποίοι τα παρατήρησαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ενώ μελετούσαν την είσοδο πρωτεϊνών αυγού σε ωοκύτταρα κουνουπιών (66). Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και από άλλα εργαστήρια, όμως εκείνη που μέσω διαφόρων βιοχημικών αναλύσεων κατάφερε να απομονώσει την βαριά πολυπεπτιδική αλυσίδα της κλαθρίνης είναι η Δρ. Pearse το 1975 που αποτελεί και την 'νονά' της πρωτεΐνης μιας και σε αυτήν οφείλεται η συγκεκριμένη ονομασία (67). Ακολούθησε η ανακάλυψη της ελαφριάς πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η οργάνωση της σε τριμερή κατά την δεκαετία του 1980. Από τότε έχουν υπάρξει αρκετές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212







Εικόνα 14 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής της κλαθρίνης (clathrin).

Α : Τρισδιάστατη αναπαράσταση του τρισκελίου της κλαθρίνης που προέρχεται από αναδόμηση φωτογραφιών κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (68).

Β : Θέση του τρισκελίου κλαθρίνης πάνω σε κυστίδιο που φέρει κάλυμμα κλαθρίνης (clathrin coated pits). Η σχηματική αναπαράσταση βασίστηκε σε φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (68).

Γ : Διαδικασία σχηματισμού κυστιδίου με κάλυμμα κλαθρίνης (69).

μελέτες και επομένως και αρκετές πληροφορίες για την δομή και τη λειτουργικότητα όχι μόνο της πρωτεΐνης αλλά και όλων των εμπλεκόμενων συστατικών (68).

2.2.2. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

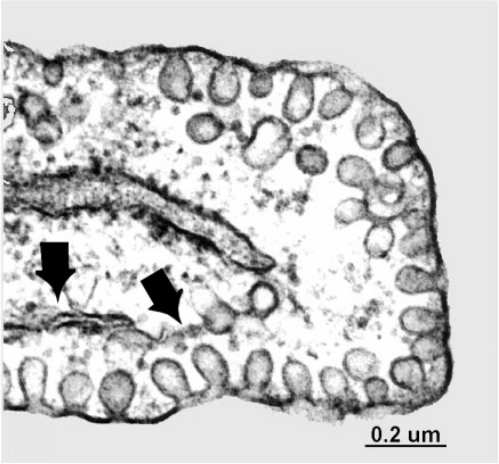
Η κλαθρίνη είναι μια αρκετά συντηρημένη πολυπρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις βαριές (~180kDa) και τρεις ελαφριές (~35-40kDa) πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Μαζί δημιουργούν μια τρίποδη δομή που ονομάζεται τρισκελές (triskelion) και έχει μοριακό βάρος περίπου 650 kDa (68). Τα 'πόδια' του τρισκελούς θεωρούνται ιδιαίτερα ευέλικτα, ώστε να μπορούν να προσαρμοστούν στις πεντάγωνες η εξάγωνες πλευρές των κυστιδίων δημιουργώντας ένα δικτύωμα (lattice) (εικόνα 14). Εκτός από την κλαθρίνη, στα συγκεκριμένα κυστίδια υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται προσαρμοστές (adapters) και αλληλεπιδρούν με την κλαθρίνη. Από αυτές οι πιο γνωστές είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας AP (Assembly Polypeptide) και β-αρρεστίνες (β-arrestin) (68).

2.2.3. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΣΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΚΑΛΥΜΜΑ ΚΛΑΘΡΙΝΗΣ

Η διαδικασία ξεκινάει με την πρόσδεση σε κάποιο υποδοχέα ενός μορίου-σωματιδίου το οποίο πρόκειται να εισέλθει στο κύτταρο. Αυτό λειτουργεί ως σήμα για την αύξηση της συγκέντρωσης της κλαθρίνης και διαφόρων άλλων πρωτεϊνών (μεταξύ των οποίων και πρωτεΐνες προσαρμοστές) κοντά στην περιοχή εισόδου με σκοπό το σχηματισμό του δικτυώματος. Ακολουθεί εγκόλπωση της πλασματικής μεμβράνης προς το εσωτερικό του κυττάρου, με τη συμμετοχή τρισκελών κλαθρίνης. Τέλος, το κυστίδιο απελευθερώνεται στο εσωτερικό (εικόνα 14-Γ) και έχει μέγεθος περίπου 100nm (69). Σημαντικό ρόλο κατά την εκβλάστηση του κυστιδίου παίζει μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη περίπου 900 αμινοξέων η οποία προσδένεται στο 'λαιμό' της καλυμμένης εσοχής και ρυθμίζει τη σύσφιξη στο σημείο αυτό μέχρι να αποκοπεί το κυστίδιο από την μεμβράνη. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάζεται δυναμίνη (Dynamin) (68).

Παράλληλα, μια σειρά από GTP-προσδένουσες πρωτεΐνες (GTP-binding proteins) επηρεάζουν τόσο το ρυθμό σχηματισμού του κυστιδίου όσο και την στόχευση του. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να βρίσκονται σε δυο καταστάσεις διαμόρφωσης, είτε μια ενεργή στην οποία έχουν προσδέσει GTP είτε ανενεργή με προσδεδεμένο GDP. Σε αυτές ανήκει και η οικογένεια των Rab-GTPασών, που αποτελείται από μικρές πρωτεΐνες περίπου 200αα. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν πολλές διαφορετικές Rab πρωτεΐνες καθεμία από τις οποίες προσδένονται στην επιφάνεια κάποιου οργανιδίου (70). Πιο γνωστές είναι η Rab5 που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 15 : Καβεοσώματα (caveosomes) (74).

Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε επιθηλιακά κύτταρα.

συναντάται στην επιφάνεια των πρώιμων ενδοσωμάτων και η Rab7 στα όψιμα ενδοσώματα, οι οποίες θα περιγραφούν με λεπτομέρεια στις παρακάτω παραγράφους.

2.2.4. ΤΡΑΝΣΦΕΡΡΙΝΗ

Η τρανσφερρίνη (transferrin) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη του αίματος που μεταφέρει σίδηρο σε όλους τους ιστούς. Αρχικά η πρωτεΐνη δεν φέρει σίδηρο και ονομάζεται αποτρανφερρίνη (apo-transferrin). Με την πρόσδεση όμως δύο ιόντων σιδήρου (Fe^{3+}), δημιουργείται η σιδηροτρανσφερρίνη ή σιδηρομεταφορίνη (fero-transferrin). Στην κατάσταση αυτή η τρανσφερρίνη προσδένεται στον υποδοχέα και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης. Όταν το σύμπλοκο υποδοχέας-σιδηροτρανσφερρίνης φτάσει στα ενδοσώματα, η αλλαγή του pH θα επαναφέρει την τρανσφερρίνη στην αρχική της κατάσταση. Στη συνέχεια μεταφέρεται στο 'ενδόσωμα ανακύκλωσης' (recycling endosome) και επιστρέφει στον εξωκυττάριο χώρο. Η ενδοκύτωση γίνεται μέσω κλαθρίνης και επειδή αποτελεί μία πολύ καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία, η πρωτεΐνη αυτή χρησιμοποιείται ως μάρτυρας σε πειράματα προσδιορισμού ενδοκύτωσης (71,72).

2.3. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΜΕΣΩ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗΣ (Caveolin-mediated endocytosis)

Η ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης εντοπίστηκε πριν περίπου 40 χρόνια, όταν σε φωτογραφίες μικροσκοπίου ενδοκύτωσης παρατηρούνταν κυστίδια που δεν είχαν την χαρακτηριστική μορφή των αντίστοιχων με κλαθρίνη και που επιπλέον ήταν πιο μικρά (50-80nm). Η ενδοκύτωση γίνεται μέσω μικρών εσοχών της μεμβράνης που περιέχουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη καβεολίνη (caveolin). Κάθε εγκόλπωση θεωρείται πως περιέχει 144 μόρια από αυτή την πρωτεΐνη. Το κυστίδιο που δημιουργείται ονομάζεται καβεόσωμα (caveosome) (εικόνα 15) (73-75).

Η οικογένεια των καβεολινών περιλαμβάνει τις καβεολίνη -1, -2 και -3, όλες με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 21 έως 24kDa. Από αυτές η καβεολίνη –1 και -3 έχουν την ικανότητα να επάγουν το σχηματισμό των καβεοσωμάτων, ενώ ο ρόλος της καβεολίνης -2 είναι υποστηρικτικός. Η δημιουργία καβεοσωμάτων είναι ένα χαρακτηριστικό αρκετών ειδών κύτταρων όχι όμως όλων. Για παράδειγμα η κυτταρική σειρά Huh7, μία από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, δεν παράγει την συγκεκριμένη πρωτεΐνη (76). Η καβεολίνη -1 προσδένεται στην χοληστερόλη (cholesterol) ενώ έχει αποδειχτεί ότι τα καβεοσώματα είναι πλούσια σε χοληστερόλη, υποδηλώνοντας μια πιθανή συμμετοχή της στην μεταφορά λιπιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο (73). Επιπλέον αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες όπως GTP-προσδένουσες πρωτεΐνες (GTP-binding

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

proteins), μετατρέποντας τα καβεοσώματα σε σημαντικά οργανίδια του κύτταρου και όχι σε απλά 'μέσα μεταφοράς' (73-75).

2.4. ΜΑΚΡΟΠΙΝΟΚΥΤΩΣΗ

Η μακροπινοκύτωση (macropinocytosis) αποτελεί ένα είδος ενδοκύτωσης που συντελείται συνήθως στα μακροφάγα κύτταρα. Τα μακροπινοσώματα (macropinosomes) δημιουργούνται από την ίδια την μεμβράνη και μπορούν να φτάσουν σε μέγεθος τα 5μm. Μοιράζεται αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με την φαγοκύτωση, όπως την αναγκαιότητα ενός ακέραιου κυτταρικού σκελετού και κυρίως μικροϊνιδίων ακτίνης (77). Παρόλα αυτά, πρόκειται για διαφορετική οδό εισόδου στο κύτταρο και παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Συνήθως χρησιμοποιείται για μεταφορά υγρών και διαλυτών σε μεγάλες ποσότητες για διάφορες 'επείγουσες' κυτταρικές διεργασίες, ενώ τις περισσότερες φορές τα μακροπινοσώματα καταλήγουν και πάλι στην κυτταρική μεμβράνη, κάτι που δεν συμβαίνει στην φαγοκύτωση. Η συγκεκριμένη μέθοδος εισόδου δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί.

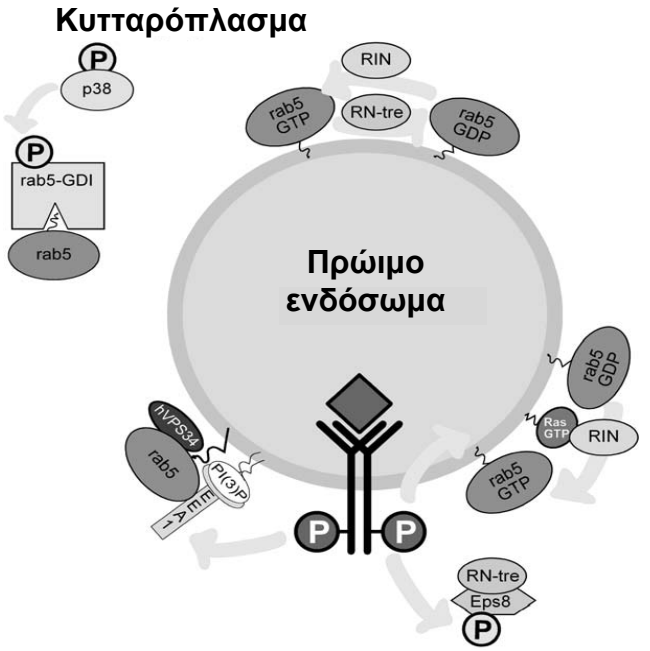
2.5. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΚΛΑΘΡΙΝΗ ΚΑΙ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ (Non clathrin non caveolin-mediated endocytosis)

Έχει παρατηρηθεί με φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αλλά και με άλλες τεχνικές πως κάποια μόρια-σωματίδια ενδοκυταρώνονται ανεξάρτητα από την κλαθρίνη ή την καβεολίνη. Δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το συγκεκριμένο τρόπο εισόδου, υπάρχουν όμως κάποιες περιπτώσεις, κυρίως ιών, που ίσως στο μέλλον να αποτελέσουν μοντέλο μελέτης όπως ο ιός των θηλωμάτων (παπιλλωμαϊός τύπου 16–papillomavirus type 16) (78).

2.6. ΠΡΩΙΜΟ ΕΝΔΟΣΩΜΑ

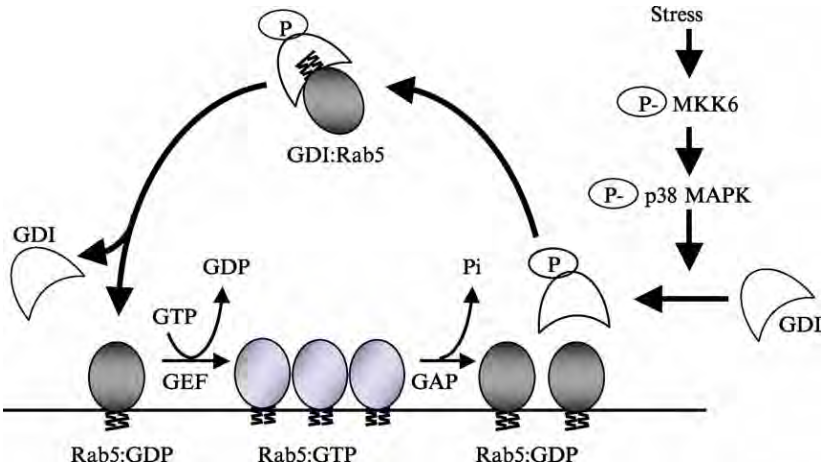
Όλοι οι μηχανισμοί εισόδου που περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους καταλήγουν σε ένα οργανίδιο, το πρώιμο ενδόσωμα (early endosome) (εικόνα 16). Το διαμέρισμα αυτό αποτελεί ένα πολύπλοκο σύμπλεγμα κυστιδίων μεμβρανικής φύσεως που εντοπίζονται ακριβώς κάτω από τη πλασματική μεμβράνη και βασικό τους χαρακτηριστικό αποτελεί το όξινο pH. Υπάρχουν στην μεμβράνη τους ειδικές αντλίες H^+ που απορροφούν ιόντα H^+ προς το εσωτερικό και ονομάζονται ATPασες V-τύπου. Χάρη σε αυτές το pH μπορεί να περάσει από το 7.2 (ουδέτερο) στο 6 (όξινο). Η συγκεκριμένη αλλαγή χρησιμεύει στο σύμπλοκο υποδοχέα-μόριο (που έχει ενδοκυταρωθεί) ώστε να αποδεσμευτεί το φορτίο από τον υποδοχέα. Αυτό οφείλεται σε δομικές αλλαγές των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών λόγω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση ενός πρώιμου ενδοσώματος (early endosome) (82).

Στην μεμβράνη του πρώιμου ενδοσώματος υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην σωστή λειτουργία του.



Εικόνα 17 : Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής του GDP σε GTP μέσω της πρωτεΐνης GDI, η λειτουργία της οποίας εξαρτάται από το μονοπάτι σηματοδότησης p38 (85).

του όξινου περιβάλλοντος. Τη συγκεκριμένη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία εκμεταλλεύονται και αρκετοί ιοί ώστε να εισέρχονται στο προς μόλυνση κύτταρο.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 πάνω στο πρώιμο ενδόσωμα αγκυροβολούν διάφορες πρωτεΐνες χρήσιμες για την λειτουργία του. Οι δυο πιο μελετημένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια του πρώιμου ενδοσώματος είναι η Rab-GTPαση Rab5 (Ras Analogue in Brain) και η πρωτεΐνη EEA1 (Early Endosome Antigen-1). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν την ύπαρξη πληθυσμών ενδοσωμάτων με διαφορετικές πρωτεΐνες στις μεμβράνες τους που χρησιμοποιούνται για την ενδοκύτωση διαφορετικών μορίων-σωματιδίων (79). Επίσης διαφορετικά ενδοσώματα υπάρχουν στα νευρικά κύτταρα που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά των σημάτων κατά μήκος των αξόνων (80) καθώς και στα φυτικά κύτταρα (81).

2.6.1. RAB5

Η πρωτεΐνη Rab5 (Ras Analogue in Brain), αποτελεί μια σημαντική πρωτεΐνη για το πρώιμο ενδόσωμα και ελέγχει βασικές του λειτουργίες όπως τη συγχώνευση με άλλα ενδοσώματα, τη μετακίνηση του μέσω του κυτταρικού σκελετού καθώς και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών (70,83,84). Μπορεί να βρίσκεται είτε σε ενεργή μορφή με προσδεδεμένο GTP είτε σε ανενεργή με GDP. Από την ρύθμιση αυτών των δύο καταστάσεων της πρωτεΐνης εξαρτάται και η σωστή λειτουργία του πρώιμου ενδοσώματος. Η ρύθμιση πραγματοποιείται από μια άλλη πρωτεΐνη τη GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), η λειτουργία της οποίας (εικόνα 17) εξαρτάται από τη πρωτεΐνη p38 του μονοπατιού σηματοδότησης MAPK-p38 (περιγραφή του ακολουθεί στα επόμενα κεφάλαια) (85). Έχει αποδειχτεί ότι η Rab5 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων και η EEA1 (Early Endosome Antigen-1), μια μεγάλη διμερής πρωτεΐνη που περιλαμβάνει δυο δακτυλίους ψευδαργύρου και δυο περιοχές πρόσδεσης στη Rab5 στα άκρα (86). Θεωρείται πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη λειτουργεί ως γέφυρα ανάμεσα σε δυο μόρια πρωτεΐνης Rab5 διαφορετικών ενδοσωμάτων ώστε να συγχωνευτούν. Η EEA1 φωσφορυλιώνεται και αυτή από την p38 πρωτεΐνη αλλά αποτελεί μια διαδικασία που δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (87). Θα πρέπει επίσης να τονιστεί πως τόσο η πρωτεΐνη Rab5 όσο και άλλες πρωτεΐνες του πρώιμου ενδοσώματος ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης MAPK μεταξύ των οποίων και το $ERK_{1/2}$ που θα παρουσιαστούν σε παρακάτω ενότητα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

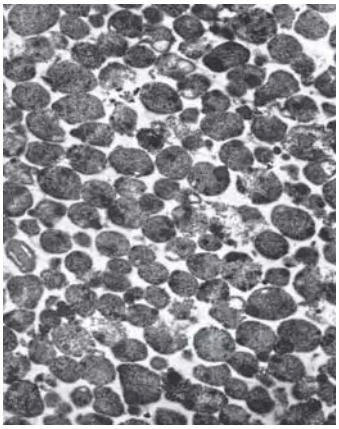
2.6.2. ΚΑΘΕΨΙΝΕΣ Β ΚΑΙ L

Τα ενδοσώματα περιέχουν διάφορα ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται με το χαμηλό pH. Τα πιο γνωστά είναι οι υδροξυλάσες και συγκεκριμένα μια κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζονται καθεψίνες (cathepsins), υπεύθυνες για την πέψη μακρομορίων του κυττάρου. Χωρίζονται σε τρεις ομάδες ανάλογα με την ενεργή περιοχή αμινοξέος, κυστεΐνη, ασπαρτικό και σερίνη. Οι καθεψίνες υπάρχουν και στα όψιμα ενδοσώματα και λυσοσώματα λόγο του χαμηλού pH (88). Η ομάδα των κυστεϊνών που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει δυο πολύ γνωστά μέλη, τις καθεψίνες B και L. Οι πρωτεΐνες αυτές συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με την μορφή προ-καθεψινών και ενεργοποιούνται μετά από υδρόλυση λόγω του χαμηλού όξινου περιβάλλοντος των ενδοσωμάτων (89,90). Οι συγκεκριμένες καθεψίνες έχουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκύτωση διαφόρων ουσιών, συμπλόκων μορίων-υποδοχέων καθώς και ιών. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση ιών που προκαλούν ηπατίτιδα (91,92) αλλά και άλλων που δεν περιλαμβάνουν φάκελο (93) που χρησιμοποιούν τη συγκεκριμένη κυτταρική λειτουργία για να εισέλθουν στα κύτταρα και να τα μολύνουν. Παρουσιάζει δε ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι το συγκεκριμένα ένζυμα είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένα σε περιπτώσεις διαφόρων μορφών καρκίνων (89).

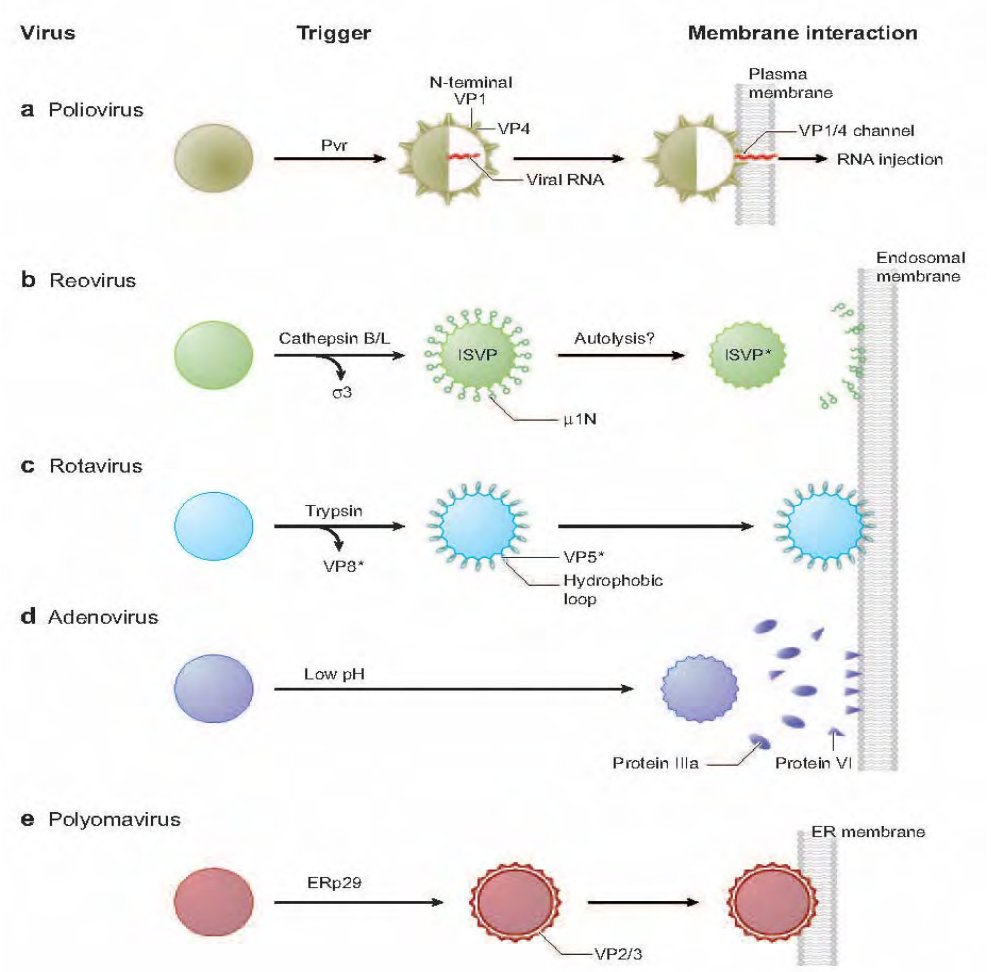
2.7. ΟΨΙΜΟ ΕΝΔΟΣΩΜΑ

Ένα μόριο-υποδοχέας, μετά την είσοδο του στο κύτταρο και την μεταφορά του στα πρώιμα ενδοσώματα, είτε μεταφέρεται στα 'ενδοσώματα ανακύκλωσης' (recycling endosome) και επιστρέφει στη συνέχεια στον εξωκυττάριο χώρο είτε μεταφέρεται στα όψιμα ενδοσώματα (late endosomes) (72). Τα οργανίδια αυτά, όπως και τα πρώιμα, έχουν μεμβρανική υφή, και αντλίες ATPασες V-τύπου, που τους εξασφαλίζουν όξινο pH περίπου 5.5. Εντοπίζονται συνήθως σε κοντινή απόσταση από τον πυρήνα. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για τα όψιμα ενδοσώματα κυρίως επειδή αποτελούν ένα ενδιάμεσο σκαλοπάτι για τα λυσοσώματα, που θεωρούνται πιο σημαντικά. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν πολλές λειτουργίες που φαίνεται να οργανώνονται από τα συγκεκριμένα οργανίδια. Οι περισσότερες από αυτές οφείλονται σε μια Rab-GTPαση, την Rab7. Είναι κοινά αποδεκτό ότι τα λυσοσώματα προέρχονται είτε μετά από παροδική συγχώνευση τύπου 'φιλί και απομάκρυνση' (kiss and run) με τα όψιμα ενδοσώματα είτε μετά από δημιουργία ενός υβριδικού οργανιδίου (94-97). Επιπλέον, έχει προταθεί πως η καθορισμένη 'κυτταρική θέση' των συγκεκριμένων οργανιδίων επηρεάζει διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης (98). Επίσης, έχει βρεθεί πως τα όψιμα ενδοσώματα μπορούν να επικοινωνούν με την κυτταρική μεμβράνη απευθείας, με παράδειγμα την ενδοκύτωση του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 18 : Απομονωμένα λυσοσώματα από ήπαρ μυός (101).



Εικόνα 19 : Διαφορετικοί μηχανισμοί εισόδου ιών χωρίς φάκελο στα κύτταρα στόχους (112).

Αλληλεπίδραση με ειδικούς υποδοχείς (περίπτωση πολυοϊού-poliovirus-**a**), με πρωτεάσες (καθεψίνες B και L, περίπτωση ρεοϊού-reovirus-**b** ή θρυψίνης, περίπτωση ροταϊού-rotavirus-**c**), και επίδραση χαμηλού ενδοσωμικού pH (περίπτωση αδενοϊού-adenovirus-**d**).

μορίου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου ΙΙ (MHC II-Major Histocompatibility class II Molecule) (99) καθώς και τον λεμφοκυτταρικό ιό της χοριομηνιγγίτιδας (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus-LCMV) (100).

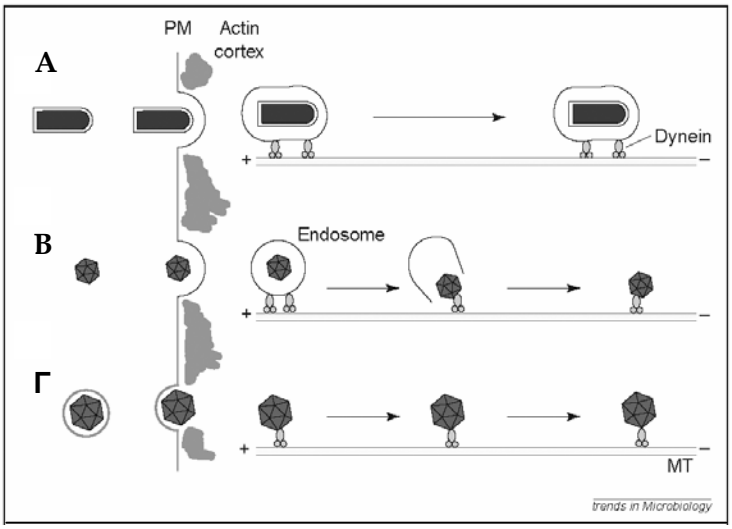
2.8. ΛΥΣΟΣΩΜΑ

Τα λυσοσώματα είναι κυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από στοιχειώδη μεμβράνη και θεωρούνται ως τα κυριότερα οργανίδια πέψης όλων σχεδόν των ευκαρυωτικών κυττάρων. Πρωτοαναφέρθηκαν σε ηπατικά κύτταρα το 1949 από τον Christian de Duve, και ονομάστηκαν το 1955 από τον Alex Novicoff (εικόνα 18). Έχουν μέγεθος από 25nm έως 1μm και ο ρόλος τους είναι η διάσπαση μορίων. Εντοπίζονται αποκλειστικά στην περι-πυρηνική περιοχή και χαρακτηριστικό τους είναι το πολύ χαμηλό pH (4.5) καθώς επίσης και ο μεγάλος αριθμός ενζύμων που περιέχουν. Για την προστασία της μεμβράνης από το υπερβολικά όξινο περιβάλλον και τα υδρολυτικά ένζυμα, τα λυσοσώματα περιβάλλονται εσωτερικά από ισχυρά γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες. Τα λυσοσώματα συμμετέχουν σε ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες, όπως στη θρέψη, την άμυνα, την ανακύκλωση μεταβολιτών, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο (94-97,101).

2.9. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΣΤΟΝ ΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΙΩΝ

Οι ιοί αποτελούν υποχρεωτικά παράσιτα και χρειάζονται κύτταρα για να επιβιώσουν, να πολλαπλασιαστούν και να διαφύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα. Συνήθως εκμεταλλεύονται λειτουργίες που προϋπάρχουν στο κύτταρο. Όλα τα είδη ενδοκύτωσης χρησιμοποιούνται από ιούς ανάλογα με τις πρωτεΐνες που τους περιβάλλουν. Για παράδειγμα, οι ιοί της οικογένειας των φλαβιιών (*flavivirus*) (μεταξύ των οποίων και το πλήρες ιικό σωματίδιο του ιού της ηπατίτιδας C) χρησιμοποιούν την ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης για την είσοδο τους. Επιπλέον, εκμεταλλεύονται το όξινο pH των πρώιμων ενδοσωμάτων ώστε να προκαλέσουν αλλαγές σε γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου και την σύντηξη της μεμβράνης τους με τη μεμβράνη των πρώιμων ενδοσωμάτων (102-109). Άλλοι πάλι χρησιμοποιούν την ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (caveolin) για την είσοδο τους. Χαρακτηριστικότερα παραδείγματα αποτελούν ο ιός 40 των πιθηκοειδών (SV40-Simian virus 40) και ο ιός των θηλωμάτων (παπιλλωμαϊός τύπου 31–papillomavirus type 31) (76,110,111). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η περίπτωση του λεμφοκυτταρικού ιού της χοριομηνιγγίτιδας (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus-LCMV), ενός ιού με φάκελο και γονιδίωμα RNA αρνητικής πολικότητας, ο οποίος εισέρχεται κατευθείαν στα όψιμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 20 : Μοντέλα ιών που χρησιμοποιούν τον κυτταρικό σκελετό κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (115).

Α : Περίπτωση ιού της κυστοειδούς στοματίτιδας (Vesicular Stomatitis Virus-VSV): Μετακίνηση του ιού μέσα στο ενδόσωμα.

Β : Περίπτωση αδενοϊού (Adenovirus): Ο ιός απελευθερώνεται από το ενδόσωμα αλλά εξακολουθεί να χρησιμοποιεί τους μικροσωληνίσκους.

Γ : Περίπτωση ερπητοϊού (Herpes simplex virus): Ο ιός δεν εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης όμως χρησιμοποιεί το κυτταροσκελετό για την μετακίνηση του.

ενδοσώματα του κυττάρου χωρίς να χρειάζεται τα πρώιμα για να προκαλέσει μόλυνση (100). Η ενδοκύτωση δεν αποτελεί χαρακτηριστικό μόνο ιών με φάκελο αλλά και ιών που δεν διαθέτουν. Έχουν την δυνατότητα να εισέρχονται στα πρώιμα ενδοσώματα και να χρησιμοποιούν, όπως και οι ιοί με φάκελο, τις αλλαγές του pH, αλλά και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες προ όφελος τους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν ορισμένοι από αυτούς περιγράφονται σχηματικά στην εικόνα 19 (112).

Στην ενδοκύτωση σημαντικό ρόλο καταλαμβάνει και ο κυτταρικός σκελετός. Είναι αποδεκτό πως η δημιουργία των πρώιμων ενδοσωμάτων εξαρτάται από τα μικροϊνίδια ακτίνης ενώ η μεταφορά των πρώιμων ενδοσωμάτων στα όψιμα και τελικά στα λυσοσώματα από τους μικροσωληνίσκους (113-114). Οι ιοί εκμεταλλεύονται και αυτοί την κυτταρική δραστηριότητα ώστε να μεταφερθούν στο σημείο-κυτταρικό οργανίδιο στο οποίο και θα ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός τους. Παρόλο που η συγκεκριμένη διαδικασία δεν έχει πλήρως χαρακτηριστεί υπάρχουν παραδείγματα ιών που χρησιμοποιούν διαφορετικά τους κυτταρικούς αυτούς μηχανισμούς και παρουσιάζονται στην εικόνα 20 (115).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

3. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

3.1. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

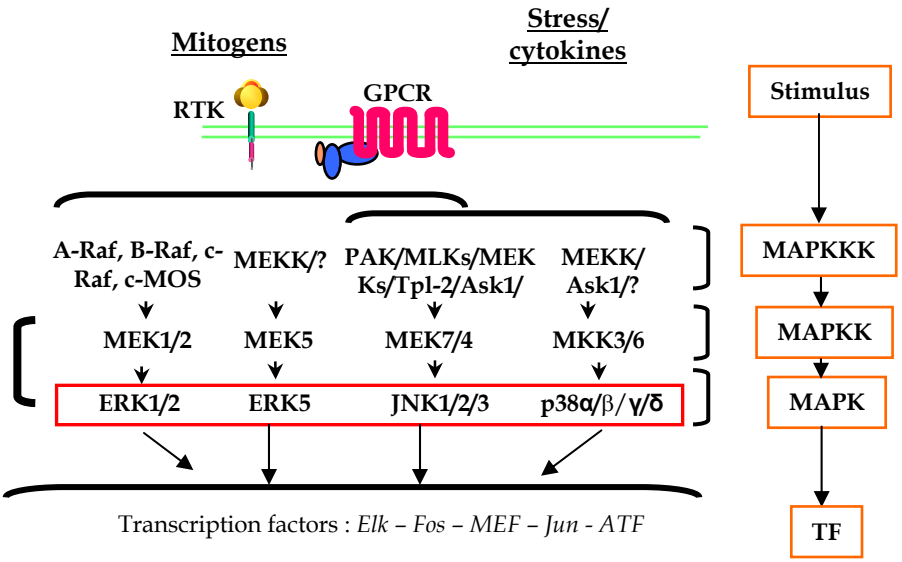
Με τον όρο μεταγωγή σήματος (signal transduction) προσδιορίζονται οι κυτταρικές διεργασίες με τις οποίες ερεθίσματα φυσικής ή χημικής μορφής μπορούν και επάγουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, επιβίωση και διαφοροποίηση. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορούν και ανταποκρίνονται σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών σημάτων (signal) όπως οι στεροειδείς ορμόνες, οι πολυπεπτιδικές ορμόνες και οι κυτταροκίνες.

Η ειδικότητα της κυτταρικής ανταπόκρισης στο σήμα καθορίζεται κυρίως από το είδος του πρωτεϊνικού υποδοχέα (receptor) που εκφράζεται στο κύτταρο. Οι υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στη μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα η το πυρήνα του κυττάρου και μπορούν να συνδέονται επιλεκτικά με βιολογικά σήματα προσδέτες (ligands) προκαλώντας τη διαδοχική ενεργοποίηση ειδικών ενζυμικών αντιδράσεων. Κύρια ενζυμική αντίδραση αποτελεί η φωσφορυλίωση (phosphorylation), δηλαδή η προσθήκη φωσφόρου σε ένα ή περισσότερα επιλεγμένα αμινοξικά κατάλοιπα (τυροσίνη, σερίνη, θρεονίνη) πρωτεϊνικού υποστρώματος, που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο χώρο και επομένως της λειτουργικής της συμπεριφοράς. Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η αποφωσφορυλίωση αποτελούν καθοριστικά γεγονότα για την μεταγωγή του σήματος.

Τα ένζυμα που ευθύνονται για τη δημιουργία φωσφοεστερικών δεσμών ονομάζονται κινάσες (kinases), ενώ τα αντίστοιχα που προκαλούν την υδρόλυση τους αποκαλούνται φωσφατάσες (phosphatases). Ανάλογα με το είδος του αμινοξικού κατάλοιπου που πραγματοποιείται η προσθήκη φωσφόρου, διακρίνονται δυο βασικές κατηγορίες κινασών: οι κινάσες τύπου τυροσίνης (Tyrosine kinase) και οι κινάσες τύπου σερίνης-θρεονίνης (Serine-Threonine kinase). Αντίστοιχες ονομασίες ισχύουν και για τις φωσφατάσες (φωσφατάσες τύπου τυροσίνης ή φωσφατάσες τύπου σερίνης-θρεονίνης).

Είναι πλέον αποδεκτό πως κάθε βιολογικό σήμα αναγνωρίζεται από τον αντίστοιχο υποδοχέα και χαρακτηρίζεται από εξειδικευμένους ενδοκυτταρικούς σηματοδότες (μόρια μεταγωγής σήματος). Η ανταπόκριση του κυττάρου σε αυτό το σήμα διαμορφώνεται τόσο από επικαλυπτόμενα όσο και από ανταγωνιστικά μονοπάτια σηματοδότησης (signal networks/pathways) που μπορούν να ενεργοποιούνται είτε ταυτόχρονα είτε σε διαφορετικές στιγμές.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 21 : Μονοπάτια σηματοδότησης των μιτογονο-ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών (MAPK-Mitogen activated protein kinase).

3.2. ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

3.2.1. EGF

Οι αυξητικοί παράγοντες (growth factors) συνιστούν μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, με κύριο χαρακτηριστικό την δυνατότητα ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Υπάρχουν πολλές τέτοιου είδους πρωτεΐνες όμως στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο EGF (Epidermal Growth Factor). Ο EGF απομονώθηκε για πρώτη φορά από κύτταρα υπογνάθιων σιελογόνων αδένων ποντικιού, ως ένα πολυπεπτίδιο 53 αμινοξέων με ισχυρή 'μιτογόνο' δραστηριότητα σε κύτταρα επιθηλιακών κυττάρων, δηλαδή τη δυνατότητα πρόκλησης μεγάλου αριθμού κυτταρικών διαιρέσεων. Η πρωτεΐνη συνδέεται στον αντίστοιχο υποδοχέα που ονομάζεται 'υποδοχέας EGF' (EGF receptor-EGFR) προκαλώντας τον ομο-διμερισμό των μονομερών του υποδοχέα, τη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων και επομένως την μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου (116,117).

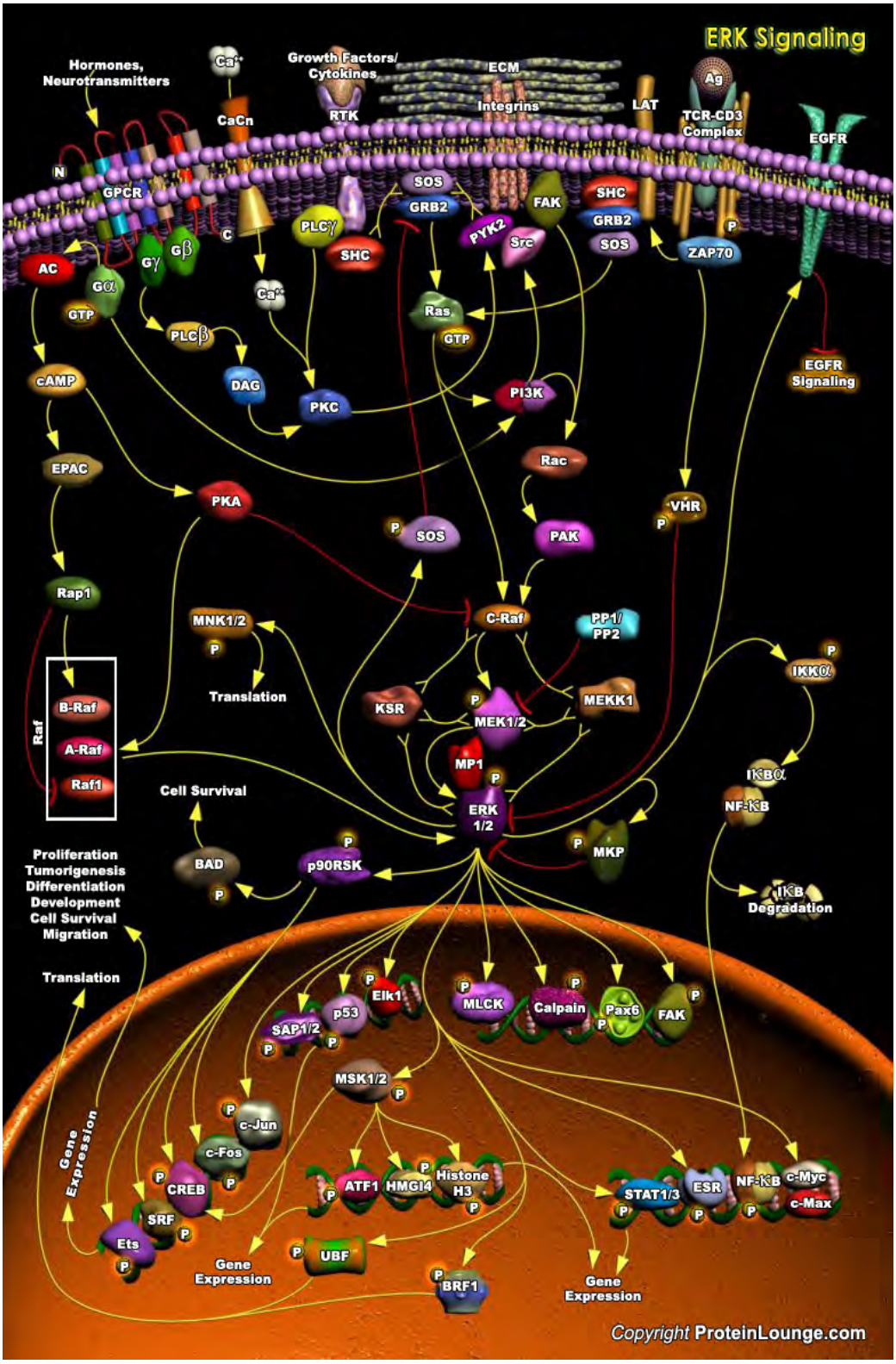
3.3. ΜΙΤΟΓΟΝΟ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ (MAPK-Mitogen activated protein kinases)

3.3.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Μετά την ενεργοποίηση από ένα βιολογικό σήμα, η μετάδοση του μηνύματος στο εσωτερικό του κυττάρου ακολουθεί δυο μονοπάτια, είτε επηρεάζοντας πρωτεΐνες διαβιβαστές στο εσωτερικό που οδηγούν σε μια βραχυπρόθεσμη απάντηση είτε μια πιο μακροπρόθεσμη που θα επηρεάσει διαφορετικές λειτουργίες του κύτταρου. Και οι δυο αυτές καταστάσεις εμπλέκουν διάφορες κινάσες ενώ οι αλληλουχίες των αντιδράσεων αυτών είναι γνωστές ως αλληλουχίες μιτογονο-ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών (Mitogenic Activated Protein Kinases cascade-MAPK cascades) (118). Το κάθε μονοπάτι MAP κινασών περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις διαφορετικές κινάσες πρωτεϊνών οι οποίες φωσφορυλιώνουν η μια την άλλη. Στη δεκαετία του '80 έγινε κατανοητό πως οι MAPKKK (Mitogenic Activated Protein Kinase Kinase Kinase) φωσφορυλιώνουν τις MAPKK (Mitogenic Activated Protein Kinase Kinase) που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις MAPK (mitogenic activated protein kinase). Η ακριβής τους λειτουργία όμως κατανοήθηκε με την αποκωδικοποίηση των πρώτων MAP κινασών στις αρχές της δεκαετίας του '90.

Τα κύτταρα περιέχουν διαφορετικές MAP κινάσες που διαφέρουν ανάλογα με το διεγέρτη, και τις προς φωσφορυλίωση πρωτεΐνες, όμως υπάρχουν μέχρι στιγμής τέσσερα διακριτά μονοπάτια, καθένα από τα οποία ενεργοποιείται από διαφορετικό είδος σήματος και ονομάζεται από το όνομα της τελευταίας κινάσης (εικόνα 21): Το μονοπάτι $ERK_{1/2}$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 22 : Μονοπάτι σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ (www.proteinlounge.com).

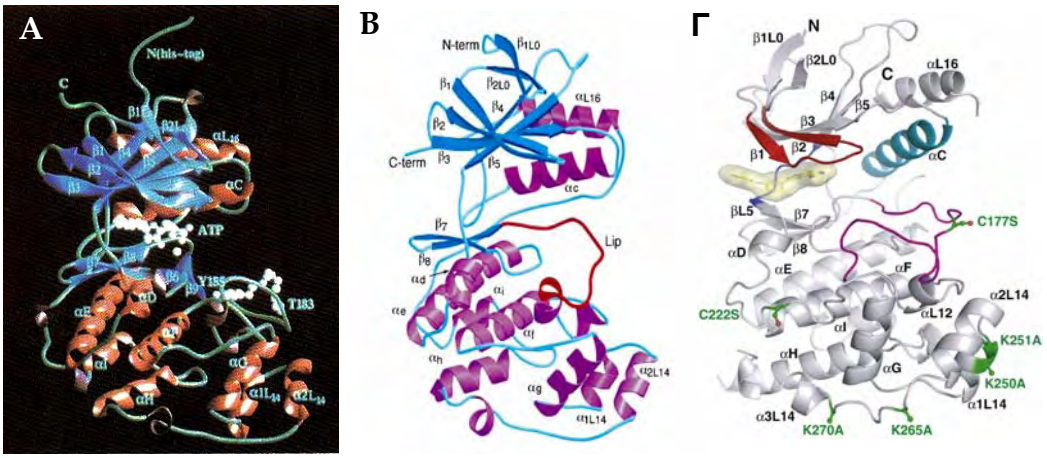
(Extracellular signal-Regulated kinase-από εξωκυττάρια σήματα ρυθμιζόμενη κινάση), το μονοπάτι p38, το μονοπάτι JNK (c-jun NH_2-terminal kinase-κινάση του NH_2-τελικού άκρου του c-jun) και το πιο πρόσφατο μονοπάτι ERK5. Όλα τα μονοπάτια σηματοδότησης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκα και συμμετέχουν σε αυτά εκτός από τις βασικές MAP κινάσες, και αρκετές άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται πρωτεΐνες σκαλωσιάς (scaffold proteins). Η πολυπλοκότητα αυξάνει με το γεγονός ότι υπάρχει διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ τους (cross-talk) και επομένως η μελέτη ενός μόνο σηματοδοτικού μονοπατιού είναι ιδιαίτερα δύσκολη.

3.3.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ (EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE - ΑΠΟ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑ ΣΗΜΑΤΑ ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗ ΚΙΝΑΣΗ)

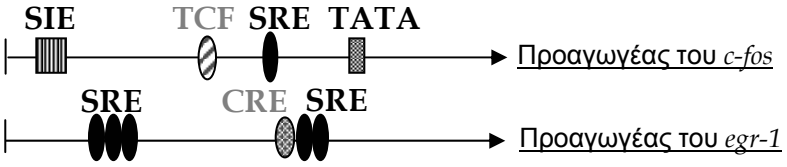
Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αρχίζει με την πρόσδεση ενός μορίου-σωματιδίου στον κατάλληλο υποδοχέα (εικόνα 22). Αυτό προκαλεί την αλληλεπίδραση του ενεργοποιημένου υποδοχέα με την πρωτεΐνη Grb2 (Growth factor Receptor Binding protein 2) η οποία στη συνέχεια συνδέεται με την πρωτεΐνη Sos (Son of Sevenless). Η ενεργός της μορφή αλληλεπιδρά με τον ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σηματοδότη Ras (RAt Sarcoma–σάρκωμα αρουραίων). Πρόκειται για μια μικρή πρωτεΐνη 21kDa η οποία μπορεί να συνδέεται είτε με GTP είτε με GDP και βρίσκεται αγκυροβολημένη με το καρβοξυτελικό της άκρο στη κυτταρική μεμβράνη. Η ενεργοποιημένη Ras-GTP στρατολογεί στη μεμβράνη την πρώτη MAP κινάση (MAPKKK), την κυτταροπλασματική κινάση σερίνης-θρεονίνης που ονομάζεται Raf (RAt Fibrosarcoma-ινοσάρκωμα αρουραίων). Στην πραγματικότητα πρόκειται για μια οικογένεια πρωτεϊνών που αποτελείται από τις A-Raf, B-Raf και Raf-1, που εκφράζονται σε διαφορετικά ποσοστά ανάλογα με το κύτταρο (118,119). Έχουν στο αμινοτελικό τους άκρο δυο διατηρημένες περιοχές που ονομάζονται CR-1 και CR-2, στις οποίες οφείλεται η καταλυτική τους ικανότητα. Σε κατάσταση ηρεμίας η πρωτεΐνη Raf-1 (η πιο μελετημένη από την οικογένεια Raf) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη 14-3-3, η οποία και την σταθεροποιεί. Η Ras ενεργοποιεί παράλληλα και μια φωσφατάση, την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A-Protein Phosphatase 2A), η οποία αποφωσφορυλιώνει την Raf-1 και την απελευθερώνει από την 14-3-3. Η πρωτεΐνη τότε ενώνεται με τα λιπίδια της μεμβράνης και την πρωτεΐνη Ras.

Η δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών τύπου MAP κινάση (MAPKK), είναι οι MEK (MAP/ERK kinase) και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν δύο πρωτεΐνες, η MEK1 και MEK2 (για το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι) που παρουσιάζουν ομοιότητες της τάξεως του 85% και εκφράζονται σε σχεδόν όλα τα ήδη κυττάρων. Παρόλη την ομοιότητα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 23 : Δομή των πρωτεϊνών ERK2 (A), p38 (B) και JNK2 (Γ) (121-123).



Εικόνα 24 : Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικών στοιχείων των προαγωγέων των γονιδίων πρώιμης απόκρισης (Immediate early genes)*c-fos* και *egr-1* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

τους όμως έχει βρεθεί ότι μπορούν να ενεργούν και διαφορετικά (120). Όταν οι πρωτεΐνες MEK είναι ανενεργές, αλληλεπιδρούν με τις ERK1 και ERK2 και φτιάχνουν ένα σύμπλοκο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποιημένη κινάση Raf-1 ενεργοποιεί και φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες MEK στις θέσεις S^{298} και T^{292}. Η φωσφορυλίωση αυτή απελευθερώνει τις πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$ και ταυτόχρονα ενεργοποιεί τις συγκεκριμένες κινάσες ώστε να μπορούν να ενεργοποιήσουν με την σειρά τους τις πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$.

Οι ERK πρωτεΐνες αποτελούν το τελευταίο κομμάτι στο συγκεκριμένο μονοπάτι MAPKινασών. Υπάρχουν επτά διαφορετικά μέλη σε αυτήν την οικογένεια πρωτεϊνών (ERK1-7), με αρκετά κοινά χαρακτηριστικά, όμως στο συγκεκριμένο μονοπάτι σηματοδότησης παίρνουν μέρος μόνο η ERK1 και η ERK2. Έχουν μέγεθος 44 και 42kDa αντίστοιχα, παρουσιάζουν 85% ομοιότητες, και μέχρι στιγμής μόνο η δομή της ERK2 πρωτεΐνης είναι γνωστή (εικόνα 23) (121). Οι πρωτεΐνες αυτές φωσφορυλιώνονται σε δυο γειτονικά αμινοξινικά κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης που διαχωρίζονται από ένα γλουταμικό οξύ (μοτίβο $T^{183}EY^{185}$). Αν και χρειάζεται φωσφορυλίωση και στα δυο αυτά σημεία για να είναι πλήρως ενεργές, έρευνες έχουν αποδείξει πως η μερική φωσφορυλίωση επηρεάζει τη δομή τους και πιθανά μπορούν να έχουν κάποια λειτουργικότητα (124). Η ERK1 και ERK2 μελετώνται σχεδόν πάντα μαζί, παρόλο που έχει προταθεί πως καθεμία παρουσιάζει και διαφορετικό ρόλο (125,126). Όταν οι ERK1 και ERK2 πρωτεΐνες βρίσκονται στη φωσφορυλιωμένη τους μορφή, μπορούν είτε να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα όπου αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες είτε να μετατοπιστούν στον πυρήνα και να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων μεταξύ των οποίων και γονίδια πρώιμης απόκρισης (IEG-Immediate Early Genes). Αν η ενεργοποίηση των $ERK_{1/2}$ είναι βραχυπρόθεσμη τότε και η ενεργοποίηση των γονιδίων είναι παροδική. Σε περίπτωση όμως που η ενεργοποίηση είναι συνεχής τότε τα γονίδια μεταγράφονται για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ο αιτιολογικός μηχανισμός της διάρκειας δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (127). Τα γονίδια πρώιμης απόκρισης που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το *c-fos* και το *egr-1*.

3.3.2.1. Γονίδια πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1*

Το *c-fos* (Feline osteosarcoma virus-οστεοσαρκωματικός ιός αιλουροειδούς) είναι ένα γονίδιο που παράγει μία πρωτεΐνη περίπου 60kDa (c-Fos) που αλληλεπιδρώντας με την c-Jun πρωτεΐνη (Juvana, σαρκωματικός ιός 17 στα ιαπωνικά), δημιουργεί το σύμπλοκο διεγερτικών πρωτεϊνών-1 (AP-1, Activator Protein complex-1). Το συγκεκριμένο σύμπλοκο προωθεί την έκφραση άλλων γονιδίων (128). Η περιοχή του προαγωγέα του *c-fos* όπως

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

φαίνεται και στην εικόνα 24, περιέχει ένα SRE (Serum Response Element), ένα SIE (Sis-Inducible Element) και ένα TCF (Ternary Complex Factor) στοιχείο. Σε αυτές τις περιοχές προσκολλώνται πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την μεταγραφή του γονιδίου (129). Πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι πάντα ενεργοποιημένο σε διάφορα είδη καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος (130,131).

Το *egr-1* (Early Growth Response-1) είναι ένα γονίδιο που παράγει μια πρωτεΐνη-μεταγραφικό παράγοντα με σχηματισμό δακτυλίου ψευδαργύρου. Ο προαγωγέας του γονιδίου περιέχει, μεταξύ άλλων, 3 SRE (Serum Response Element), ακολουθούμενα από ένα CRE (c-AMP Response Element) και ακόμα 2 SRE. Όταν ενεργοποιηθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη προσκολλάται στην αλληλουχία 5'-GCGGGGGCG-3' σε προαγωγείς γονιδίων στόχων και είτε αυξάνει τη μεταγραφή τους είτε την καταστέλλει. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η επιλογή αυτή δεν έχει διευκρινιστεί, όμως εικάζεται ότι τα 3 στοιχεία SRE στην αρχή του προαγωγέα είναι σημαντικά. Όπως και στην περίπτωση *c-fos* έτσι και το *egr-1* γονίδιο έχει βρεθεί ενεργοποιημένο σε αρκετούς καρκίνους και κυρίως σε επιθετικές μορφές (132,133).

3.3.2.2. $ERK_{1/2}$ και μηχανισμός μετάφρασης

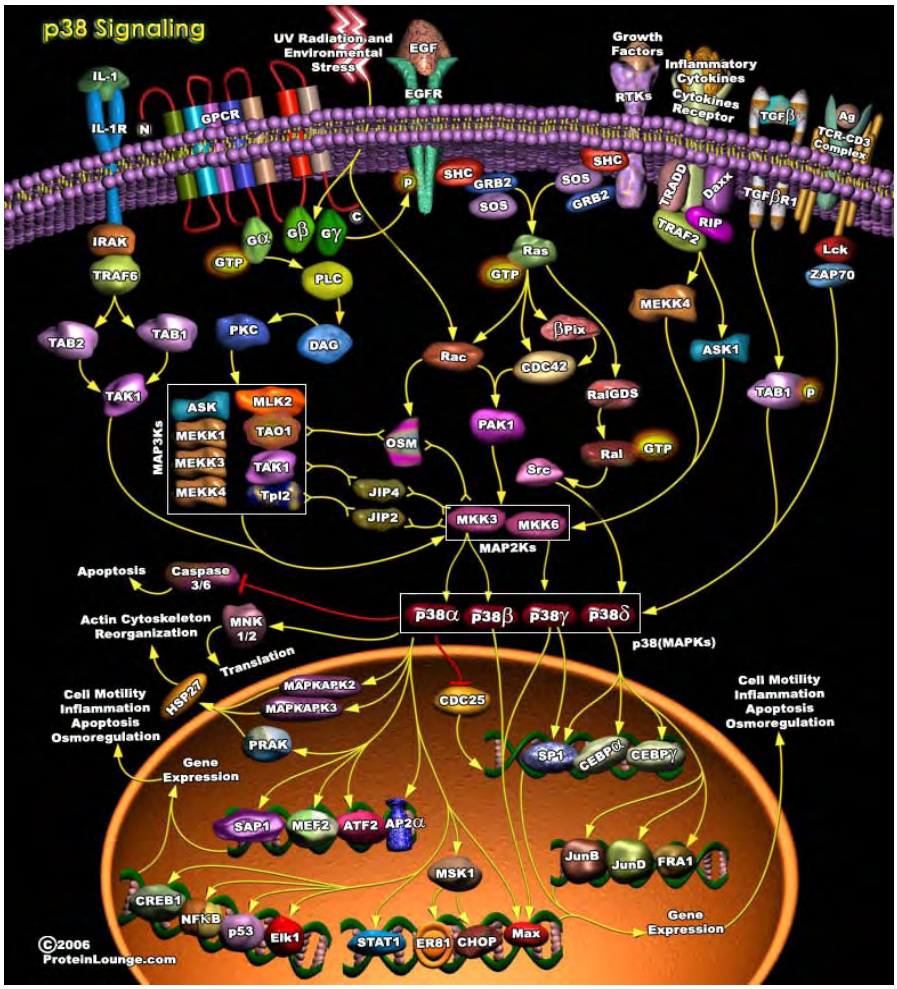
Τα σήματα που ξεκινούν από τους αυξητικούς παράγοντες απαιτούν έναν αυξημένο ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία ενεργοποιώντας την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την πρωτεΐνη MNK-1 (MAP kinase iNtegrating Kinase-1), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τον παράγοντα eIF-4E, που αποτελεί πρωτεΐνη σκαλωσιάς (scaffold protein) στη μετάφραση, επιτρέποντας την πρόσδεση στα υπόλοιπα συστατικά του συμπλόκου και επομένως την αύξηση της μετάφρασης (134). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η MNK-1 είναι στόχος ιών που προσβάλουν την κυτταρική σύνθεση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, ένα γονιδιακό προϊόν του αδενοϊού, η πρωτεΐνη p100, συνδέεται με τον eIF-4G (eukaryotic initiation factor-4G) και εκτοπίζει την MNK-1 έτσι ώστε να παραμένει αμετάφραστο το κυτταρικό mRNA όχι όμως και το ιικό, που λόγω της αύξησης της $ERK_{1/2}$ μεταφράζεται με μεγαλύτερο ρυθμό. Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο γίνεται μια μηχανή παραγωγής ιικών πρωτεϊνών (135,136).

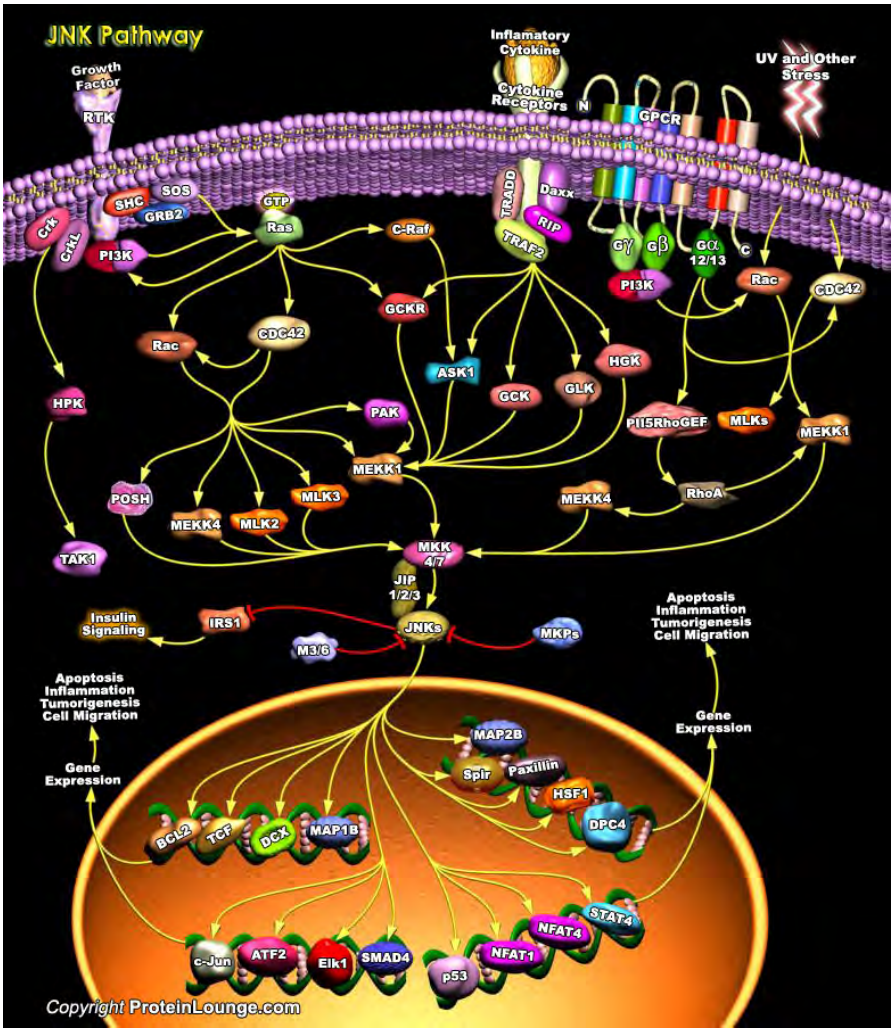
3.3.3. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ p38

Το p38 μονοπάτι είναι γνωστό ως 'στρεσσογόνο μονοπάτι σηματοδότησης'. Σε αυτό οφείλεται η εναλλακτική ονομασία της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως SARK (Stress-activated

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Εικόνα 25 : Σηματοδοτικά μονοπάτια p38 και JNK (www.proteinlounge.com).





protein kinases). Πρόκειται για ένα μονοπάτι που δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Υπάρχουν αρκετές υποψήφιες πρωτεΐνες για την πρώτη MAPK (MAPKKK) του μονοπατιού όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη MINK (MIs-shapen/Nck-interacting Kinases-related kinases) (137). Η ύπαρξη τέτοιας ποικιλίας στις 'εναρκτήριες' πρωτεΐνες οφείλεται πιθανότατα στο είδος του κυττάρου και το βιολογικό σήμα που ενεργοποιεί το συγκεκριμένο μονοπάτι (138) (εικόνα 25). Μετά την ενεργοποίηση της πρώτης MAPK, φωσφορυλιώνονται με την σειρά τους οι πρωτεΐνες MKK3 και MKK6 (MAPK Κινάση 3 και 6), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την p38 πρωτεΐνη. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις ισομορφές p38 πρωτεϊνών (α, β, γ, και δ) η έκφραση των οποίων εξαρτάται από το είδος του κυττάρου (118,138). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μοριακό βάρος περίπου 38kDa και φωσφορυλιώνονται σε αντίστοιχα κατάλοιπα με τις $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες ($T^{180}EY^{182}$) προκαλώντας δομικές αλλαγές. Η κρυσταλλική μορφή της πρωτεΐνης p38 (εικόνα 23) παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την αντίστοιχη της πρωτεΐνης ERK2 (122,139). Όταν ενεργοποιηθεί επηρεάζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με την κυτταρική διαφοροποίηση, τη δημιουργία φλεγμονών και καρκίνων ενώ εμπλέκεται και στην ασθένεια Alzheimer (138).

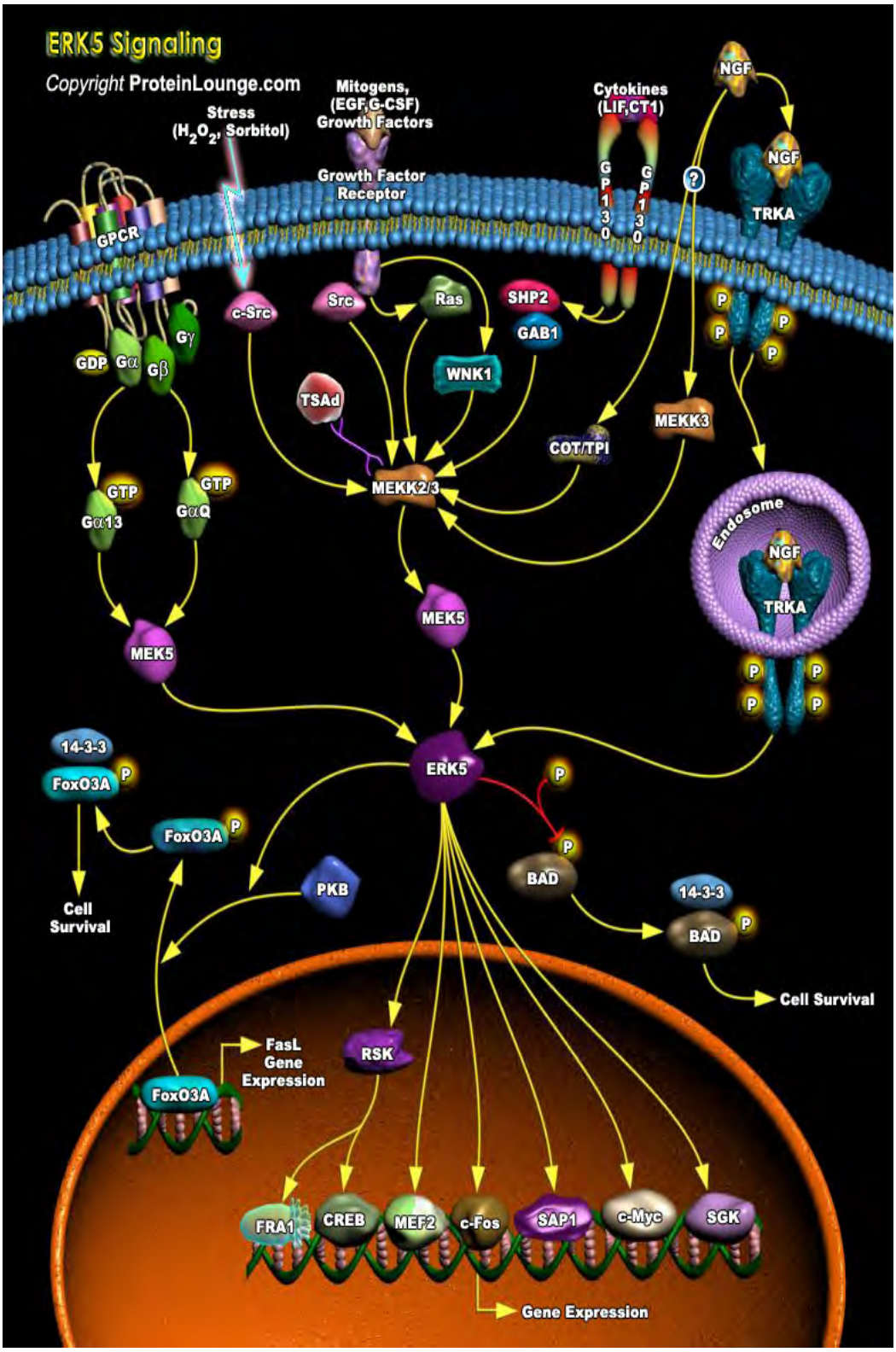
3.3.4. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ JNK (C-JUN NH_2 TERMINAL KINASE – ΚΙΝΑΣΗ ΤΟΥ NH_2 - ΤΕΛΙΚΟΥ ΑΚΡΟΥ ΤΟΥ C-JUN)

Πρόκειται για ένα μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιείται κυρίως από διάφορα είδη ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού στρες (εικόνα 25). Η πρώτη πρωτεΐνη του μονοπατιού είναι η ASK-1 (Apoptosis Signal regulating Kinase-1) και είναι μια MAPKKK που φωσφορυλιώνεται σε αμινοξικά κατάλοιπα σερίνης-θρεονίνης. Σε κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται σαν ομοδιμερές και συνδεδεμένη με διάφορες κατασταλτικές πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και η 14-3-3. Όταν ενεργοποιηθεί αυτοφωσφορυλιώνεται στη θέση T^{838} και ενεργοποιεί τις MAPKK MKK4/MMK7 αλλά και τις MKK3/MKK6. Στη συνεχεία αυτές ενεργοποιούν την πρωτεΐνη JNK που με την σειρά της φωσφορυλιώνει την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη c-Jun (Juvana, σαρκωματικός ιός 17 στα ιαπωνικά), ιδιαίτερα σημαντική για το σύμπλοκο AP-1. Η παρατεταμένη σηματοδότηση της JNK οδηγεί σε απόπτωση (118,140).

3.3.5. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK5

Η πρωτεΐνη ERK5 αναγνωρίστηκε μόλις το 1995 από δυο διαφορετικά εργαστήρια ταυτόχρονα (141,142). Πρόκειται για μια μεγάλη πρωτεΐνη που το αμίνοτελικό της άκρο παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την πρωτεΐνη ERK2, και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 26 : Μονοπάτι σηματοδότησης ERK5 (www.proteinlounge.com).

νευρικά κύτταρα. Περιέχει ένα επιπλέον κομμάτι 396 αμινοξέων στο καρβοξυτελικό της άκρο επομένως είναι αρκετά πιο μεγάλη (~100kDa) και αρχικά ονομάστηκε BMK-1 (Big MAPK-1). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης (a, b και c). Έχει την ιδιότητα να φωσφωρυλιώνεται σε ένα αντίστοιχο μοτίβο με τις ERK1 και ERK2 πρωτεΐνες (TEY). Το καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης περιέχει τα μοτίβα NLS (Nuclear Localization Signal) και NES (Nuclear Export Signal) και επομένως η πρωτεΐνη έχει την δυνατότητα να μετατοπίζεται στον πυρήνα. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα παραμένουν αντικρουόμενα για το κατά πόσο η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρουσιάζει πυρηνικό εντοπισμό και η διαφορά αυτή ίσως να οφείλετε στα είδη των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στις συγκεκριμένες μελέτες (142-147).

Έχει βρεθεί πως η πρωτεΐνη ERK5 φωσφορυλιώνεται από μια πρωτεΐνη της οικογένειας των MEK, την MEK5, που παρουσιάζει περίπου 40% ομοιότητες με τις υπόλοιπες MEK πρωτεΐνες. Υπάρχουν δύο ισομορφές, η α (50kDa) και η β (40kDa), κυταροπλασματικού εντοπισμού, με την πρώτη να είναι κυρίαρχη στη φωσφορυλίωση του ERK5. Στο αμινοτελικό της κομμάτι περιέχει μια περιοχή γνωστή ως PB1 (Phox and Bem1p) με την οποία αλληλεπιδρά η πρώτη MAP κινάση του μονοπατιού, η $MEKK_{2/3}$, φωσφορυλιώνοντας τη σερίνη (θέση 311) και τη θρεονίνη (θέση 315) (εικόνα 26).

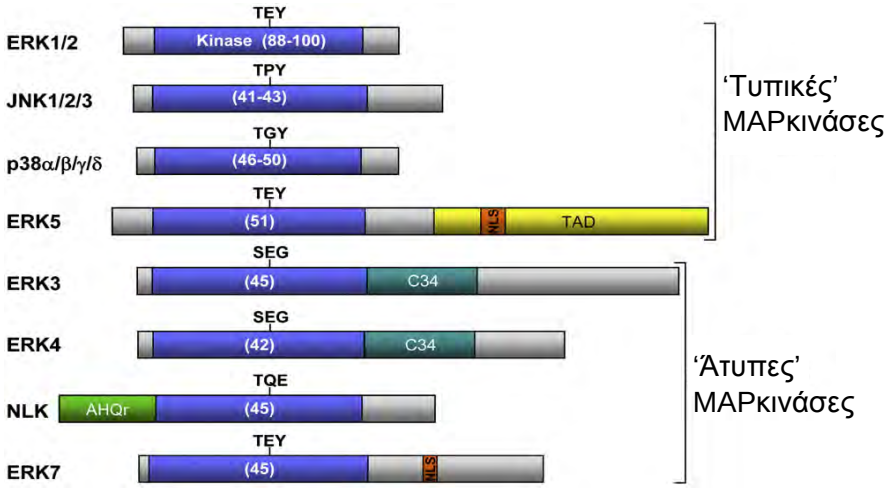
Όπως σε όλα τα μονοπάτια σηματοδότησης των MAP κινασών, υπάρχουν και σε αυτό αρκετές πρωτεΐνες σκαλωσιάς (scaffold proteins) που συμμετέχουν στη σωστή λειτουργία του. Πιο γνωστές είναι οι Lad (Lck-Associated aDaptor), Gab1 (Grb2-Associated Binder-1), Lif (Leukemia Inhibitory Factor) και 14-3-3β, ο ρόλος τους όμως δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (144,148).

Το ERK5 μονοπάτι σηματοδότησης θεωρείται πως επηρεάζει διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και η κυτταρική επιβίωση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης ERK5 είναι πάντα πολύ υψηλά στους καρκίνους. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην αποδεδειγμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού από τη Ras, μεταλλάξεις της οποίας συνδέονται άμεσα με τον καρκίνο. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την εμπλοκή του ERK5 στην αγγειογένεση, λειτουργία αναγκαία για την ανάπτυξη καρκίνου (144,149,150).

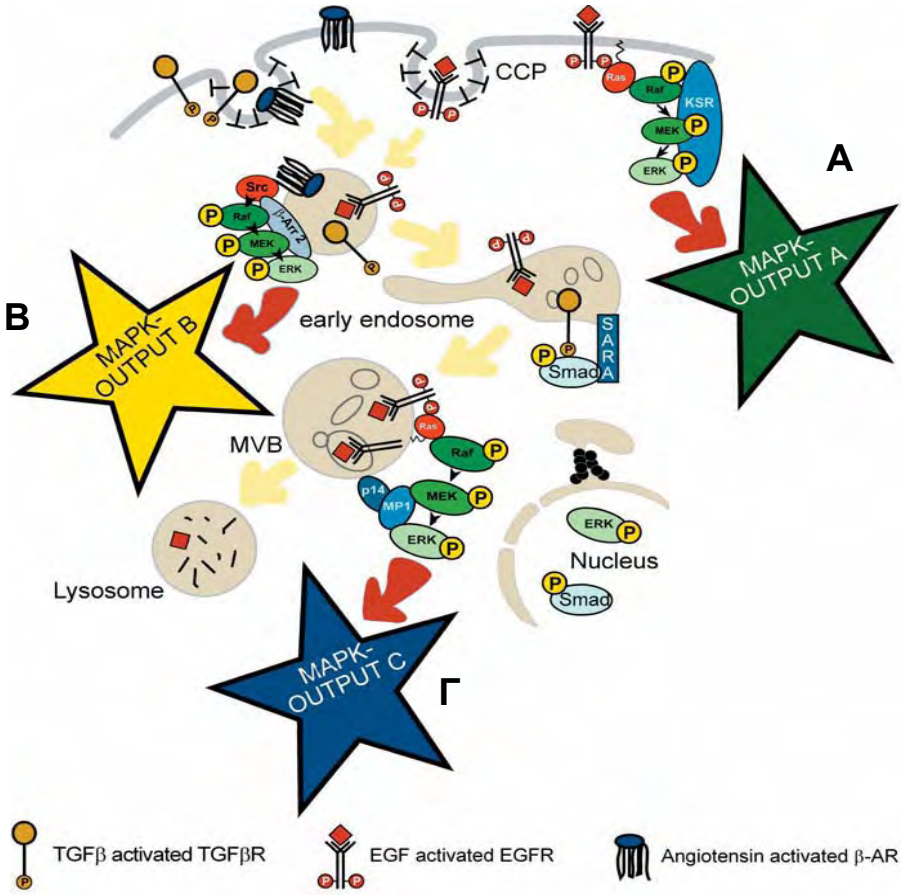
3.3.5.1. MEF2

Το *mef2* (Myocyte Enhancer Factor-2) είναι ένα γονίδιο που έχει αποδειχτεί πως ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK5 (151-153). Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές (*A*, *B*, *C* και *D*) που εκφράζουν πρωτεΐνες που αποτελούν σημαντικούς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 27 : 'Τυπικές' και 'άτυπες' MAP κινάσες (157).



Εικόνα 28 : Οι MAPΚινάσες ενεργοποιούνται κατά την ενδοκύτωση είτε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (A), είτε στα πρώιμα (B) και όψιμα ενδοσώματα (C) (82).

μεταγραφικούς παράγοντες, και ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνών MADS box (Maintenance Agamous Deficiens Serum-response factor). Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν μια MADS box, και μια MEF2 περιοχή (CTA(T/A)4TAR) που μαζί είναι υπεύθυνες για το διμερισμό αλλά και για τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλες πρωτεΐνες, όπως με την οικογένεια των πρωτεϊνών τύπου II HDACs (class II Histone DeACetylases-αποακετυλιωμένες ιστόνες) (154,155). Οι MEF2 πρωτεΐνες φαίνεται να είναι σημαντικές στην κυτταρική λειτουργία διαφοροποίησης σκελετικών και νευρικών κύτταρων. Είναι μάλιστα υπεύθυνες ακόμα και για το σχηματισμό των νευρικών συνάψεων. Επιπλέον έχει βρεθεί πως υπερεκφράζονται κατά την διάρκεια του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (156).

Δυστυχώς δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τον προαγωγέα του γονιδίου, όμως είναι γνωστό ότι υπάρχει μια περιοχή πάνω στην οποία δένεται η πρωτεΐνη MEF2 ώστε να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδιου (154).

3.3.6. ΑΛΛΕΣ ERK ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι MAP κινάσες χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, της 'τυπικές/κανονικές' και 'άτυπες' (εικόνα 27). Η διαφορά τους έγκειται κυρίως στο διαφορετικό μοτίβο φωσφορυλίωσης. Οι 'τυπικές' MAP κινάσες περιγράφηκαν στις προηγούμενες παραγράφους. Στις 'άτυπες' ανήκουν οι πρωτεΐνες ERK3, ERK4, NLK (Nemo-Like Kinase) και ERK7. Τόσο τα μονοπάτια σηματοδότησης τους όσο και οι πρωτεΐνες σκαλωσιάς δεν είναι γνωστές, παρόλα αυτά θεωρείται ότι μπορούν να έχουν ιδιαίτερα σημαντικές λειτουργίες μέσα στο κύτταρο (157).

3.4. ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΚΑΙ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Είναι κοινά αποδεκτό ότι η ενδοκύτωση συνδέεται στενά με την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης. Το βιολογικό σήμα δεν μεταδίδεται στο εσωτερικό του κυττάρου μόνο μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αλλά και μέσω των διαφόρων ειδών ενδοσωμάτων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διάρκεια και η δύναμη του σήματος (82,83,158-162) (εικόνα 28). Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι τα ενδοσώματα αποτελούν το κέντρο διαμερισματοποίησης της κυτταρικής σηματοδότησης επάγοντας μια σχετικά γρήγορη και επιλεκτική ενεργοποίηση και ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν. Η σηματοδότηση αυτή επηρεάζει κυτταρικούς παράγοντες και επομένως και την ίδια την ενδοκύτωση. Όλα τα είδη ενδοκύτωσης που περιγράφηκαν στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής είναι ικανά να προκαλέσουν ενεργοποίηση σε σηματοδοτικά μονοπάτια.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Κατά τη διάρκεια της ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης και πιο συγκεκριμένα τη δημιουργία κυστιδίων με κάλυμμα κλαθρίνης, μια πρωτεΐνη προσαρμοστής (Adaptor Protein), η AP-2 στρατολογείται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η συγκεκριμένη μπορεί και αλληλεπιδρά τόσο με μόρια κλαθρίνης όσο και με μέλη μιας οικογένειας πρωτεϊνών σκαλωσιάς, τις β-αρρεστίνες (β-arrestins). Αυτές οι πρωτεΐνες εκτός από το βασικό τους ρόλο στην ενδοκύτωση, δρουν και ως μεταγωγείς σήματος συνήθως στο μονοπάτι $ERK_{1/2}$ (163,164). Η ενεργοποίηση αυτή, που λαμβάνει χώρα στα ενδοσώματα, πιθανόν να ευνοεί τη φωσφορυλίωση κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων της $ERK_{1/2}$ ή διαφόρων κινασών που να ενεργοποιούν πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Μια άλλη πρωτεΐνη σκαλωσιάς (scaffold protein), η MP-1 (MEK Partner-1) φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού. Έχει την ιδιότητα αλληλεπίδρασης τόσο με την πρωτεΐνη προσαρμογέα p14, που βρίσκεται συνήθως στα όψιμα ενδοσώματα, όσο και με τις πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$, όχι όμως με την Raf (165). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μια άλλη πρωτεΐνη η SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), η οποία βρίσκεται πάνω στα πρώιμα ενδοσώματα και φαίνεται να επηρεάζει το μονοπάτι ενεργοποίησης Smad (166-168).

Μια άλλη πρωτεΐνη, η καβεολίνη (caveolin), απαραίτητη στην ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης, φαίνεται πως ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης (161). Η πρωτεΐνη αυτή έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει τόσο το μονοπάτι ενεργοποίησης $ERK_{1/2}$ όσο και το p38 (160). Παρουσιάζει δε ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι η υπερέκφραση της καβεολίνης οδηγεί στη μείωση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (169).

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες παραγράφους το μονοπάτι p38 φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικό στα πρώτα στάδια της ενδοκύτωσης, και πιθανά στο σχηματισμό των ενδοσωμάτων αφού η φωσφορυλιωμένη μορφή της p38 πρωτεΐνης ελέγχει τη λειτουργία των πρωτεϊνών Rab5 και EEA1 (84,86). Συγκεκριμένα θεωρείται πως η p38 μπορεί να επηρεάζει το ρυθμό της ενδοκύτωσης καθώς και το κυτταροπλασματικό εντοπισμό της Rab5 (84,87). Επιπλέον η πρωτεΐνη Rab5 μπορεί να αλληλεπιδρά με την PI3-κινάση (phosphatidyl inositol 3 kinase) και να ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (83). Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί και η περίπτωση του υποδοχέα Trk (Tropomyosin-Receptor Kinase) των νευρικών κυττάρων που έχει την ιδιότητα να ενδοκυταρώνεται, και να μεταφέρεται στους άξονες. Κατά τη διάρκεια αυτής της μεταφοράς έχει αποδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ERK5, και επομένως ενεργοποιεί το συγκεκριμένο μονοπάτι (170).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

3.5. MAPK ΚΑΙ HCV

Όταν ένα κύτταρο αποτελεί στόχο μιας ουσίας η ενός παθογόνου μικροοργανισμού, συνήθως αντιδρά με αμυντικούς μηχανισμούς παράγοντας τις ανάλογες πρωτεΐνες. Το σήμα για την παραγωγή των 'αμυντικών' αυτών πρωτεϊνών προέρχεται από την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, μεταξύ των οποίων και των αλυσιδωτών αντιδράσεων των MAPKινασών. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα ιών που επηρεάζονται από τα συγκεκριμένα μονοπάτια. Έχει δειχτεί πως ενεργοποιημένες πρωτεΐνες των μονοπατιών μπορούν να επηρεάζουν τόσο βασικές λειτουργίες του ιού όπως η μετάφραση των πρωτεϊνών του και η αντιγραφή του γονιδιώματος του (38,171-173), όσο και κυτταρικές λειτουργίες που συνδέονται με τη μόλυνση (174). Στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας C, υπάρχουν μελέτες για διάφορες ιικές πρωτεΐνες που αποδεικνύουν πως είναι ικανές να επηρεάζουν αυτά τα μονοπάτια.

Η πρωτεΐνη core ενεργοποιεί το μονοπάτι $ERK_{1/2}$ πιθανά λόγω της αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη 14-3-3 και προκαλεί την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου *elk-1* (Ets LiKe gene-1), γνωστό στόχο του μονοπατιού (39,175). Επιπλέον η αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3) και η ενεργοποίηση της κυκλίνης D1 (cyclin D1), έχει συνδυαστεί με την δημιουργία ηπατοκυτταρικού καρκίνου (38). Έχει επίσης αναφερθεί πως επηρεάζει και άλλα μονοπάτια σηματοδότησης όπως το p38 και το JNK (39).

Η μη δομική πρωτεΐνη NS5A έχει αποδειχθεί από το εργαστήριο μας, αλλά και από αλλά, πως εμποδίζει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης $ERK_{1/2}$ (176,177). Το συγκεκριμένο φαινόμενο πιθανά να οφείλεται στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την πρωτεΐνη προσαρμοστή (adaptor protein) Grb2 (178). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ιντερφερόνης. Η NS5A πρωτεΐνη φαίνεται να παρεμποδίζει και την ενεργοποίηση της p38 πρωτεΐνης, όμως το φαινόμενο δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί (179).

Η NS3, μια άλλη μη δομική πρωτεΐνη του ιού, επηρεάζει το JNK (180). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η πρωτεΐνη E2, που παίρνει μέρος στο σχηματισμό του καψιδίου με φάκελο, και που όταν προστεθεί εξωγενώς σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης ενεργοποιεί το $ERK_{1/2}$ μονοπάτι (181,182), ενώ σε T-λεμφοκύτταρα φαίνεται να επηρεάζει τόσο το $ERK_{1/2}$ όσο και το p38 σηματοδοτικό μονοπάτι (183).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΣΚΟΠΟΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Όπως αναφέρθηκε, ο ιός της ηπατίτιδας C αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες ηπατικής νόσου παγκοσμίως. Στην πλειονότητα των ατόμων που έχουν μολυνθεί με τον ιό, η λοίμωξη μεταπίπτει σε χρόνια και συχνά μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση, κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο.

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae* και το γονιδίωμα του είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας. Πρόκειται για έναν ιό που διαθέτει φάκελο, δηλαδή το νουκλεοκαψίδιο του ιού περιβάλλεται από μία λιπιδική διπλοστιβάδα που περιέχει τις γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί πως στην κυκλοφορία των ασθενών ο ιός μπορεί να κυκλοφορεί σε ποικίλες μορφές. Μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών που έχουν αναφερθεί και που διαθέτουν ετερογενείς πυκνότητες επίπλευσης, τα σωματίδια με την υψηλή πυκνότητα αποτελούνται από γυμνά ιικά καψίδια, καθώς και από ανοσοσυμπλέγματα. Η ύπαρξη γυμνών καψιδίων έχει αναφερθεί και σε ηπατικά κύτταρα ασθενών με λοίμωξη HCV. Επιπλέον, έχει αναγνωριστεί η ύπαρξη ελλειπτικών γονιδιωμάτων του ιού στο ήπαρ και στο ορό ασθενών, ικανά να περικλείονται σε καψίδια.

Τίποτε δεν είναι γνωστό σχετικά με την σημασία των γυμνών καψιδίων στη φυσική ιστορία της λοίμωξης ή σχετικά με τον μηχανισμό της απελευθέρωσής τους στην κυκλοφορία του αίματος των ασθενών. Έχει προταθεί, εντούτοις, ότι ο κυρίαρχος πληθυσμός του ιού αλλάζει από χαμηλής σε υψηλής πυκνότητας ιικά σωματίδια κατά την πρόοδο της ηπατικής νόσου και της φλεγμονής. Έτσι, δημιουργείται το ερώτημα κατά πόσο τα γυμνά νουκλεοκαψίδια σχετίζονται με την παθογένεση και την εμμονή της λοίμωξης HCV.

Η καψιδιακή πρωτεΐνη του HCV αποτελείται από 191 αμινοξικά κατάλοιπα, και έχει την δυνατότητα να αυτοσυγκροτείται ώστε να δημιουργεί καψίδια. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου απέδειξαν πως το σύστημα έκφρασης σε κύτταρα εντόμων, που βασίζεται στους βακουλοϊούς, έχει την ικανότητα να εκφράζει σε μεγάλες ποσότητες την πρωτεΐνη αυτή με αποτέλεσμα την δημιουργία καψιδίων που προσομοιάζουν από μορφολογικής, βιοχημικής, βιοφυσικής και αντιγονικής άποψης με αυτά του ιού που μπορούν να απομονωθούν από ασθενείς με λοίμωξη από το ιό της ηπατίτιδας C.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν:

Α) η κατασκευή, η ανάπτυξη και ο χαρακτηρισμός αντιδραστηρίων που θα επιτρέψουν την μελέτη της βιολογικής λειτουργίας της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C. Πιο συγκεκριμένα η κατασκευή core καψιδίων με την ιδιότητα του φθορισμού, ώστε να μελετηθούν οι ιδιότητες τους, η λειτουργικότητα τους καθώς και ο μηχανισμός εισόδου τους σε ζωντανά κύτταρα ηπατικής προέλευσης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Β) ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του μηχανισμού πρόσληψης/εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα στόχους, καθώς και της εμπλοκής διαφόρων ειδών φωσφορυλιωμένων ή μη κυτταρικών πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη λειτουργία.

Γ) η μελέτη της πιθανής επίδρασης τόσο των απομονωμένων core καψιδίων του ιού της ηπατίτιδας C όσο και των διαλυτών μορφών των πρωτεϊνών core και NS5A στο σύστημα ενδοκυττάριας σηματοδότησης ηπατικών κυττάρων. Ειδικότερα επιλέχτηκαν να μελετηθούν τα μονοπάτια σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ και ERK5 με πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western καθώς και ανοσοφθορισμού.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* :

Στέλεχος	*Γονότυπος*	*Εταιρεία*	*Χρήση*
BL21(DE3)	F^- *ompT gal [dcm] [lon] hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) (DE3)	Novagen	Έκφραση- καθαρισμός ανασυνδυασμένης καψιδιακής πρωτεΐνης
DH5α	*endA1 hsdR17*(r_K^- m_K^+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^r) *relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR* (φ80*dlacΔ(lacZ)M15*)	Life Technologies, Inc.	Κατασκευή πλασμιδίων

2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Για τις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιείται ζωμός LB (Luria-Bertani), περιεκτικότητας 1% (β/ο) πεπτόνη (BioKar Diagnostics) – 0,5% εκχύλισμα ζύμης (BioKar Diagnostics) – 0,5% (β/ο) NaCl (BDH), με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού επιλογής, σύμφωνα με τις ανάγκες. Η καλλιέργεια επωάζεται στον κλίβανο των 37°C υπό έντονη ανακίνηση. Για τις καλλιέργειες σε τρυβλία Petri–στερεές καλλιέργειες, χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό LB άγαρ (Scharlau), ίδιας σύστασης με το υλικό της υγρής καλλιέργειας και περιεκτικότητας 1,5% (β/ο) σε άγαρ.

3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Όνομα	*Εταιρεία*	*Απόθεμα*	*Συγκέντρωση*	*Χρήση*
Αμπικιλλίνη (Pentrexyl parenteral)	Bristol Myers-Squibb	50mg/ml	50μg/ml	Σε υγρές και στερεές καλλιέργειες για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων
Γενταμικίνη	Gibco	50mg/ml	50μg/ml	Στην καλλιέργεια των κυττάρων εντόμου κατά την παρασκευή των ιικών αποθεμάτων και τις μολύνσεις
Δοξυκυκλίνη	Clontech	100mg/ml	1000ng/ml	Για την επιλογή και διατήρηση της σταθερής κυτταρικής σειράς που αναπτύχθηκε βάσει του συστήματος Tet-On/Off.
Καναμυκίνη	Sigma	10mg/ml	50μg/ml	Για την επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων
Πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη	Biochrom KG	10mg/ml	100μg/ml	Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

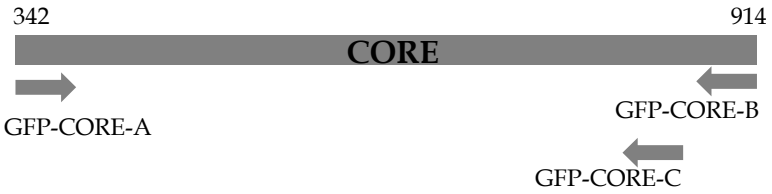
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

4. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ – ΜΟΡΙΑ 'ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ'

4.1. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Όνομα	*Αλληλουχία*	*Εταιρεία*	*Χρήση*
GFP-CORE-A	5´-GGAAGATCTATGAGCACGAATCCTAAACCT-3´	Invitrogen	PCR - Σύνθεση κωδικής περιοχής core (forward)
GFP-CORE-B	5´-GGAAGATCTTTAGGCTGAAGCGGGCACGGTCAGGCA -3´	Invitrogen	PCR - Σύνθεση κωδικής περιοχής core (reverse)
GFP-CORE-C	5´-GGAAGATCTTTAAGAGCAACCAGGAAGGTTCCCTGT-3´	Invitrogen	PCR - Σύνθεση κωδικής περιοχής core (reverse)

ATG: εναρκτήριο κωδικόνιο



Εικόνα 29 : Σχηματική αναπαράσταση των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση της κωδικής περιοχής της core πρωτεΐνης.

4.2. ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Όνομα	*Αλληλουχία*	*Εταιρεία*	*Χρήση*	*Δημοσίευση*
Egr-1/hu/F	5´-CCCTAAGCTGGAGGAGATGATG-3´	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (forward)	(184)
Egr-1/hu/R	5´-TCATGCTCACTAGGCCACTGAC-3´	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (reverse)	(184)
S-Fos	5´-TGCTGAAGGAGAAGGAAAAA-3´	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (forward)	(185)
A-Fos	5´-TGCATAGAAGGACCCAGATA-3´	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (reverse)	(185)
28S For	5'-TGAACTATGCTTGGGCAGGC-3'	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (forward)	(186)
28S Rev	5' AGCCGCCATCCATTTTCAGGG-3'	Invitrogen	PCR-Εντοπισμός παραγωγής γονιδίου (reverse)	(186)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

5. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

5.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΑ

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση και κατασκευή άλλων πλασμιδίων (καθώς και για άλλους σκοπούς) συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πλασμίδιο	*Σκοπός*
pEGFP-C1	Υποκλωνοποίηση
pEGFP-N3	Υποκλωνοποίηση
pBacPAK8	Υποκλωνοποίηση–κατασκευή ανασυνδυασμένου βακουλοϊού για έκφραση σε κύτταρα εντόμων
pCI	Υποκλωνοποίηση–μεταγραφή/μετάφραση *in vivo*–παροδική επιμόλυνση
pUC19	Επιμολύνσεις

5.2. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΑΠΟ ΣΥΝΕΡΓΑΤΕΣ

Τα πλασμίδια που παραχωρήθηκαν από άλλα εργαστήρια είναι τα ακόλουθα :

Πλασμίδιο	*Προέλευση*	*Σκοπός*	*Δημοσίευση*
pAcSG2	Dr. Roizman B.	Κατασκευή ανασυνδυασμένου βακουλοϊού	-
GFP-ERF	Dr. Mavrothalassitis G.	Ανοσοφθορισμός	(187)
mRFP-Cav	Addgene-plasmid 14434	Ζωντανή Μικροσκοπία-Ανοσοφθορισμός	(188)
mRFP-Rab5	Addgene-plasmid 14437	Ζωντανή Μικροσκοπία-Ανοσοφθορισμός	(189)
GFP-Rab5WT	Dr. Bonifacino JS.	Ανοσοφθορισμός	(190)
GFP-Rab5S34N	Dr. Bonifacino JS.	Ανοσοφθορισμός	(190)
GFP-Rab5Q79L	Dr. Bonifacino JS.	Ανοσοφθορισμός	(190)
m-RFP-Rab7	Addgene-plasmid 14436	Ζωντανή Μικροσκοπία-Ανοσοφθορισμός	(189)
MEF2A-LUC	Dr. Kchochbin S.	Μέτρηση λουσιφεράσης	(155)
MEK5WT	Dr. Lee JD.	Επιμολύνσεις κυττάρων	(191)
MEK5AA	Dr. Lee JD.	Επιμολύνσεις κυττάρων	(191)
pA-EUA2	Dr. Epstein A.	Επιμολύνσεις κυττάρων	(192)
pFos WT-GL3	Addgene-plasmid 11983	Μέτρηση λουσιφεράσης	(193)
pEgr1.2-luc	Dr. Thiel G.	Μέτρηση λουσιφεράσης	(194)
pGTK	Dr. Dietch M.	Επιμολύνσεις κυττάρων	-

5.3. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΫΠΗΡΧΑΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Πλασμίδιο	*Περιγραφή*	*Σκοπός*
pHPI 1430	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη core 1-191 με CMVp προαγωγέα	Πειράματα επιμόλυνσης
pHPI 1404	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη NS5A με CMVp προαγωγέα	Πειράματα επιμόλυνσης
pHPI 1319	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη core 1-191 συζευγμένη με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και T7 προαγωγέα	Παραγωγή core 1-191 διαλυτής πρωτεΐνης
pHPI 1327	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη core 1-191 του	Υποκλωνοποίηση

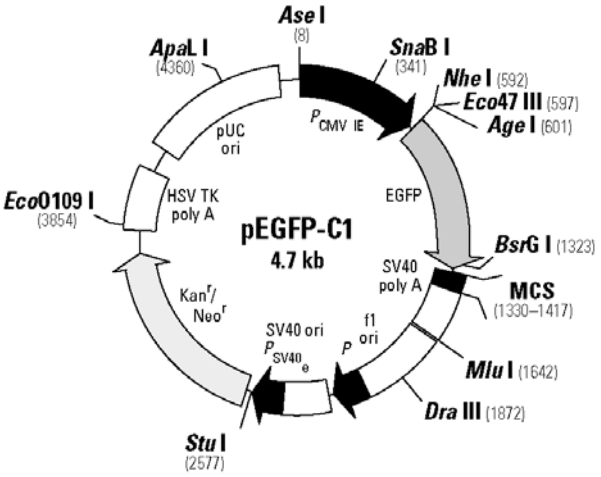
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

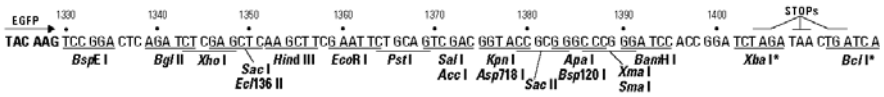
	γονότυπου 1a με CMVp προαγωγέα	
pHPI 1558	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη core 1-173 συζευγμένη με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και T7 προαγωγέα	Παραγωγή core 1-173 διαλυτής πρωτεΐνης
pHPI 1733	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη GFP με CMVp προαγωγέα	Παραγωγή βακουλοϊού
pHPI 1746	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη GFP με προαγωγέα πολυεδρίνης	Παραγωγή βακουλοϊού
pHPI 8116	Πλασμίδιο που παράγει την πρωτεΐνη NS5A με CMVp προαγωγέα	Παραγωγή βακουλοϊού
Pet15b/GFP	Πλασμιδιο που παράγει την πρωτεΐνη GFP συζευγμένη με έναν επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και T7 προαγωγέα	Παραγωγή GFP διαλυτής πρωτεΐνης

5.4. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΠΟΥ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗΚΑΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας κατασκευάστηκαν πλασμίδια με κλωνοποίηση κυρίως σε εμπορικά διαθέσιμα οχήματα έκφρασης :

<u>pEGFP-C1 (Clonetech)</u> : Το συγκεκριμένο πλασμίδιο φέρει το γονίδιο της φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP και εν συνεχεία τον πολυσυνδέτη (Multiple Cloning Site-MCS). Η κατασκευή του πλασμιδίου διευκολύνει τη σύντηξη γονιδίων με το γονίδιο της GFP, με αποτέλεσμα την έκφραση χιμαιρικών πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη GFP στο αμινοτελικό τους άκρο. Η έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης γίνεται κάτω από τον έλεγχο του προαγωγέα CMVp του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοιού (CytoMegaloVirus).





Εικόνα 30 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pEGFP-C1.

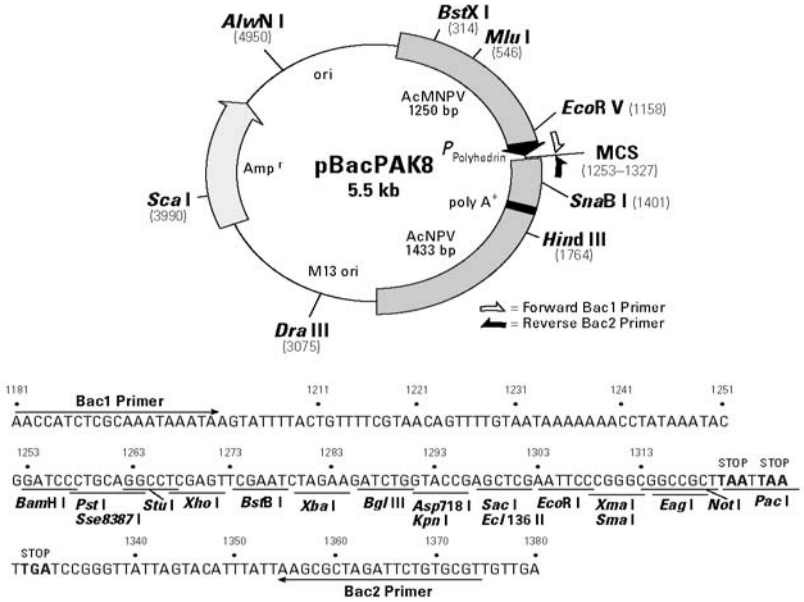
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Χρησιμοποιώντας το φορέα κλωνοποίησης pEGFP-C1, έχουν προκύψει τα εξής πλασμίδια:

pHPI 1738 : Η κωδική αλληλουχία της core 1-191 πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pHPI 1327 με εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια GFP-CORE-A και GFP-CORE-B. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές περιέχουν στα άκρα τους θέσεις αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Bgl*II, ενώ το πλασμίδιο pEGFP-C1 φέρει στον πολυσυνδέτη του μια μοναδική θέση αναγνώρισης για τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση.

pHPI 1739 : Η κωδική αλληλουχία της core 1-173 πολλαπλασιάστηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pHPI 1327 με εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια GFP-CORE-A και GFP-CORE-C. Η κλωνοποίηση του συγκεκριμένου πλασμιδίου έγινε όπως για το πλασμίδιο pHPI 1738.

pBacPAK8 (Clonetech) : Ο συγκεκριμένος φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών. Το πλασμίδιο δίνει τη δυνατότητα κλωνοποίησης γονιδίων κάτω από τον έλεγχο του ιικού προαγωγέα της πρωτεΐνης πολυεδρίνης (Ppolyhedrin). Η πολυεδρίνη αποτελεί χαρακτηριστική πρωτεΐνη του βακουλοιού *Autographa californica*, η οποία ευθύνεται για το σχήμα πολυέδρου των μολυσμένων κυττάρων-ξενιστών. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της πολυεδρίνης έχει αντικατασταθεί από τον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, ο οποίος επιτρέπει την κλωνοποίηση αλληλουχιών.



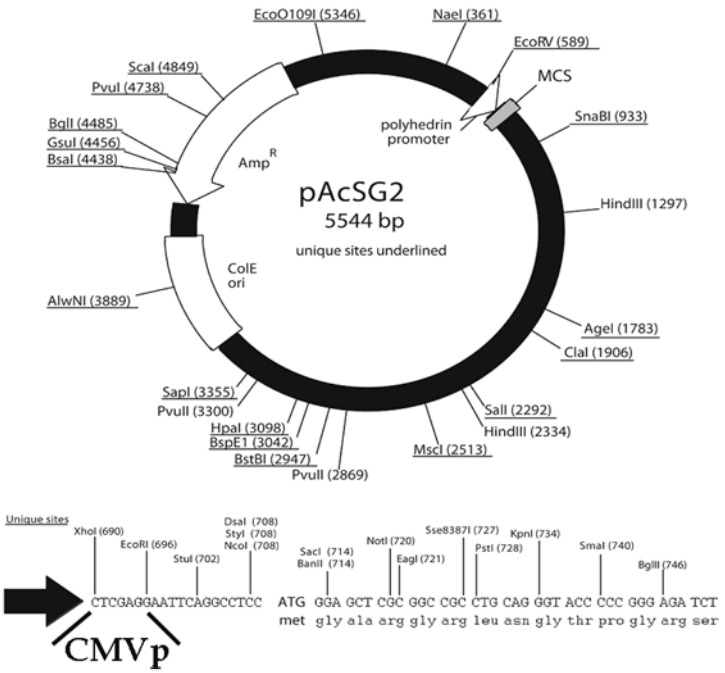
Εικόνα 31 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pBacPak8

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο φορέα κλωνοποίησης έχουν προκύψει τα εξής πλασμίδια:

pHPI 1740 : Το ένθεμα GFP-core 1-191 απομονώθηκε από το πλασμίδιο pHPI 1738 μετά από πέψη του πλασμιδίου με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *Nhe*I και *EcoR*I. Στον φορέα κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *Xba*I/*EcoR*I και με αντίδραση σύνδεσης (ligation) προστέθηκε το ένθεμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα άκρα *Xba*I και *Nhe*I, παρόλο που διαφέρουν έχουν την δυνατότητα συνένωσης, εξαιτίας ομοιοτήτων στην νουκλεϊκή αλληλουχία.
pHPI 1741 : Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, μόνο που το ένθεμα (GFP-core 1-173) απομονώθηκε από το πλασμίδιο pHPI 1739.

pAcSG2 (Dr. Roizman B.) : Το συγκεκριμένο πλασμίδιο κατασκευάστηκε στο εργαστήριο του Δρ. Roizman, με σκοπό την δημιουργία βακουλοϊών ικανών να παράγουν πρωτεΐνες σε κύτταρα θηλαστικών. Για τον λόγο αυτό, στον πολυσυνδέτη, έχει προστεθεί ο προαγωγέα CMVp.



Εικόνα 32 : Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pAcSG2.

Με το συγκεκριμένο φορέα κλωνοποίησης έχουν προκύψει τα εξής πλασμίδια:

pHPI 1742 : Η συγκεκριμένη κατασκευή πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Μετά από πέψη με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *Nhe*I και *Pst*I του πλασμιδίου pHPI 1738, απομονώθηκε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

το ένθεμα GFP-core 1-191. Ο φορέας κλωνοποίησης υπέστη και αυτός πέψη, όμως μόνο με την ενδονουκλεάση περιορισμού*Pst*I και ακολούθησε αποφωσφορυλίωση (αντίδραση CIAP) ώστε να αποτραπεί η επανασύνδεση των άκρων του κατά την αντίδραση σύνδεσης. Με την πρώτη αντίδραση σύνδεσης ενώθηκαν τα άκρα *Pst*I. Ακολούθησε φωσφορυλίωση (αντίδραση Klenow) και μια δεύτερη αντίδραση σύνδεσης, κατά την οποία τα άκρα *Pst*I και *Nhe*I συνδέθηκαν.

pHPI 1743 : Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, μόνο που το ένθεμα (GFP-core 1-173) απομονώθηκε από το πλασμίδιο pHPI 1739.

6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ

Εμβολιάζονται καλλιέργειες των 500ml με μικρές καλλιέργειες των 25ml (μετά από επώαση στους 37°C για περίπου 16 ώρες) και αφήνονται να αναπτυχθούν (με καλό αερισμό) μέχρι να φτάσει η οπτική τους πυκνότητα στο 0,5 (600nm) (λογαριθμική φάση). Στη συνέχεια η καλλιέργεια ψύχεται σταδιακά και τα κύτταρα συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση. Το ίζημα αναδιαλύεται σε παγωμένο διάλυμα 0,1M $CaCl_2$ και τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση, και μετά την απόρριψη του υπερκειμένου διαλύματος, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 43ml από το ίδιο διάλυμα. Προστίθενται 7ml γλυκερόλης και στη συνέχεια τα κύτταρα φυλάσσονται στους –80°C σε μικρές ποσότητες.

7. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Η πέψη μορίων DNA με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (New England Biolabs ή Fermentas) γίνεται με επώαση στην προτεινόμενη θερμοκρασία και παρουσία του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης, η ποσότητα του προστιθέμενου ενζύμου, καθώς και ο χρόνος επώασης καθορίζονται ανάλογα με την ποσότητα του DNA.

8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Στα προς ανάλυση δείγματα (προϊόντα πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή και άκοπα μόρια πλασμιδιακού DNA μετά την απομόνωση από στήλη) προστίθεται ποσότητα διαλύματος 0,25% (β/ο) κυανούν της βρωμοφαινόλης – 0,25% (β/ο) κυανούν του ξυλενίου FF – 30% (ο/ο) γλυκερόλης, ίση με το 1/10 του όγκου του δείγματος. Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται σε οριζόντιο πήκτωμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

αγαρόζης (BMA, Invitrogen ή Promega) πυκνότητας 1-2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (περίπου 0,3μg/ml), σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE [0,09M Tris – 0,55% (β/ο) βορικό οξύ – 2mM EDTA, pH 8] ή TAE [0,04M Tris – 0,1% (ο/ο) οξικό οξύ – 1mM EDTA, pH 8]. Ακολουθεί παρατήρηση στο υπεριώδες.

9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΖΩΝΗΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο, η ζώνη που περιέχει το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει κόβεται με νυστέρι μετά από παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες. Η ζώνη του πηκτώματος τοποθετείται στην υποδοχή πάνω από το φίλτρο του ειδικού μικροδοκιμαστικού σωλήνα Spin-X (Corning, Costar) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA συλλέγεται από τον μικροδοκιμαστικό (μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη και οξικό νάτριο), ενώ η αγαρόζη παραμένει πάνω στον ηθμό. Το DNA αναδιαλύεται σε μικρό όγκο TE ή dH_2O και ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, πριν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις ενζυμικής συγκόλλησης.

10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η απομόνωση πραγματοποιείται από καλλιέργειες βακτηρίων των 3ml, που έχουν αναπτυχθεί για περίπου 16 ώρες. Οι καλλιέργειες αυτές έχουν προκύψει από εμβολιασμό υλικού LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό, με μεμονωμένες αποικίες από το μετασχηματισμό των βακτηρίων. Τα βακτήρια συλλέγονται και επαναιωρούνται σε 400μl διαλύματος STET [8% (β/ο) σακχαρόζη – 5% (ο/ο) Triton X 100 – 50mM EDTA – 50mM Tris, pH 8]. Ακολουθεί προσθήκη λυσοζύμης (30μl από απόθεμα 10mg/ml σε διάλυμα 0,25M Tris, pH 8) και θέρμανση στους 100°C για ένα λεπτό. Μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του ιζήματος, στο υπερκείμενο προστίθενται 400μl ισοπροπανόλης. Ακολουθεί κατακρήμνιση σε χαμηλή θερμοκρασία, φυγοκέντρηση και διαλυτοποίηση του ιζήματος σε TE (10mM Tris, pH 8,0 – 1mM EDTA, pH 8,0). Ακολουθεί έλεγχος του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προσθήκη 2μl ριβονουκλεάσης A (Sigma, από απόθεμα 10mg/ml σε 10mM Tris, pH 7,5 – 15mM NaCl) και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων σε πήκτωμα αγαρόζης.

11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε με ιοντοανταλλακτική ρητίνη Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel), ξεκινώντας με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

καλλιέργεια 200-500ml (που έχει αναπτυχθεί για τουλάχιστον 14 ώρες), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η απόδοση και η ποιότητα του DNA ελέγχθηκαν τόσο με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στο υπεριώδες φως ($1OD_{260}$=50μg πλασμιδιακού DNA /ml, A_{260}/A_{280}), όσο και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, μετά από πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.

Εναλλακτικά, σε ορισμένες περιπτώσεις ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της αλκαλικής λύσης. Τα κύτταρα από βακτηριακή καλλιέργεια (που είχε αναπτυχθεί για περίπου 16 ώρες) συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές και επαναιωρήθηκαν σε 20ml διαλύματος 50mM γλυκόζης – 25mM Tris, pH 8 – 50mM EDTA, pH 8. Η λύση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 40ml διαλύματος 0,2N NaOH – 1% SDS, και παραμονή στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 45ml διαλύματος 5M οξικού καλίου (pH 4,8), και παραμονή στους 4°C για 30 λεπτά. Μετά από φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του χρωμοσωμικού DNA και των κυτταρικών θραυσμάτων, ακολούθησε προσθήκη στο υπερκείμενο 60ml ισοπροπανόλης. Μετά από φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 3ml διαλύματος TE (10mM Tris, pH 8 – 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA με χρήση πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG). Συγκεκριμένα προστέθηκε ίσος όγκος χλωριούχου λιθίου και κατακρήμνιση του RNA με φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν 6ml ισοπροπανόλης και κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με φυγοκέντρηση. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 500μl TE. Μετά από πέψη με ριβονουκλεάση A (10μl από απόθεμα 10mg/ml), για 30 λεπτά στους 37°C, προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος 13% PEG 8000 σε 1,6M NaCl. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στους 4°C, επαναδιάλυση σε διάλυμα TE (10mM Tris, pH 8 – 1mM EDTA, pH 8), και εκχύλιση με ίσο όγκο φαινόλης pH 8 και χλωροφορμίου (δύο φορές). Στο τέλος το DNA κατακρημνίσθηκε με προσθήκη αιθανόλης και διαλύματος 3M οξικού νατρίου, και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα TE, pH 8.

12. ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ DNA (ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ CIAP)

Το DNA (μετά την απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης) διαλυτοποιείται σε 10 έως 40μl νερού. Ακολουθεί προσθήκη 5μl από το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, κατάλληλης ποσότητας απεσταγμένου νερού μέχρι του τελικού όγκου των 49μl, και 1μl ενζύμου αλκαλικής φωσφατάσης (Fermentas, 1u/μl). Η επώαση πραγματοποιείται στους 37°C για 30 λεπτά, και στη συνέχεια ακολουθεί απενεργοποίηση στους 85°C για 15 λεπτά, εκχύλιση με φαινόλη - χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη, και ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

13. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ DNA (ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ KLENOW / T4 ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ)

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°, σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Το μείγμα της αντίδρασης περιέχει το τμήμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, dNTPs και το ένζυμο. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA και ηλεκτροφορητική ανάλυση.

14. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΣ ΥΠΟ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA (LIGATION)

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιήθηκε στους 22°C για περίπου 16 ώρες και ακολούθησε απενεργοποίηση στους 65°C για 10 λεπτά. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε τα προς σύνδεση μόρια DNA (πλασμιδιακό φορέα και τμήμα) σε κατάλληλη αναλογία, 2μl από το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και απεσταγμένο νερό μέχρι του τελικού όγκου των 20μl. Επιπλέον προστίθενται 2 ή 4μl (προκειμένου για κολλώδη ή απότομα άκρα, αντίστοιχα) ενζύμου T4 DNA λιγάσης (Fermentas, 1u/μl).

15. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για την σύνθεση της κωδικής περιοχής της καψιδιακής πρωτεΐνης του HCV, είτε ολόκληρης (1-191) είτε της ώριμης μορφής (1-173), χρησιμοποιήθηκε η $Vent_R$ DNA πολυμεράση (New England Biolabs), σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας τα ολιγονουκλεοτίδια GFP-CORE-A/GFP-CORE-B και GFP-CORE-A/GFP-CORE -C

10μl διάλυμα αντίδρασης ThermoPol (10x)
2μl ολιγονουκλεοτίδιο #1 (10pmoles/μl)
5μl ολιγονουκλεοτίδιο #2 (10pmoles/μl)
2μl dNTPs (10mM)
1μl πολυμεράση$Vent_R$ (2u/μl)
8μl $MgSO_4$ (100mM)
1μl πλασμίδιο (10ng)
dH_2O

Το πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχει ως εξής:

Θερμοκρασία	*Χρόνος*	*Κύκλοι*
95°C	5 λεπτά	1
94°C **63°C** **72°C**	1 λεπτό 30 δευτερόλεπτα 2 λεπτά	35
72°C	10 λεπτά	1

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

16. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, αρχικά εμβολιάστηκε καλλιέργεια 1 L (LB με αμπικιλλίνη), με 40ml καλλιέργειας κυττάρων του στελέχους BL21 (DE3) μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pHPI 1319 ή pHPI 1558, που είχε αναπτυχθεί για τουλάχιστον 14 ώρες. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600nm έφτασε στο 0,600, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 4 ώρες αργότερα με φυγοκέντρηση, και το ίζημα φυλάχτηκε στους -20°C. Προκειμένου να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής της έκφρασης, η καλλιέργεια στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, και δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες επαγωγής με IPTG (Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranosyl) στους 37°C.

17. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ NI-NTA

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε με χρωματογραφία συγγενείας χρησιμοποιώντας ρητίνη νικελίου-νιτριλοτριοξικού οξέος (Ni-NTA), υπό φυσικές συνθήκες, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen). Η καθαρότητα ελέγχθηκε με SDS-PAGE και επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση τύπου Western blot με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα για την πρωτεΐνη core και πολυκλωνικά για την πρωτεΐνη GFP. Η συγκέντρωση της καθαρισμένης πρωτεΐνης υπολογίστηκε με την δοκιμασία Bradford (Bio-Rad).

18. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Για την παραγωγή πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας χρησιμοποιήθηκε αρσενικό κουνέλι ηλικίας 4 μηνών (στη μονάδα πειραματόζωων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ). Ως αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που υπερεκφράστηκε και καθαρίστηκε από τα βακτηριακά κύτταρα υπό φυσικές συνθήκες με χρωματογραφία συγγενείας. Για την ανοσοποίηση πραγματοποιήθηκαν τέσσερις εμβολιασμοί, πριν την πρώτη αιμοληψία, με ενδιάμεσα διαστήματα 3-4 εβδομάδων. Πιο συγκεκριμένα το πειραματόζωο υποβλήθηκε σε υποδόρια ένεση στην πλάτη σύμφωνα με καθορισμένα πρωτόκολλα (195). Στον πρώτο εμβολιασμό χορηγήθηκαν 500μg αντιγόνου γαλακτωματοποιημένου με ίσο όγκο πλήρους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ανοσοενισχυτικού Freund (complete Freund's adjuvant, Sigma), ενώ στους επαναληπτικούς εμβολιασμούς 300μg πρωτεΐνης μαζί με μη πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund. Η πρώτη συλλογή του αίματος έγινε 2 εβδομάδες μετά τον τελευταίο εμβολιασμό από την φλέβα του αυτιού, μετά από τοπική χορήγηση αναισθησίας. Το αίμα που συλλέχθηκε επωάστηκε στους 37°C για 1 ώρα πριν μεταφερθεί στους 4°C για περίπου 14 ώρες. Στη συνέχεια το πήγμα του αίματος απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση και ο ορός μοιράστηκε σε μικροσωλήνες και φυλάχτηκε στους –20°C. Ο ορός που συλλέχθηκε ελέγχθηκε για την παρουσία ειδικών αντισωμάτων (επιτυχή ανοσοποίηση) με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης τύπου Western, χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από ευκαρυωτικά κύτταρα που εκφράζουν τις πρωτεΐνες. Βρέθηκε ότι ο ορός αντιδρούσε ειδικά και ισχυρά και με την πρωτεΐνη core και με την πρωτεΐνη GFP, και στη συνέχεια δοκιμάστηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western σε αραιώσεις 1/90 έως 1/1000 και επιλέχτηκε να χρησιμοποιούνται σε αραίωση 1/500.

19. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές :

Ονομασία	*Οργανισμός*	*Ιστός - Μορφολογία*	*Χρήση*	*Καλλιέργεια*
BHK-21	*Mesocricetus auratus* (συριακός χρυσός κρικετόμυς-κρίκητος)	Νεφρό από νεογέννητο, φυσιολογικός - Ινοβλάστες	Μεταγωγή με ανασυνδυασμένο βακουλοϊό–δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 10% FCS
HeLa	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Ωοθήκη, αδενοκαρκίνωμα - Επιθηλιακά	Μεταγωγή με ανασυνδυασμένο βακουλοϊό–δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 10% FCS
HepG2	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα - Επιθηλιακά	Μεταγωγή με ανασυνδυασμένο βακουλοϊό-δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^L$ + 10% FCS
Hep3B	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα - Επιθηλιακά	Μεταγωγή με ανασυνδυασμένο βακουλοϊό-δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων	$DMEM^L$ + 10% FCS
Huh7	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπάτωμα -	Μεταγωγή με ανασυνδυασμένο βακουλοϊό, δοκιμασία εντοπισμού του GFP-ERF-δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^L$ + 10% FCS

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Jurkat	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Τ λεμφοκύτταρα, οξεία λευχαιμία -	Δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-μέτρηση ERK5	RPMI + 10% FCS
NIH/3T3	*Mus musculus* (ποντικός) – στέλεχος NIH/Swiss	Έμβρυο – Ινοβλάστες ATCC: CRL-1658	δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 10% FCS
Sf9	*Spodoptera frugiperda* (fall armyworm)	Ωοθήκη από νύμφη, επιθηλιακά ATCC: CRL-1711	Ανάπτυξη ανασυνδυασμένων βακουλοϊών (έκφραση, τιτλοποίηση, παραγωγή αποθέματος), παραγωγή και απομόνωση ανασυνδυασμένων καψιδίων, επιμόλυνση	Sf900 + 5% FCS (δωρεά S.Pêtres)
SK-N-SH	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Νευροβλάστωμα, από μυελό των οστών	Δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-μέτρηση $ERK_{1/2}$, ERK5-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 10% FCS
Vero	*Cercopithecus aethiops* (πράσινος αφρικανικός πίθηκος)	Νεφρό, φυσιολογικός - Επιθήλιο ATCC: CCL-81	δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 5% ορό νεογέννητου βοός
WRL68	*Homo sapiens* (άνθρωπος)	Ήπαρ από έμβρυο, φυσιολογικός	δοκιμασία επικόλλησης καψιδίων-πειράματα ανοσοφθορισμού	$DMEM^H$ + 10% FCS

20. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ–ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ονομασία	*Σύσταση - Εταιρεία*
PBS_A	0,14M NaCl, 3mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1,5mM KH_2PO_4
Versene	PBS_A + EDTA 0,5mM
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in low or high glucose concentration	Biochrom KG
Foetal Calf Serum (FCS)	GibcoBRL
Θρυψίνη	GibcoBRL
SF900II	GibcoBRL
Foetal Bovine Serum (FBS)	GibcoBRL

21. ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ουσία	*Εταιρεία*	*Χρήση*	*Συγκέντρωση - αραίωση*
Alexa Fluor 546 labelled-transferrin	Molecular Probes	Μελέτη της ενδοκύτωσης	100nM
Alexa Fluor 546 labelled-phalloidin	Molecular Probes	Χρωματισμός της ακτίνης	1/1000
Ammonium chloride	Sigma	Αύξηση του pH στα ενδοσώματα	5mM – 15 λεπτά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Bafilomycin A1	Sigma	Αύξηση του pH στα ενδοσώματα	50nM – 30 λεπτά
Bodipy 4,4 difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene	Molecular Probes	Συνθετικά λιπίδια κόκκινου χρώματος σχεδιασμένα να εισέρχονται στα κύτταρα	1/7000
Chloroquine diphosphate salt	Sigma	Αύξηση του pH στα ενδοσώματα	20μM – 30 λεπτά
Complete Mini	Roche	Κοκτέιλ με αναστολείς πρωτεασών	1/7
EGF Epidermal Growth Factor	R and D	Ενεργοποιεί (μεταξύ άλλων) το MAPK-ERK$_{1/2}$ μονοπάτι	50nM – 10 λεπτά
E64 Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane	Sigma	Καταστέλλει την λειτουργία των καθεψινών τύπου κυστεΐνης	20μM
Fluospheres (546)	Molecular Probes	Μικροσφαιρίδια με 100 nm διάμετρο	1/10000
IPTG Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranosyl	Sigma	Επαγωγή της παραγωγή της πρωτεΐνης	0.1-1mM
Nocodazole Methyl-(5-[2-thienylcarbonyl]-1 H-benzimidazol-2-YL) Carbamate	Sigma	Εμποδίζει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης στους μικροσωληνίσκους	1-4μM – 2 ώρες
Okadaic Acid 9,10-deepithio-9,10-didehydroacanthifolicin	Sigma	Αναστολέας της PP2A και φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης	0.5μM – 30 λεπτά
PD98059 2-(2-amino-3-methoxyphenyl-4H-1 benzopyran-4-one	Cell signalling	Αναστολέας της MAPK-MEK πρωτεΐνης	5-100μM – 1 έως 3 ώρες
Pepstatin A 4-amino-3 hydroxy-6-methylheptanoic acide (statine)	Sigma	Καταστέλλει την λειτουργία των καθεψινών τύπου ασπατικές	10μM
SB202190 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole	Sigma	Αναστολέας του p38 σηματοδοτικού μονοπατιού	20μM – 1 ώρα 30 λεπτά
Sodium orthovanadate	Sigma	Αναστολέας ATPασών και φωσφατασών τυροσίνης	2-5mM
To-Pro3	Molecular Probes	Χρωματισμός την κυτταρικών πυρήνων	1/1000
UO126 1,3-diamino-2,3dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene	Cell signalling	Αναστολέας της MAPK-MEK πρωτεΐνης	0.5-5μM - 1 έως 3 ώρες

22. ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ – ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ

Λιπόσωμα – Χημικός παράγοντας	*Εταιρεία*	*Χρήση*	*Σύσταση*
DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,N trimethylammonium methylsulfate	Roche Applied Science	Κύτταρα εντόμων – κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών	Κατιονικό λιπόσωμα DOTAP[1]
jetPEI	Polyplus-transfection SA	Κύτταρα Huh7 - επιμόλυνση με το πλασμίδιο GFP-ERF	Πολυμερές κατιονικό - Γραμμικό παράγωγο πολυαιθυλενιμμίνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

23. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας, ανάλογα με τον τύπο του χημικού παράγοντα ή του λιποσώματος που χρησιμοποιήθηκε.

24. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Τα κύτταρα, στην παρούσα εργασία υποβάλλονται σε διάφορες δοκιμασίες, μέσα στα ειδικά φρεάτια (επιμολύνσεις, δοκιμασίες με διάφορες χημικές ουσίες κ.τ.λ). Μετά το τέλος της διαδικασίας τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και η λύση τους πραγματοποιείται σε κρύο διάλυμα που περιέχει 1% Triton X-100, 50mM KCl, 10mM Tris pH 7.5, 1mM DTT, 2mM $MgCl_2$, 1mM PMSF, 2mM Sodium Orthovanadate για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4^oC για 10 λεπτά στις 14000rpm. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβάλλονται σε δοκιμασία Bradford και ακολουθεί είτε ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών, είτε μέτρηση της πρωτεΐνης λουσιφεράσης.

25. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ BRADFORD

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς επίσης και στα κλάσματα με τα ανασυνδυασμένα καψίδια, πραγματοποιήθηκε η χρωματομετρική δοκιμασία που βασίζεται στη μέθοδο Bradford (BioRad Protein Assay,BIORAD). Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε μικρή κλίμακα και σε πλάκα 96 φρεατίων σύμφωνα και με τις οδηγίες της εταιρείας. Συνοπτικά αναμείχτηκαν είτε 2μl κυτταρικών εκχυλισμάτων είτε 4μl από το κάθε κλάσμα που περιείχε καψίδια, με 200μl από το αραιωμένο παράγοντα χρώσης (1:5) (dye reagent). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη BSA (NEB), σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε στα 595nm.

26. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ (LUCIFERASE)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας ενζύμου της λουσιφεράσης (LUC) στηρίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του υποστρώματός της λουσιφερίνησ παρουσία ενέργειας η οποία πραγματοποιείται με ταυτόχρονη παραγωγή ενός φωτονίου.

$$\text{Luciferin} + O_2 \xrightarrow[\text{ATP, } Mg^{2+}]{\text{LUC}} \text{Oxyluciferin} + CO_2 + \Phi\omega\varsigma$$

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Τα φωτόνια που παράγονται μετρούνται με συγκεκριμένο όργανο, τον μετρητή φωταύγειας (Turner TD-20/20, Turner BioSystems). Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης λουσιφεράσης, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων σε εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα (cell culture lysis reagent, Promega). 20μl κυτταρικών εκχυλισμάτων αναμειγνύονται με 100μl ενός εμπορικά διαθέσιμου αντιδραστηρίου που περιέχει λουσιφερίνη (Luciferase assay reagent (Promega) και αμέσως μετράται η ποσότητα της φωταύγειας με το λουμινόμετρο Luminometer GloMax™ 20/20 (Promega). Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ολική ποσότητα πρωτεΐνης με τη δοκιμασία Bradford που χρησιμοποιείται για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων.

27. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Αντίσωμα	*Χαρακτηριστικά*	*Εταιρεία*	*Χρήση*	*Αραίωση*
Anti-Bovine α-tubulin Mouse monoclonal antibodies	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Molecular Probes	IF	1/200
Anti-mouse Alexa fluor 488	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-rabbit Alexa fluor 488	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-mouse Alexa fluor 546	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-rabbit Alexa fluor 546	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-mouse Alexa fluor 647	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-rabbit Alexa fluor 660	Πολυκλωνικό σε κατσίκα	Molecular Probes	IF	1/1000
Anti-ERK5	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Sigma	WB,IF,IP	1/2000
Anti-Calnexin	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Sigma	IF	1/2000
CORE	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Παρασκευάστηκε στο εργαστήριο	WB,IF,IP	1/500 (WB) 1/100 (IF)
c-fos (9F6)	Μονοκλωνικό σε κουνέλι	Cell Signalling	WB	1/1000
ERK1 (K-23) : S-94	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Santa Cruz	WB,IF	1/1000
Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) Antibody-early endosomal marker	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Novus Biologicals	IF	1/300
GFP	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Παρασκευάστηκε στο εργαστήριο	WB, IP	1/500
GFP (FL) : sc-8334	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Santa Cruz	WB, IF	1/1000
HA-probe (F-7) : sc-7392	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Santa Cruz	WB	1/1000

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

His-probe (H-15) : sc-803	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Santa Cruz	WB	1/1000
Lamp2 (H4B4) : sc-18822	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Santa Cruz	IF	1/300
Monolonal antibody to hepatitis C core protein (C7-50)	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Alexis Biochemicals	WB	1/1000
Mouse Anti-Actin Monoclonal antibody	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Chemicon	WB	1/5000
Phospho-Erk5 (Thr218/Tyr220)	Πολυκλωνικό σε κουνέλι	Cell Signalling	WB, IF	1/1000
Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Ty2024)	Μονοκλώνικο σε κουνέλι	Cell Signalling	WB	1/1000
Phospho-p38 MAPK (thr180/tyr182) (3D7)	Μονοκλωνικό σε κουνέλι	Cell Signalling	WB	1/1000
Purified Mouse Anti-EEA1	Μονοκλωνικό σε ποντικό	BD Bioscience	IF	1/300
p38 MAP kinase (L53F8)	Μονοκλωνικό σε ποντικό	Cell Signalling	WB	1/2000

28. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS - ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης που προετοιμάστηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί (196). Το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν 6, 8, 10, 12%, ανάλογα με το μέγεθος των προς διαχωρισμό πρωτεϊνών. Το πήκτωμα συσσώρευσης ήταν 5%. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 25mM Tris – 250mM γλυκίνης – 0.1% (β/ο) SDS. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 150 V προκειμένου για τα μικρά πηκτώματα ή στα 100 mA για τα μεγάλα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης.

29. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη Protran BA, 100% νιτροκυτταρίνη (Whatman – Schleicher and Schuell) με μέγεθος πόρου 0,45μm. Για την ηλεκτροφορητική μεταφορά υγρού τύπου (300mA για 3 ώρες ή 100 V για μία ώρα, στους 4°C) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 39mM γλυκίνης – 48mM Tris – 0,037% (β/ο) SDS – 20% (ο/ο) μεθανόλης. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ελέγχθηκε με παροδική χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S [0,2% (β/ο) Ponceau S – 3% (β/ο) τριχλωροοξικό οξύ].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

30. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΤΥΠΟΥ WESTERN (WESTERN BLOT)

Αρχικά η μεμβράνη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ανακίνηση με διάλυμα δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων [PBS - 0,01% (ο/ο) Tween 20 - 5% (β/ο) άπαχο αφυδατωμένο γάλα]. Εν συνεχεία, επωάζεται στους 4°C για 16 ώρες υπό ανακίνηση με το πρώτο αντίσωμα αραιωμένο κατάλληλα σε διάλυμα PBS - 0,01% Tween 20 - 1% (β/ο) άπαχο αφυδατωμένο γάλα. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις της νιτροκυτταρίνης με διάλυμα έκπλυσης και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα, έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού ή του ποντικού, συζευγμένο με υπεροξειδάση του μαύρου ραπανιού. Τέλος, ακολουθεί εκ νέου ξέπλυμα και η ανίχνευση γίνεται με την μέθοδο της χημιοφωταύγειας (ChemiLucent Detection system kit, Chemicon International – SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce).

31. ΕΠΑΝΑΫΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ ΑΛΛΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Ο αποϋβριδισμός των αντισωμάτων που έχουν προσδεθεί στην μεμβράνη κατά την πρώτη ανοσοαποτύπωση τύπου Western, πραγματοποιείται με πλύσιμο της μεμβράνης σε διάλυμα 0,2M γλυκίνης, pH 2,8 - 0,5M NaCl. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5 λεπτά υπό ανακίνηση, η μεμβράνη ξεπλένεται διαδοχικά με διάλυμα PBS, και ακολουθεί το πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης με δέσμευση των μη ειδικών θέσεων και επώαση με το καινούριο αντίσωμα, όπως περιγράφεται και ανωτέρω.

32. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

Μετά από την κατάλληλη επεξεργασία ανάλογα με το πείραμα, τα κύτταρα λύνονται σε ανάλογο διάλυμα με αυτό που περιγράφηκε ανωτέρω, και φυγοκεντρούνται για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Στη συνέχεια προστίθονται 10μl αντισώματος και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 4°C υπό ανακίνηση για 12 ώρες. Ακολουθεί προσθήκη 30μl της κατάλληλης πρωτεΐνης A, A/G ή G σε σύζευξη με σφαιρίδια αγαρόζης (Santa Cruz), ανάλογα με το είδος του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε, και επώαση σε θερμοκρασία 4°C υπό ανακίνηση για 5 ώρες. Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 14000rpm (4°C) και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 500μl διαλύματος NET (50μM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, 1mM EDTA, 0,02% NaN3). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές, και ακολούθησε διαχωρισμός σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοαποτύπωση τύπου Western.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

33. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΥΡΗΝΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Κύτταρα, αφού υπέστησαν την κατάλληλη διεργασία, λύθηκαν σε διάλυμα (50μl) που περιείχε 10mM Hepes pH 7.9, 1.5mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 1μg/μl pepstatin A, και μείγμα χημικών αναστολέων (complete mini inhibitors 1/7 - Roche), για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 0^oC και φυγοκεντρήθηκαν στις 14000rpm (4^oC) για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο που συλλέχτηκε αποτελείται από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε στο παρακάτω διάλυμα (60μl): 20mM Hepes pH 7.9, 420mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM EDTA, 25% γλυκερόλη, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 1μg/μl pepstatin A και μείγμα χημικών αναστολέων (complete mini inhibitors 1/7 - Roche). Ακολούθησε φυγοκέντρηση, και τα πυρηνικά κυτταρικά εκχυλίσματα, που περιέχονται στο υπερκείμενο, διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western (197).

34. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ

Για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων βακουλοϊών χρησιμοποιήθηκε το Baculogold linearized DNA (BD Biosciences). Πρόκειται για τροποποιημένο γονιδίωμα του ιού *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (ιοί με δίκλωνο DNA, οικογένεια *Baculoviridae, Nucleopolyhedrovirus,* AcNPV). Περιέχει μία μη βιώσιμη - θνησιγόνα έλλειψη που εκτείνεται σε 1,7 χιλιάδες βάσεις καθοδικά του γονιδίου της πολυεδρίνης (έχει εξαλειφθεί το γονίδιο της πολυεδρίνης, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 603, καθώς και απαραίτητα μέρη του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης 1629) (198), και ως εκ τούτου δεν κωδικοποιεί βιώσιμο ιό. Η έλλειψη αυτή μπορεί να αποκατασταθεί μέσω ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού κατά την συνεπιμόλυνση του γονιδιώματος αυτού με ένα συμπληρωματικό πλασμιδιακό φορέα.

Για την παραγωγή και ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων βακουλοϊών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Sf9. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό Sf900II SFM (Gibco) στους 27°C με προσθήκη ορού εμβρύου βοός (fetal calf serum, FCS), κατάλληλα ελεγμένου για την καλλιέργεια κυττάρων εντόμου (Gibco). Η ανάπτυξη των ιών πραγματοποιήθηκε με το ίδιο υλικό παρουσία ορού εμβρύου βοός και του αντιβιοτικού γενταμικίνης σε συγκέντρωση 50μg/ml (Gibco).

Η διαδικασία ανάπτυξης ενός ανασυνδυασμένου βακουλοϊού ξεκινάει με την επιμόλυνση σε κύτταρα εντόμων. Πιο συγκεκριμένα, 3×10^6 κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας 25F. Μετά από ξέπλυμα με υλικό χωρίς ορό, προστίθεται στα κύτταρα μείγμα που περιέχει:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

3ml SF900 5μg του κατάλληλου πλασμιδίου 5μl Baculogold DNA 50μl DOTAP

Τα κύτταρα με το μείγμα αυτό μεταφέρονται στον κλίβανο για 5 ώρες. Ακολουθεί αλλαγή και προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού με ορό και αντιβιοτικό, και το υπερκείμενο συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές 6-7 ημέρες μετά την επιμόλυνση. Αυτό αποτελεί το P0 ιικό απόθεμα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται επιλογή μεμονωμένων κλώνων με την μέθοδο της αραίωσης τελικού σημείου. Για τον σκοπό αυτό, προετοιμάζονται πλάκες 96 φρεατίων, με την προσθήκη $2,5 \times 10^4$ κυττάρων σε κάθε φρεάτιο (σε όγκο 50μl), καθώς και διαδοχικές αραιώσεις του P0 ιικού αποθέματος σε θρεπτικό υλικό με ορό. Σε κάθε φρεάτιο προστίθενται 150μl από το αραιωμένο απόθεμα (σε τουλάχιστον τρεις σειρές για κάθε αραίωση), και η πλάκα τοποθετείται στον κλίβανο μέσα σε υγρό θάλαμο 27°C. Στις 6-7 ημέρες μετά την μόλυνση, οι πλάκες παρατηρούνται στο ανάστροφο φωτονικό μικροσκόπιο και οι μεμονωμένοι κλώνοι από την μεγαλύτερη δυνατή αραίωση συλλέγονται για την ανάπτυξη σε μεγαλύτερο ιικό απόθεμα. Στα επόμενα στάδια, μετά και τον έλεγχο της έκφρασης των επιλεγμένων μεμονωμένων ανασυνδυασμένων κλώνων, ακολουθεί η ανάπτυξη ιικών αποθεμάτων με μεγάλο τίτλο, για την χρησιμοποίηση σε πειράματα μόλυνσης και μεταγωγής (προκειμένου για τους τροποποιημένους βακουλοϊούς που εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών). Το απόθεμα P1 προκύπτει μετά από μόλυνση 3×10^6 κυττάρων (σε 25F) με 100μl από κάθε μεμονωμένο κλώνο από την πλάκα καλλιέργειας των 96 φρεατίων. Το απόθεμα αυτό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της έκφρασης, καθώς και για την ανάπτυξη του αποθέματος P2. Για την ανάπτυξη των αποθεμάτων P2 και P3 (τουλάχιστον 50ml) χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο φιάλες 75F (με 3×10^7 κύτταρα ανά φιάλη καλλιέργειας). Η μόλυνση πραγματοποιείται με χαμηλό MOI (0,1, ή περίπου 500μl από το προηγούμενο ιικό απόθεμα ανά φιάλη). Το απόθεμα συλλέγεται 7 ημέρες μετά την μόλυνση, με φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές, και φυλάσσεται για μικρό διάστημα στους 4°C προστατευμένο από το φως ή για μεγαλύτερα διαστήματα στους -80°C.

Η τιτλοποίηση των ιικών αποθεμάτων (κυρίως P3) πραγματοποιήθηκε με το πρωτόκολλο της αραίωσης τελικού σημείου, σε πλάκες των 96 φρεατίων, με τουλάχιστον 4 σειρές από κάθε αραίωση (199). Μετά από 5-7 ημέρες και παρατήρηση των κυττάρων στο ανάστροφο φωτονικό μικροσκόπιο ή το μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiovert 135) (για τους ανασυνδυασμένους ιούς που εκφράζουν την GFP πρωτεΐνη), σημειώνονται τα μολυσμένα φρεάτια στις μεγαλύτερες αραιώσεις και ο τίτλος υπολογίζεται λαμβάνοντας υπ'

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

όψιν την ποσότητα (μl) της αραίωσης που χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση σε κάθε φρεάτιο.

Οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί που κατασκευάστηκαν συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Ονομασία	*Προαγωγέας*	*Πρωτεΐνη που εκφράζεται*	*Πλασμίδιο στο οποίο βασίζεται*	*Δημοσίευση*
Bac1432	Πολυενδρίνη	core	pHPI 1432	(200)
Bac1488	CMV	core	pHPI 1488	(200)
Bac1733	CMV	GFP	pHPI 1733	-
Bac1736	Πολυενδρίνη	core-GFP 1-173	pHPI 1736	(201)
Bac1737	CMV	core-GFP 1-173	pHPI 1737	-
Bac1740	Πολυενδρίνη	GFP-core 1-191	pHPI 1740	(201)
Bac1741	Πολυενδρίνη	GFP-core 1-173	pHPI 1741	(201)
Bac1742	CMV	GFP-core 1-191	pHPI 1742	-
Bac1743	CMV	GFP-core 1-173	pHPI 1743	-
Bac1746	Πολυενδρίνη	GFP	pHPI 1746	(201)
Bac8119	CMV	NS5A	pHPI 8119	-

Οι βακουλοϊοι Bac1736, Bac1740, Bac1741 και Bac1746 κατασκευάστηκαν από την Σέρτη Ε., ο βακουλοϊός Bac8119 από την Δρ. Τσιτούρα Π., ενώ ο βακουλοϊος 1733 από τον Πίσσα Γ.

35. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

35.1. ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΕΝΤΟΜΩΝ

Περίπου 4×10^7 κύτταρα Sf9 μολύνθηκαν με τον ιό Bac1432 με MOI (Multiplicity of infection) 7 και συλλέχθηκαν 2 ημέρες μετά την μόλυνση. Τα ανασυνδυασμένα καψίδια απομονώθηκαν από τα κυτταρικά εκχυλίσματα σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί (200-202). Συνοπτικά, τα κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές υπέστησαν αντίδραση με DNAse και RNAse για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνεχεία, επιστρώθηκαν σε στρώμα 30% σακχαρόζης (σε 100mM NaCl – 10mM Tris, pH 7,4) και φυγοκεντρήθηκαν στις 35.000rpm για 3 ώρες στους 4°C (κεφαλή SW41). Το ίζημα που προέκυψε διαλυτοποιήθηκε σε 50mM Tris - 100mM NaCl, pH 7,4, και ακολούθησε επίστρωση σε μία γραμμική διαβάθμιση σακχαρόζης 20–65%. Η υπερφυγοκέντρηση πραγματοποιήθηκε στις 35.000rpm για 22 ώρες (με την κεφαλή SW41 της Beckman). Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρησης, συλλέχθηκαν 18 κλάσματα (των 650μl το καθένα) από την κορυφή της διαβάθμισης προς τα κάτω, τα οποία αναλύθηκαν τόσο με ELISA για την core πρωτεΐνη (100μl σε αραίωση 1/1000 σε PBS), όσο και με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (15μl) και ανοσοαποτύπωση τύπου Western. Τα κλάσματα, στα οποία μετρήθηκε επιπλέον ο δείκτης διάθλασης, φυλάχτηκαν στους –80°C. Τέλος, μετρήθηκε η ολική πρωτεΐνη με την δοκιμασία Bradford (μετά από αραίωση 1/100).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

35.2. ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Κύτταρα Huh7 (4 × 75F) με βακουλοϊο. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στις 48 ώρες μετά την μόλυνση, και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris, pH 7,5 – 50mM NaCl – 0,5mM EDTA. Στη συνεχεία ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία απομόνωσης και ανάλυσης των καψιδίων που περιγράφτηκε πιο πάνω.

36. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ (ORTHOELISA)

Πρόκειται για μία ποιοτική δοκιμασία, συζευγμένη με ένζυμο, , που χρησιμοποιεί πολλά μονοκλωνικά αντισώματα με ειδικότητα για διαφορετικές περιοχές του αντιγόνου core (σε συνεργασία με την Δρ. Βαρακλιώτη Α.). Επειδή η δοκιμασία αυτή είναι ποιοτική, προκειμένου να μετρήσουμε και την ποσότητα της καψιδιακής πρωτεΐνης που περιέχεται στα κλάσματα από την υπερφυγοκέντρηση, συμπεριλάβαμε και δείγματα με γνωστή συγκέντρωση διαλυτής core πρωτεΐνης. Βάσει των τιμών των γνωστών δειγμάτων αυτών κατέστη δυνατή η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Πρόκειται για την πρωτεΐνη core 1a που έχει εκφραστεί σε βακτήρια (χιμαιρική μορφή των 120 πρώτων αμινοξικών καταλοίπων, μαζί με τον επίτοπο των ιστιδινών) και έχει καθαριστεί από τον Δρ. Κακκανά Α. Η πρωτεΐνη βρίσκεται σε συγκέντρωση 2μg/μl σε διάλυμα ουρίας 8M. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στο ELISA, πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις σε PBS και επιλέχτηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις: 50–100–400–1000pg/ml ως επαρκείς για τον σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης.

37. ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της παρουσίας και των αντιγονικών ιδιοτήτων των ανασυνδυασμένων καψιδίων που απομονώθηκαν με την κλασματοποίηση, καθώς και για μία εκτίμηση της διαμέτρου τους. Ως μέτρο σύγκρισης, στο δείγμα προστέθηκαν κόκκινα φθορίζοντα μικροσφαιρίδια διαμέτρου 100nm (F8801, Molecular Probes, Invitrogen). Πρόκειται για μικροσφαιρίδια από πολυστυρένιο (latex) που έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν με κόκκινο χρώμα. Η αρχική τους συγκέντρωση είναι 2,7 × 10^{13}/ml, αλλά χρησιμοποιούνται σε κατάλληλη αραίωση (περίπου 3 × 10^{9} /ml). Μείγμα από το κλάσμα που περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα των καψιδίων (2μl) και κατάλληλα αραιωμένα μικροσφαιρίδια (3μl από 1/10000 σε PBS) απλώθηκε σε 1 cm^2 αντικειμενοφόρου, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, έτσι ώστε να ξηρανθεί και ακολούθησε μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη για άλλα 15 λεπτά. Μετά από τα πλυσίματα σε PBS και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

την προσθήκη γλυκερόλης, τα δείγματα εξετάσθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Leica TCS-SP, Leica Confocal Software LCS).

38. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Η δοκιμασία της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS–Dynamic Light Scattering) αποτελεί μια ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική για τη μέτρηση της διαμέτρου/μεγέθους μορίων και σφαιρικών καψιδίων· θεωρείται δε, συμπληρωματική του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (203,204). Αρχικά τα ανασυνδυασμένα καψίδια που κατασκευάσαμε, πρέπει να απαλλαχτούν από τα μόρια της σακχαρόζης με τα οποία συνυπάρχουν. Για το λόγο αυτό 200μl από το κλάσμα με την μεγαλύτερη ποσότητα καψιδιακής πρωτεΐνης τοποθετούνται σε μεμβράνη διαπίδυσης (SpectraPor, Spectrum), και αυτή με την σειρά της σε PBS για τουλάχιστον 12 ώρες. Στη συνεχεία τα απαλλαγμένα πια καψίδια, συμπυκνώνονται με την βοήθεια στήλης Vivaspin 5000 MWCO (Vivascience), σε τελικό όγκο 50μl. Ακολουθεί φιλτράρισμα (4mm syringe filters-cellulose acetate 0.2μm, Nalgene) και τα καψίδια τοποθετούνται στην ειδική κυψελίδα του μηχανήματος Zetasizer Nano-S, Malvern.

39. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Για την μελέτη του μηχανισμού εισόδου των καψιδίων σε διάφορες κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοφθορισμού. Κύτταρα διάφορων κυτταρικών σειρών καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες 10mm. Μετά από την κατάλληλη (ανάλογα με το πείραμα) επώαση των καψιδίων σε 300μl DMEM, τα κύτταρα πλένονται με PBS για την απομάκρυνση του μη προσδεδεμένου υλικού και εν συνεχεία, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 4% παραφορμαλδεύδη για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εξουδετέρωση με 100mM γλυκίνης, και επώαση με το ή τα ανάλογα αντισώματα στην κατάλληλη αραίωση για 40 λεπτά. Έπειτα, οι καλυπτρίδες επωάζονται με αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών του κουνελιού σημασμένο με Alexa Fluor, 1/1000, για 40 λεπτά. Τα κύτταρα γίνονται διαπερατά με την προσθήκη 0,02% Triton X 100. Τέλος, ακολουθεί άμεση έγκλιση σε ρητίνη (Mowiol, Sigma). Τα δείγματα εξετάσθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Leica TCS-SP, Leica Confocal Software LCS).

40. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (LIVE-MICROSCOPY)

Κύτταρα Huh7 καλλιεργήθηκαν σε ειδικές πλάκες καλλιέργειας με γυάλινο πυθμένα μεγέθους 35mm (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν όπως έχει περιγραφεί ανωτέρω με τα πλασμίδια mRFP-Rab5, m-RFP-Rab7 ή mRFP-Cav και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

μετά από 24 ώρες μεταφέρθηκαν σε ειδικό κλίβανο στους 37^0C, ο οποίος συνδέεται με το ανάστροφο μικροσκόπιο time-lapse Olumpus X181 Cell-R και με κάμερα Hamamatsu CCD ORCA/AG. Για τις ταινίες χρησιμοποιήθηκαν οι φακοί 60x και 100x, ενώ η επεξεργασία τους έγινε με το λογισμικό Cell-R.

41. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Η κυτταρομετρία ροής (FACS - Fluorescence activated cell sorter) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ποσοστού κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κύκλου (ανάλυση του κυτταρικού κύκλου) και του ολικού περιεχομένου του DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Κύτταρα Huh7 και HepG2 επεξεργάστηκαν με υλικό που περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις ορού, για 12 και 36 ώρες. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα τοιχώματα φιάλης 75F, με τη χρήση θρυψίνης (trypsine), και στη συνέχεια αφαιρέθηκε από το υλικό με την βοήθεια φυγοκέντρησης. Ακολούθησε αναδιάλυση του ιζήματος σε 3ml PBS, και φυγοκέντρηση 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4^oC στα 1000g. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα αναδιαλύθηκαν σε 500 μl αιθανόλης (ethanol), ανακινήθηκαν με τη βοήθεια VORTEX για 3 λεπτά, και φυγοκεντρήθηκαν στις 3000rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα αναδιαλύθηκε σε διάλυμα PBS-5%FCS, 30μg/μl RNAse A, 50μg/μl PI (Propidium Iodine – Ιωδιούχο προπίδιο), επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά και μετρήθηκε με την χρήση του FACS Calibur (Beston Dickinson). Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη του ποσού της χρωστικής που έχει δεσμευθεί από το DNA. Η αντίδραση DNA - χρωστικής ουσίας είναι στοιχειομετρική και αμφίδρομη, για το λόγο αυτό οι μετρήσεις έγιναν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας.

42. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ RNA

Η εκχύλιση του κυτταρικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο RNAzol B (Medical GMBH), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: 10^6 κύτταρα λύθηκαν σε 200μl RNAzol B, και μετά από ομογενοποίηση, προστέθηκαν 20μl χλωροφόρμιου. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στους 4^oC για 15 λεπτά στις 12000rpm. Έπειτα προστέθηκαν 250μl παγωμένης ισοπροπανόλης, τα δείγματα παρέμειναν στον πάγο για 15 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντηση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Τέλος, το ίζημα που αποτελεί το ολικό κυτταρικό RNA, πλύθηκε με 75% παγωμένη αιθανόλη. Το RNA αναδιαλύθηκε σε 20μl

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

απιονισμένου νερού (ddH2O), μετρήθηκε η συγκέντρωση του με ειδικό φωτόμετρο (Qubit™ Fluometer – Molecular Probes) του και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

43. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για την μετατροπή του ιικού RNA σε cDNA (complementary DNA) ακολουθήθηκε η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής. Για όλα τα RNA δείγματα, 5 μl ολικού RNA και 1 μl τυχαίων εκκινητικών μορίων (PDN6-Amersam GE healt care), προστέθηκαν και επωάστηκαν στους 70°C για 5 min. Μετά το πέρας της επώασης προστέθηκε στο μείγμα της αντίδρασης 1μl MMLV (promega), 4μl RT buffer (NEB), 1 μl dNTPs (Invitrogen), 0,5 μl RNAsin (promega), και συμπληρώθηκε με ddH2O ελεύθερου ριβονουκλεασών μέχρι ο όγκος να φτάσει τα 20μl. Ακολούθησε επώαση 1 ώρα στους 37°C για τη σύνθεση cDNA και επώαση για 2 min στους 92°C για απενεργοποίηση του ενζύμου.

44. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) ΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΜΟ

Με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι δυνατή η ενίσχυση in vitro ενός τμήματος cDNA, το οποίο οριοθετείται από τα εκάστοτε εκκινητικά μόρια. Η PCR αποτελείται από τρία στάδια, το στάδιο της αποδιάταξης του δίκλωνου μορίου DNA ή cDNA, το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητικών μορίων στις περιοχές πρόσδεσής τους στο μόριο στόχο και το στάδιο της επιμήκυνσης-σύνθεσης του αντιγράφου του μορίου στόχου. Οι συνθήκες καθώς και τα εκκινητικά μόρια για τα γονίδια *c-fos* και *egr-1*, έχουν ήδη περιγραφεί (183,184).

45. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τιμές από τρία ή περισσότερα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν για τα στατιστική μελέτη. Πρώτα εκτελέστηκε ανάλυση της διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA) και στη συνέχεια ακολούθησε έλεγχος t δυο δειγμάτων με υποτιθέμενες άνισες διακυμάνσεις (*Student* t-test). Ανάλογα με τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όσα πειράματα είχαν την τιμή $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) ή $P < 0.001$ (***).

46. ΛΟΓΙΣΜΙΚΑ (SOFTWARES)

Το Prophet (AbTech Corporation) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αλληλουχιών DNA (προσδιορισμός των θέσεων αναγνώρισης από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες και πρόβλεψη των τμημάτων που προκύπτουν, αναγνώριση και πρόβλεψη των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης). Το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS3 (Adobe

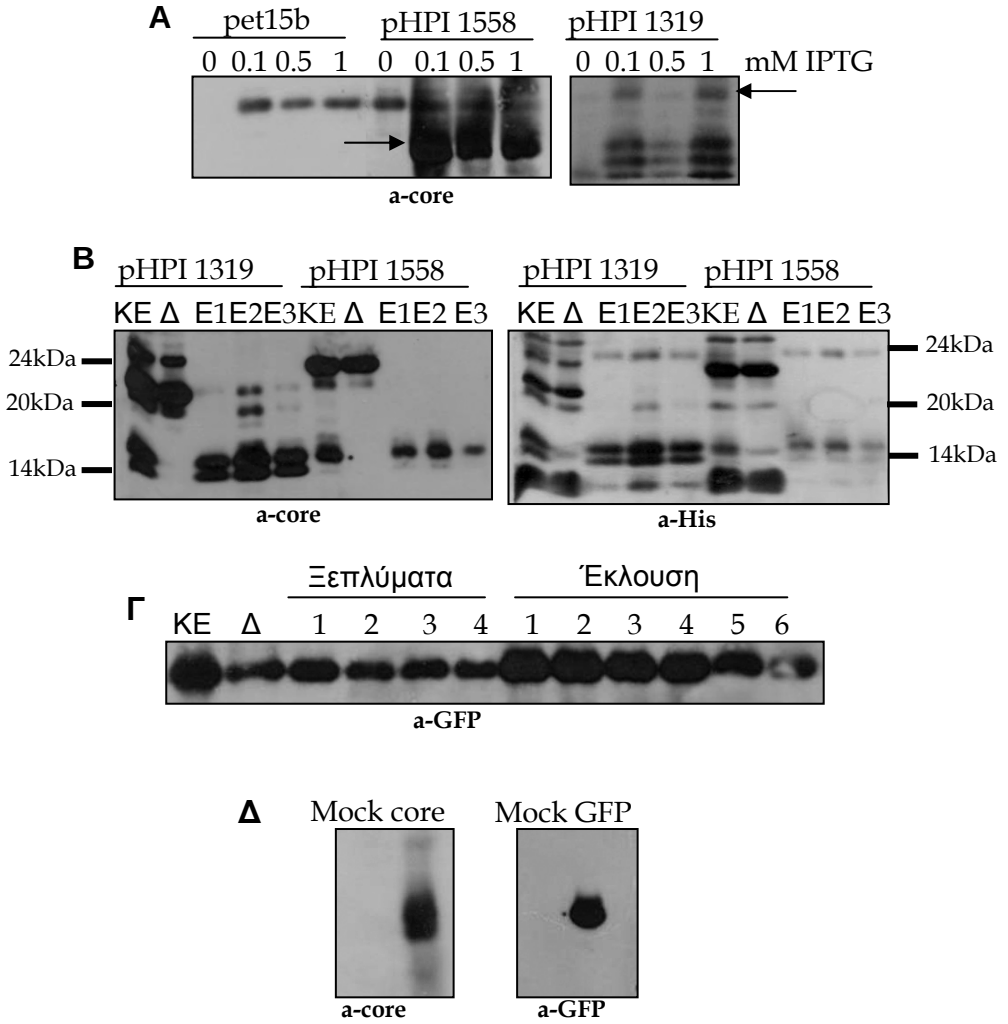
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

systems, San Jose, CA) χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των εικόνων του μικροσκοπίου, ενώ το πρόγραμμα Image-Pro Plus (Media Cybernetics), για την μέτρηση του συνεντοπισμού των καψιδίων με διάφορα κυτταρικά οργανίδια. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το λογισμικό Imaris 5.7.2 (Bitplane) για την τρισδιάστατη απεικόνιση των οπτικών τομών του συνεστιακού μικροσκοπίου. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Cell-R (Olympus) για την επεξεργασία των ταινιών σε ζωντανά κύτταρα. Η σύγκριση και η ποσοτικοποίηση των ζωνών από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western η PCR, έγινε με το λογισμικό Quantity One 4.4.1 (BioRad). Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Microsoft Office - Excel (Microsoft), και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας της δυναμικής σκέδασης του φωτός, το Nano-S (Malvern).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 33 : Παραγωγή αντισωμάτων για την αναγνώριση των πρωτεϊνών core και GFP.

Α : Βελτιστοποίηση των συνθηκών του IPTG.

Β και Γ : Απομόνωση της καψιδιακής πρωτεΐνης core (pHPI 1319 ή pHPI 1558) (Β) και GFP (Γ) από βακτηριακά κύτταρα με στήλη νικελίου υπό φυσικές συνθήκες. Τα δείγματα από όλα τα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης (ΚΕ: κυτταρικά εκχυλίσματα, Δ: ό,τι δεν έδεσε στην στήλη, Ξ1-2: ξεπλύματα, Ε1-6: έκλουση της πρωτεΐνης από την στήλη της εταιρίας) αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντίσωμα για την core και πολυκλωνικό αντίσωμα για την GFP.

Δ : Για τον έλεγχο των ορών από τα ανοσοποιημένα κουνέλια χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα εντόμων Sf9 που είχαν μολυνθεί με τους βακουλοϊούς 1432 (core) και 1746 (GFP). Το αντίσωμα ονομάστηκε L1 (core) R1 (GFP) αλλά στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η ονομασία α-core και α-GFP για την καλύτερη κατανόηση των πειραμάτων.

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΨΙΔΙΩΝ HCV ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΜΕ Η ΧΩΡΙΣ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΤΗΝ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗ GFP

1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ CORE ΚΑΙ GFP ΠΟΛΥΚΛΩΝΙΚΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

1.1.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Για την κατασκευή των ειδικών αντισωμάτων, αλλά και διαλυτής βακτηριακής πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pHPI 1319 (pet15b/core1-191) και pHPI 1558 (pet15b/core 1-173) καθώς και το πλασμίδιο pet15b/GFP (προσφορά Δρ. Μπολέτη Χ.), που προϋπήρχαν στο εργαστήριο.

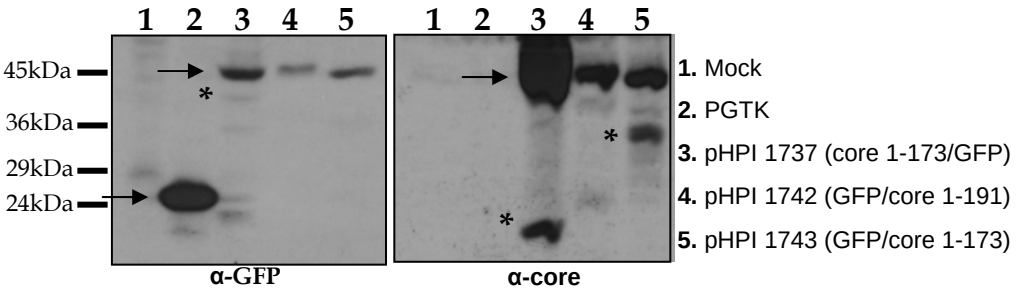
1.1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ

Αρχικά δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (IsoPropyl β-D-1 ThyoGalactopyranosyl) για την επαγωγή της πρωτεΐνης core. Οι συνθήκες για την πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) ήταν ήδη γνωστές. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 33, επιλέχτηκαν οι παρακάτω συνθήκες για τα πλασμίδια: 0.1mM για το πλασμίδιο pHPI 1558, 1mM για το pHPI 1319 και 0.5mM για το pet/GFP. Ακολούθησε η απομόνωση των πρωτεϊνών υπό φυσικές συνθήκες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Τα κλάσματα που απομονώθηκαν ελέχθησαν με ανοσοαποτύπωση τύπου Western και τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων και μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιείχαν με δοκιμασία Bradford, ενώ ερευνήθηκε και η καθαρότητα τους μέσω χρωματισμού coomassie (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

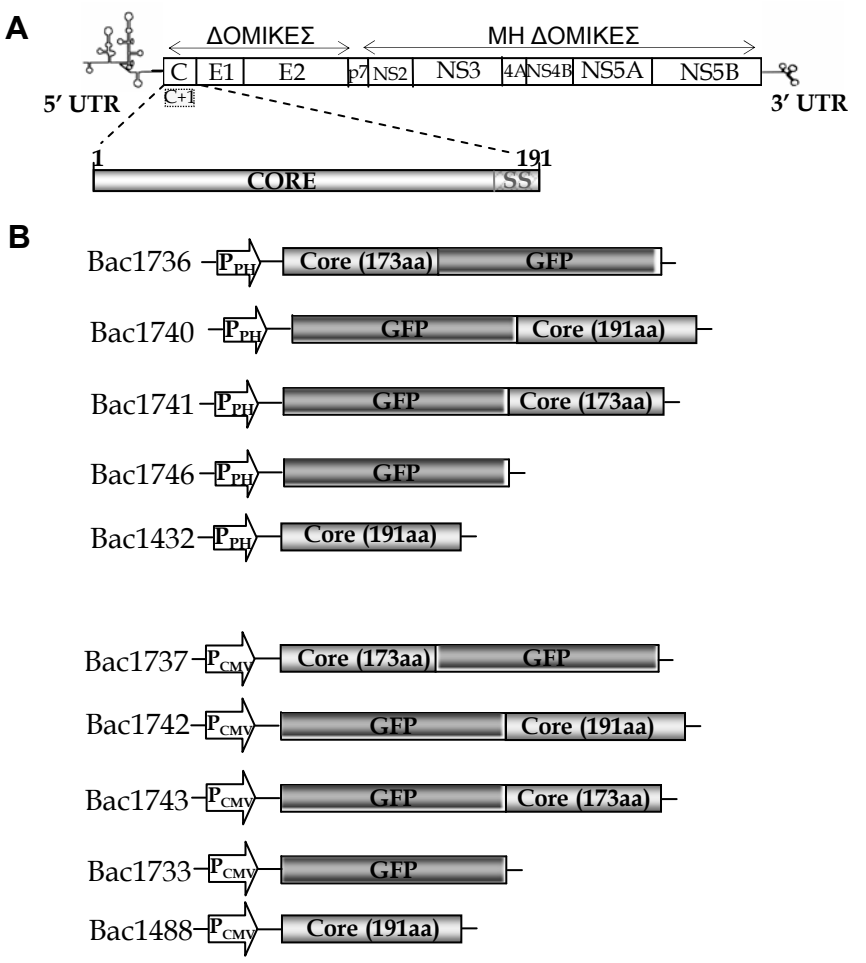
1.1.3. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟ

Στη συνέχεια εμβολιάστηκαν κουνέλια (στη μονάδα πειραματόζωων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ) με τις καθαρισμένες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες core 1-191 (pHPI 1319) και GFP. Ο ορός που συλλέχθηκε ελέγχθηκε αρχικά με ανοσοαποτύπωση τύπου Western, χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από κύτταρα θηλαστικών που εκφράζουν τις core και GFP πρωτεΐνες και βρέθηκε να αναγνωρίζει ειδικά και τις δύο πρωτεΐνες και να δίνει ένα έντονο σήμα (εικόνα 33-Δ). Ο ορός χρησιμοποιήθηκε εφεξής σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western σε αραιώσεις 1/500, ενώ το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core, καθαρίστηκε περαιτέρω με χρωματογραφία συγγενείας για τα πειράματα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 34 : Έκφραση των πλασμιδίων pHPI 1737, 1742 και 1743 σε BHK-21 κύτταρα. Με το βέλος παρουσιάζονται οι αναμενόμενες πρωτεΐνες ενώ με αστερίσκο οι επιπλέον πρωτεΐνες που εκφράζονται.



Εικόνα 35 : A : Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C (HCV).

B : Σχηματική αναπαράσταση των βακουλοϊών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

ανοσοφθορισμού και ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπου χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1/100.

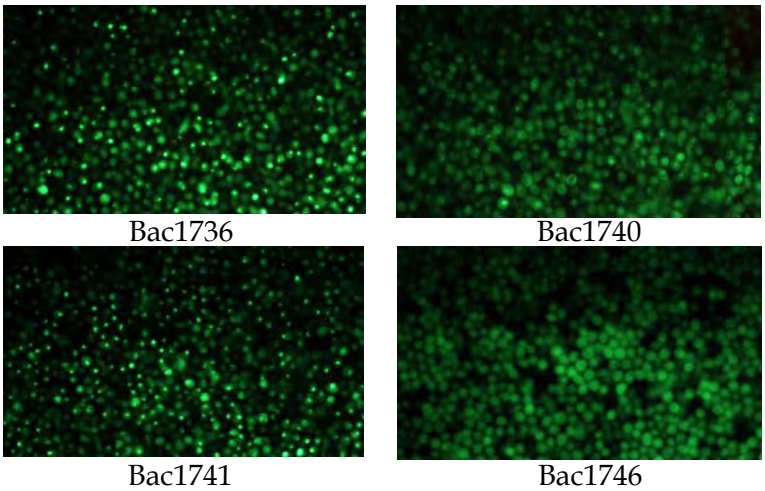
1.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Κατασκευάσθηκαν τρία πλασμίδια είτε με προαγωγείς πολυεδρίνης (polyedrin promoter) είτε κυτταρομεγαλοϊού (CMV-CytoMegaloVirus promoter), τα οποία περιείχαν την πρωτεΐνη core συζευγμένη με την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Λεπτομερής περιγραφή των κατασκευασθέντων πλασμιδίων περιλαμβάνεται στο πρακτικό μέρος της παρούσας εργασίας. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μορφές για την πρωτεΐνη core. Μια που περιείχε και τα 191 αμινοξέα της πρωτεΐνης ενώ η δεύτερη μόνο τα αμινοξέα που απομένουν μετά την πρωτεόλυση από την πεπτιδάση (173 αμινοξέα). Μετά την κατασκευή τους, τα πλασμίδια με CMV προαγωγείς ελέγχθηκαν για έκφραση σε BHK κύτταρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, μετά από ανοσοαποτύπωση τύπου Western, τα πλασμίδια pHPI 1737 και pHPI 1743 παράγουν μια πρωτεΐνη 45kDa ενώ το pHPI 1742 μια λίγο μεγαλύτερη. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pGTK που εκφράζει αποκλειστικά την πρωτεΐνη GFP. Παρατηρήθηκαν και ορισμένες επιπλέον μορφές, μικρότερου μοριακού βάρους που θεωρήθηκαν αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών (*). Τα πλασμίδια με προαγωγέα πολυεδρίνης ελέγχθηκαν για την έκφραση τους, όμως τα κύτταρα εντόμων Sf9 δεν επιμολύνονται επαρκώς με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να μην είναι εμφανείς με πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western. Τα πλασμίδια αυτά ελέγχθηκαν αποκλειστικά με προσδιορισμό νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing).

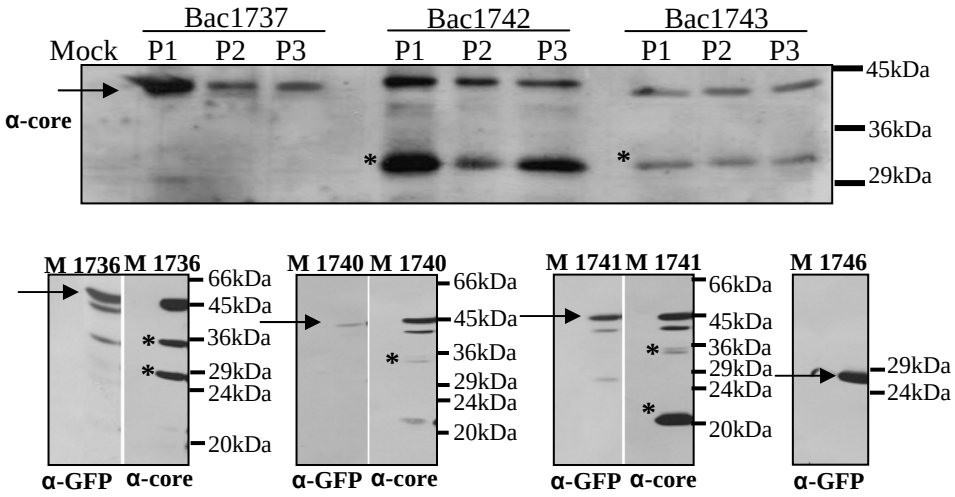
1.3. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ

Οι βακουλοϊοί και ο τρόπος που κατασκευάσθηκαν περιγράφονται στο τεχνικό μέρος. Συνοπτικά οι κατασκευασθέντες βακουλοϊοί παρουσιάζονται στην εικόνα 35**.** Δημιουργήθηκαν τρία αποθέματα (-περάσματα) για κάθε βακουλοϊό που ονομάστηκαν P1, P2 και P3, ώστε να αποκτηθεί μεγαλύτερο ιικό φορτίο. Στη συνέχεια το απόθεμα P3 κάθε ιού τιτλοποιήθηκε με την μέθοδο της 'αραίωσης τελικού σημείου' (end-point dilutions) (199). Όλοι οι βακουλοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν παρουσίαζαν ιικό φορτίο από $1,5x10^8$ έως $5x10^8$. Επειδή αρκετοί από αυτούς περιείχαν την πρωτεΐνη GFP, παρακολουθήθηκε ο φθορισμός των ιών σε κύτταρα εντόμων με την βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού (εικόνα 36). Παρατηρήθηκαν διαφορές στον εντοπισμό του φθορισμού όμως θεωρήθηκε ότι οφειλόταν στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εκφραζόταν σε κύτταρα εντόμων και όχι θηλαστικών. Εντούτοις θα πρέπει να τονιστεί ότι η πρωτεΐνη core έχει εντοπιστεί στον πυρήνα αρκετών κύτταρων

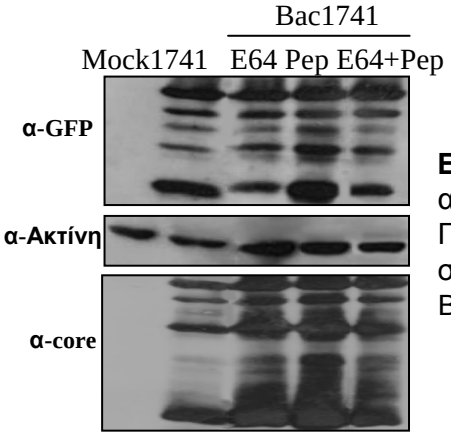
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 36 : Έκφραση των κατασκευασθέντων βακουλοϊών σε κύτταρα εντόμων Sf9.



Εικόνα 37 : Μόλυνση HepG2 κυττάρων με τους βακουλοϊούς Bac1737, Bac1742 και Bac1743 και Sf9 κυττάρων με τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740, Bac1741 και Bac1746. Με βέλος παρουσιάζονται οι αναμενόμενες πρωτεΐνες ενώ με αστερίσκο οι επιπλέον πρωτεΐνες που εκφράζονται.



Εικόνα 38 : Επίδραση των χημικών αναστολέων E64 (20μM) και Πεπστατίνη A (pepstatin A) (10μM) στην μόλυνση με τον βακουλοϊό Bac1741.

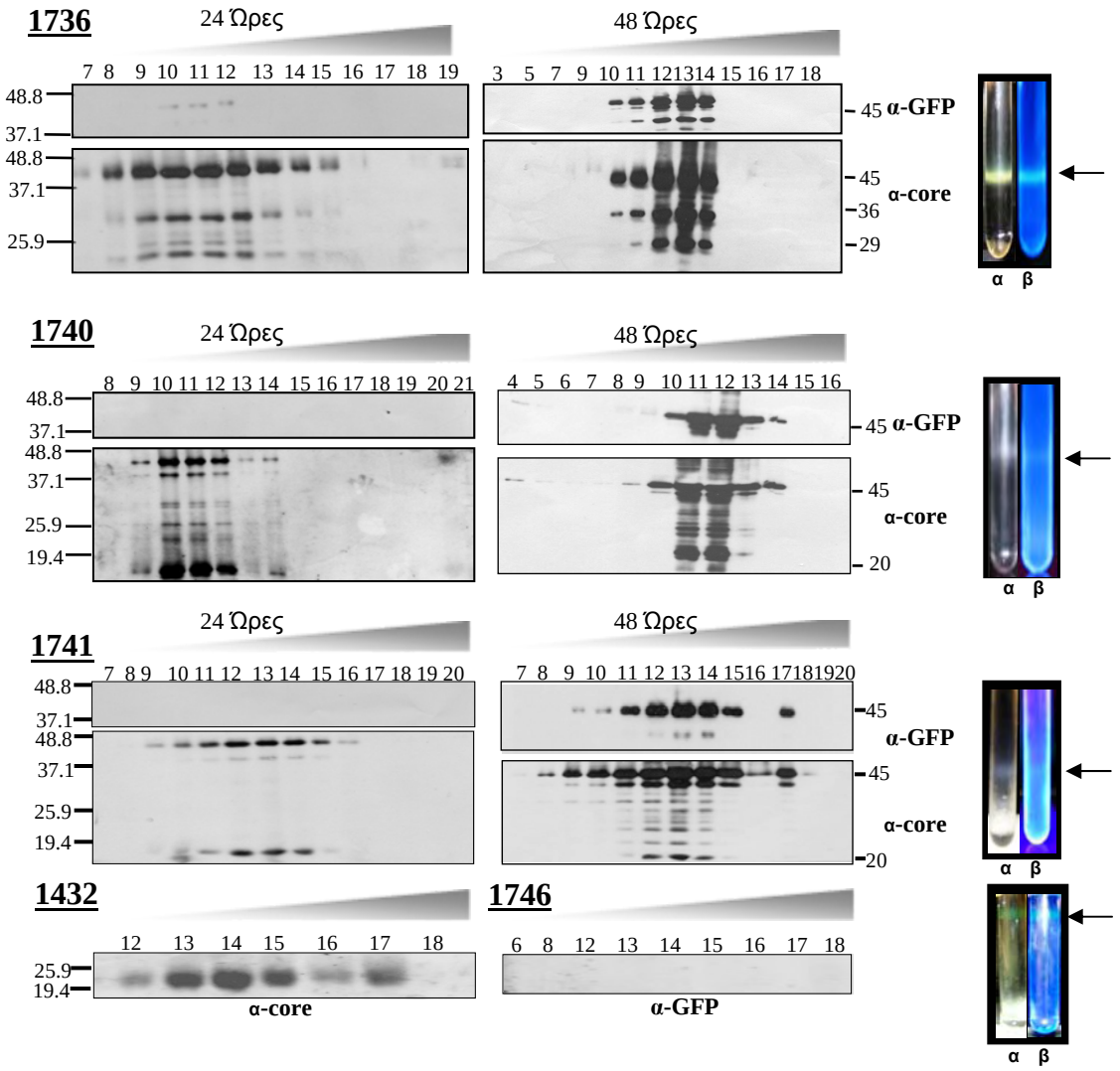
(40-42). Οι βακουλοϊοί με CMV προαγωγέα δεν μπόρεσαν να φωτογραφηθούν εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας του μικροσκοπίου φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε. Ο CMV προαγωγέας δεν λειτουργεί ικανοποιητικά στα κύτταρα εντόμων με αποτέλεσμα την χαμηλή έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ο ιός όμως παράγεται κανονικά και μπορεί να μολύνει ηπατικά και άλλα κύτταρα, όπου ο CMV προαγωγέας λειτουργεί πιο αποτελεσματικά.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η παραγωγή των πρωτεϊνών σε όλα τα αποθέματα (P1, P2 και P3). Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τους βακουλοϊούς για 24 ώρες και αναλύθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης τύπου Western (εικόνα 37). Αναλύθηκαν επίσης και τα αποθέματα P3 των βακουλοϊών με προαγωγέα πολυεδρίνης. Η έκφραση παρουσιάζεται ικανοποιητική, παράγονται όμως και κάποιες επιπλέον μορφές, για τις οποίες θα γίνει λόγος παρακάτω. Πρέπει να σημειωθεί πως η έκφραση των ιών με προαγωγέα πολυεδρίνης σε κύτταρα εντόμων είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη που προέρχεται από τους βακουλοϊούς με CMV προαγωγέα σε κύτταρα θηλαστικών.

1.3.1. ΧΡΗΣΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ E64 ΚΑΙ ΠΕΠΣΤΑΤΙΝΗ Α

Η ύπαρξη επιπλέον μικρότερων μορφών της παραγόμενης πρωτεΐνης θα μπορούσε να προέρχεται είτε από κάποιου είδους πρωτεόλυση λόγω της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης, είτε από κάποιο άλλο μηχανισμό, πιθανότατα εναλλακτικής μετάφρασης. Είναι πλέον γνωστό ότι τα κύτταρα εντόμων, όπως και αυτά των θηλαστικών, παράγουν πρωτεάσες ικανές να προκαλέσουν την αποδιάταξη ή/και τον τεμαχισμό πρωτεϊνών και ειδικότερα πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται (205-207). Κυριότερες πρωτεάσες είναι οι κυστεϊκές και ασπαρτικές πρωτεάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται εξαιτίας της πτώσης του pH που παρατηρείται στην αρχή της μόλυνσης. Για να μελετηθεί αν αυτή ήταν η αιτία της ύπαρξης των μικρότερων μορφών που παρατηρείται κατά την μόλυνση με τους ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς, χρησιμοποιήθηκαν δυο γνωστοί χημικοί αναστολείς οι E64 και πεπστατίνη Α (pepstatin A). Ο χημικός αναστολέας E64 έχει την ιδιότητα να ανατρέπει την δράση κυστεϊκών πρωτεασών, ενώ η ουσία πεπστατίνη Α τις ασπαρτικές πρωτεάσες. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τους βακουλοϊούς και μία ώρα μετά προστέθηκαν οι χημικοί αναστολείς, οι οποίοι και παρέμειναν μέχρι το τέλος της μόλυνσης. Παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλες συγκεντρώσεις, δεν προκάλεσαν καμία τοξικότητα στα κύτταρα. Στην εικόνα 38 παρουσιάζεται ενδεικτικά ο βακουλοϊός Bac1741, ο οποίος δημιουργεί και τις περισσότερες επιπλέον μορφές πρωτεΐνης από όλους τους βακουλοϊούς που κατασκευάσθηκαν. Όπως φαίνεται η προσθήκη των αναστολέων δεν μειώνει σημαντικά την παραγωγή των επιπλέον

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 39 : Απομόνωση καψιδίων μετά από μόλυνση κυττάρων εντόμων Sf9 με τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740, Bac1741, Bac1432 (core) και Bac1746 (GFP) για 24 ή 48 ώρες που ακολουθείται από ανοσοστύπωση τύπου Western με core και GFP αντισώματα. Στην δεξιά πλευρά απεικονίζονται οι ‘σωλήνες’ της δεύτερης υπερφυγοκέντρησης στους οποίους γίνεται ο διαχωρισμός των καψιδίων σε κλίση σακχαρόζης (λεπτομερής περιγραφή στην ενότητα ‘Υλικά και Μέθοδοι’) με λευκό φως (α) ή με UV ακτινοβολία (β).

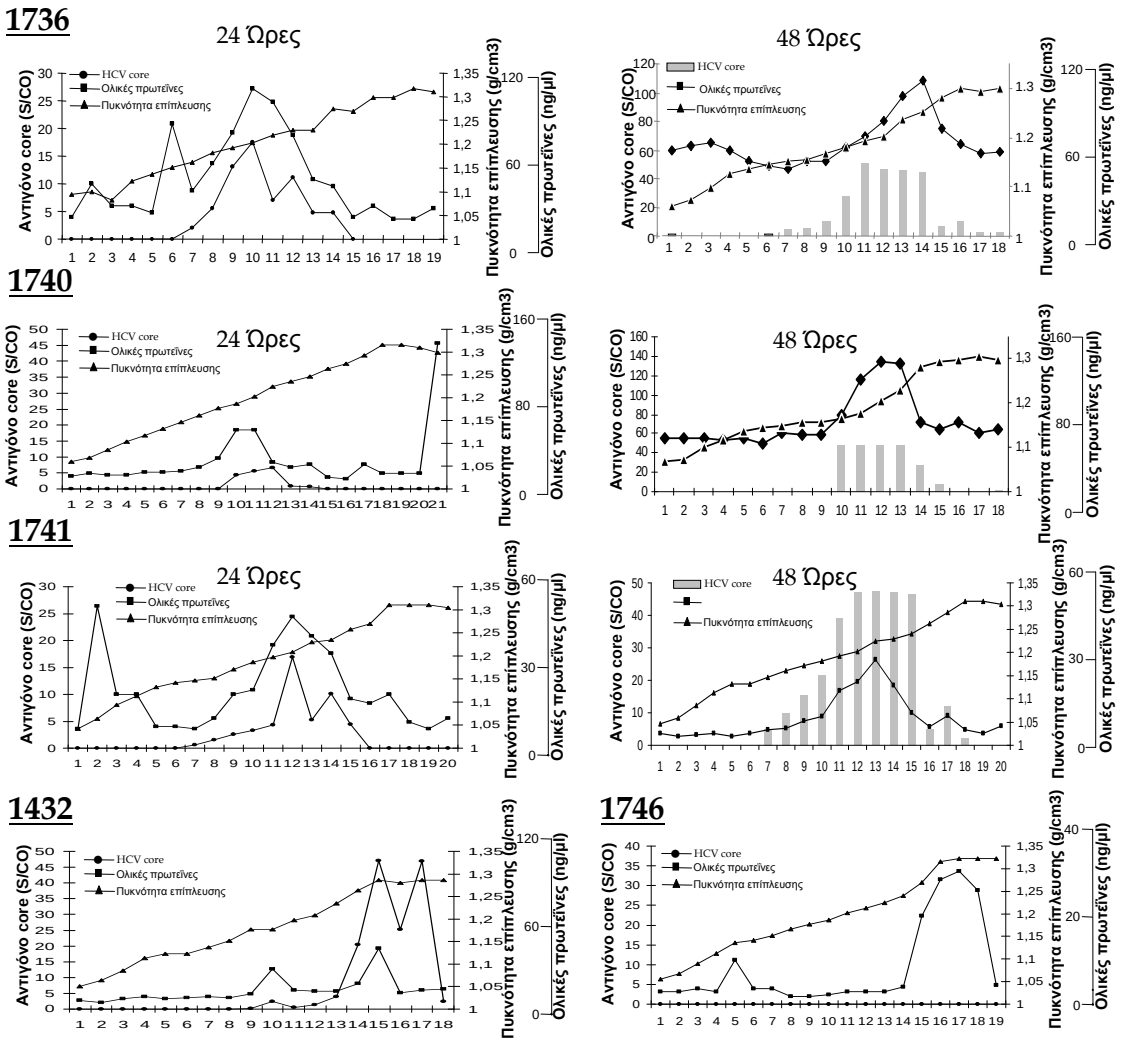
μικρότερων παραγόμενων πρωτεϊνών. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσίασαν και οι υπόλοιποι βακουλοϊοί (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις χημικών αναστολέων όμως το αποτέλεσμα παράμεινε το ίδιο. Το παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως η δημιουργία των συγκεκριμένων μικρότερων μορφών δεν οφείλεται στην πρωτεόλυση της αρχικής πρωτεΐνης αλλά σε κάποιον άλλο μηχανισμό. Πρέπει να τονιστεί πως τελευταίες μελέτες προτείνουν την ύπαρξη μικρότερων μορφών που προέρχονται από την κωδική περιοχή της πρωτεΐνης core. Έχει προταθεί πως υπάρχει μία ολόκληρη οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζονται 'mini-cores' και που το μέγεθος τους ποικίλλει από 8 έως 14kDa (43). Επιπλέον κάποιες από τις μορφές ενδέχεται να οφείλονται στα εσωτερικά κωδικόνια έναρξης (AUG) των core και GFP, τα οποία διατηρήθηκαν κατά την κατασκευή των πλασμιδίων.

1.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΓΥΜΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Η πρωτεΐνη core, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει την ιδιότητα να αυτοσυγκροτείται σε καψίδια (200). Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως ήταν πολύ πιθανό η προσθήκη της GFP πρωτεΐνης, μιας σχετικά μεγάλης πρωτεΐνης, να επηρέαζε την αυτοσυγκρότηση της. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος κατασκευάσθηκαν διαφορετικά πλασμίδια που περιείχαν την GFP είτε στο αμινοτελικό είτε στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης core (όπως περιγράφηκε ανωτέρω). Για την κατασκευή των ανασυνδυασμένων καψιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες που είχαν ήδη περιγραφεί από το εργαστήριο μας (200). Προτιμήθηκαν αρχικά οι βακουλοϊοί που είχαν προαγωγέα πολυεδρίνης εξαιτίας της μεγαλύτερης ποσότητας παραγόμενης πρωτεΐνης.

Κύτταρα εντόμων Sf9 μολύνθηκαν με βακουλοϊούς για 24 ή 48 ώρες και εκχυλίσματα από μολυσμένα κύτταρα απομονώθηκαν, υπερφυγοκεντρήθηκαν και κλασματοποιήθηκαν σε κλίση σακχαρόζης, όπως ακριβώς περιγράφεται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Στην εικόνα 39 παρουσιάζονται πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western όπου ανιχνεύθηκε πρωτεΐνη core και GFP στα κλάσματα με την αναμενόμενη πυκνότητα σακχαρόζης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και το μοριακό βάρος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσιάστηκαν μικρές διαφορές ανάμεσα στις δυο συνθήκες (χρονική διάρκεια μόλυνσης) που αφορούν κυρίως στην ποσότητα των παραγόμενων καψιδίων. Επιλέχτηκε να χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη εργασία καψίδια που παράγονται στις 48 ώρες. Κάποιες από τις μικρότερες μορφές πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν στις παραπάνω παραγράφους εξακολουθούν να υπάρχουν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 40 : Ανάλυση σε διαβάθμιση πυκνότητας σακχαρόζης εκχυλισμάτων από κύτταρα Sf9 μολυσμένα με τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740, Bac1741, Bac1432 (core) και Bac1746 (GFP). Τα κλάσματα από την διαβάθμιση σακχαρόζης αναλύθηκαν με ELISA για την παρουσία core πρωτεΐνης (ράβδοι ή κύκλοι). Οι ρόμβοι δείχνουν την πυκνότητα επίπλευσης (ανωτική πυκνότητα) του κάθε κλάσματος και τα τετράγωνα τη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης.

Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι ίσως να συμμετέχουν στη δημιουργία του καψιδίου ή να δημιουργούν από μόνες τους καψίδιο. Αυτή η ιδιότητα της core πρωτεΐνης ενδέχεται να είναι ο λόγος για την μεγάλη ανομοιογένεια που παρατηρείται στα καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C (55). Στην εικόνα 39 παρουσιάζονται και καψίδια που προέρχονται από την πρωτεΐνη core (200). Στην ίδια εικόνα απεικονίζεται και η κλασματοποίηση του βακουλοϊού 1746, υπεύθυνου για την παραγωγή της πρωτεΐνης GFP που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας στη συγκεκριμένη εργασία.

Στη συνέχεια τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από τη διαβάθμιση σακχαρόζης αναλύθηκαν με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) και με δοκιμασία Bradford για την παρουσία της πρωτεΐνης core. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 40. Η πυκνότητα των κλασμάτων με σημαντική ανοσοαντίδραση για το core ήταν 1,2 με 1,3g/cm^3. Αυτό το εύρος πυκνότητας βρίσκεται σε συμφωνία με την πυκνότητα που έχει αναφερθεί για τα νουκλεοκαψίδια που απομονώνονται από τον ορό ασθενών (57,208), ή για τα ανασυνδυασμένα καψίδια που παράγονται κατά την έκφραση της πρωτεΐνης σε άλλα συστήματα έκφρασης (24).

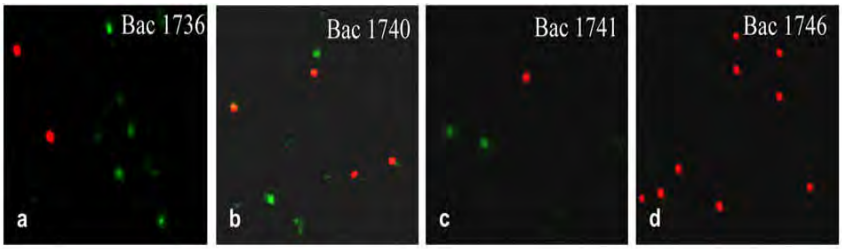
Θα πρέπει να τονιστεί πως έγιναν αρκετές δοκιμές για την απομόνωση γυμνών καψιδίων από κύτταρα θηλαστικών με τη χρήση των κατασκευασθέντων βακουλοϊών με CMV προαγωγέα. Η μικρή παραγωγή πρωτεΐνης οδήγησε σε απομόνωση πολύ μικρών ποσοτήτων καψιδίων κάνοντας ιδιαίτερα δύσκολη τη χρήση τους σε αυτή την διατριβή. Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα καψίδια που προήλθαν από την μόλυνση κυττάρων εντόμων Sf9 με τους κατασκευασθέντες βακουλοϊούς με προαγωγέα πολυεδρίνης.

Τα κύτταρα εντόμων είναι ευκαρυωτικά και παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με αυτά των θηλαστικών. Παρόλα αυτά το σύστημα γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών τους διαφέρει από το αντίστοιχο των θηλαστικών με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να γλυκοζυλιώνονται με διαφορετικό τρόπο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως η πρωτεΐνη core δεν γλυκοζυλιώνεται, επομένως το σύστημα είναι ενδιαφέρον για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων core πρωτεΐνης και συνεπώς και καψιδίων.

1.4.1. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

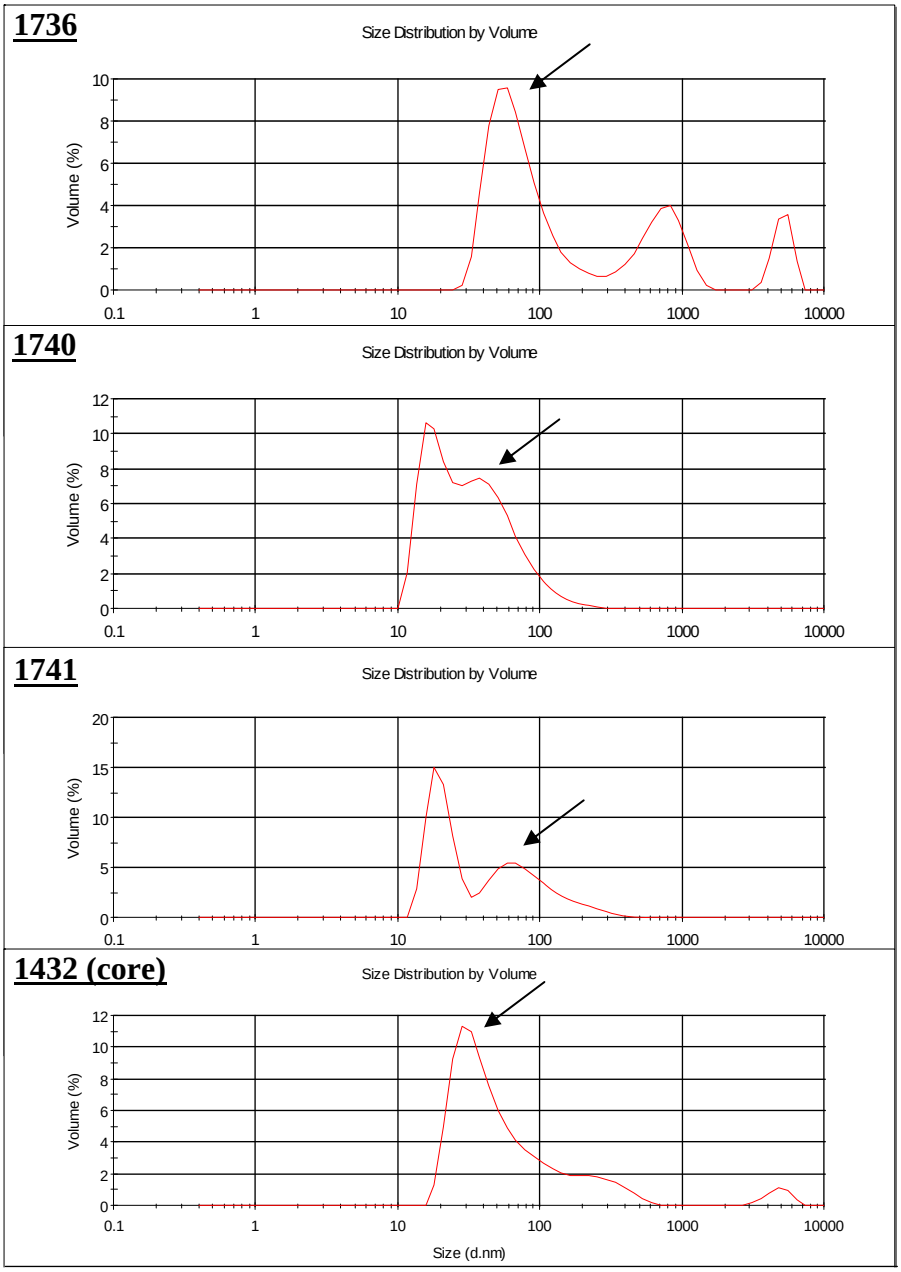
Η ύπαρξη πρωτεΐνης core στα κλάσματα με τη σωστή πυκνότητα σακχαρόζης δεν είναι ικανή να αποδείξει από μόνη της την ύπαρξη καψιδίων. Για αυτό το λόγο θεωρήθηκε αναγκαία η παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο καθώς και η μέτρηση του μεγέθους τους. Πρόσφατα αναφέρθηκε ο ανοσοφθορισμός μεμονωμένων ιικών σωματιδίων (209,210) και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 41 : Παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο των φθοριζόντων καψιδίων.

Κλάσματα από απομόνωση καψιδίων του Bac1736 (a), Bac1740 (b), Bac1741 (c) και Bac1746, μαζί με μικροσφαιρίδια κόκκινου χρώματος και διαμέτρου 100nm.



Εικόνα 42 : Πειράματα δυναμικής σκέδασης του φωτός (DLS-Dynamic Light Scattering) με κλάσματα που περιέχουν ανασυνδυασμένα καψίδια.

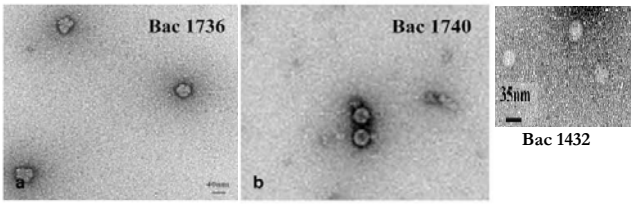
αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για την οπτικοποίηση των απομονωμένων ανασυνδυασμένων καψιδίων και την εκτίμηση της διαμέτρου τους. Ανεξάρτητοι κόκκινοι και πράσινοι κόκκοι μπορούσαν να εντοπιστούν στο δείγμα που περιείχε τα μικροσφαιρίδια μαζί με τα ανασυνδυασμένα καψίδια (εικόνα 41). Οι κόκκινοι κόκκοι αντιστοιχούν στα φθορίζοντα μικροσφαιρίδια, που χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπο αναφοράς, ενώ οι πράσινοι κόκκοι αντιστοιχούν στις δομές που απομονώθηκαν με την διαβάθμιση σακχαρόζης, και που φθορίζουν λόγω της πρωτεΐνης GFP που περιέχουν. Η ειδικότητα των κατασκευασθέντων καψιδίων αποδείχθηκε εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο σε δείγμα που περιείχε τα μικροσφαιρίδια και το κλάσμα από τη διαβάθμιση του αρνητικού μάρτυρα. Στην περίπτωση αυτή μόνο τα μικροσφαιρίδια μπορούσαν να ανιχνευτούν. Το μέγεθος υπολογίστηκε περίπου στα δύο τρίτα της διαμέτρου των μικροσφαιριδίων 100nm.

1.4.2. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Το παραπάνω πείραμα με συνεστιακό μικροσκόπιο απέδειξε ότι τα καψίδια που κατασκευάσθηκαν φθορίζουν, έχουν σχήμα σφαιρικό και διάμετρο περίπου 60nm. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι απόλυτη κυρίως λόγω της μειωμένης ικανότητας του συνεστιακού μικροσκοπίου να διακρίνει με ευκρίνεια μόρια μικρότερα από 200nm. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε μια άλλη τεχνική που ονομάζεται δοκιμασία δυναμικής σκέδασης του φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS) (σε συνεργασία με τον Δρ. Ζουριδάκη Μ., Τμήμα Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ). Πρόκειται για μία ιδιαίτερα διαδεδομένη τεχνική για τη μέτρηση της διαμέτρου/μεγέθους μορίων και σφαιρικών καψιδίων· θεωρείται δε, συμπληρωματική του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (203,204). Έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση καψιδίων και άλλων ιών όπως είναι ο ιός της ανοσοεπάρκειας του ανθρώπου τύπου 1 (HIV-1) και ο ιός της γρίπης (influenza virus) (211,212).

Το μεγάλο μειονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι πως αν υπάρχουν άλλα μόρια στο παρασκεύασμα όπως μόρια σακχαρόζης ή ακόμα και σκόνης, τα αποτελέσματα αλλοιώνονται. Επιπλέον, χρειάζεται μεγάλη συγκέντρωση καψιδίων ώστε να εκτελεστεί μια ικανοποιητική μέτρηση. Για το σκοπό αυτό τα κλάσματα υπέστησαν ένα στάδιο διαλυτοποίησης ώστε να απομακρυνθεί η σακχαρόζη και ένα στάδιο συμπύκνωσης πριν τις μετρήσεις (που περιγράφονται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'). Όπως φαίνεται στην εικόνα 42, η κορυφή των καμπυλών αντικατοπτρίζει το μέγεθος του μεγαλύτερου πληθυσμού σωματιδίων σε κάθε δείγμα. Η διάμετρος των καψιδίων υπολογίζεται με την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 43 : Επιλεγμένες φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των θετικών κλασμάτων για core και GFP πρωτεΐνες των καψιδίων που προέρχονται από τους βακουλοϊούς Bac1736, Bac1740 και Bac1432.

συγκεκριμένη τεχνική στα: 50-60nm για τα καψίδια 1736, 1740 και 1741, και 35nm για τα καψίδια core. Πρέπει να τονιστεί όμως πως στα δείγματα των καψιδίων 1740 και 1741 μετρήθηκαν και μορφές περίπου 20nm που ίσως να αποτελούν καψομερίδια ή μικρότερα καψίδια. Επιπλέον, στα καψίδια 1736 βρέθηκαν και μεγαλύτερες μορφές που ίσως να αντικατοπτρίζουν μόρια σακχαρόζης ή ακόμα και απλή κοινή σκόνη. Ως μάρτυρα για την σωστή λειτουργία της συσκευής μέτρησης χρησιμοποιήθηκαν τα μικροσφαιρίδια 100nm που περιγράφηκαν πιο πάνω. Η μέτρηση τους αποδείχτηκε ιδιαίτερα ακριβής (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

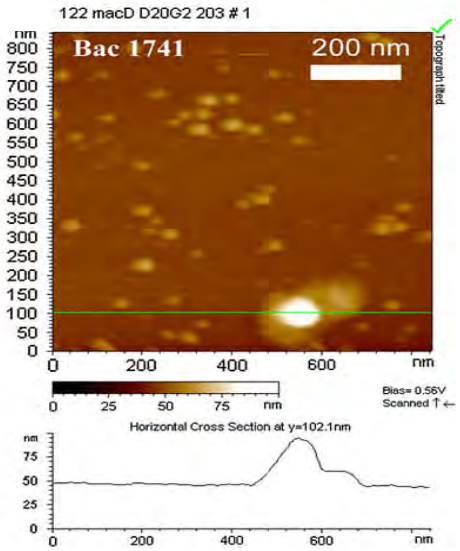
1.4.3. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Όλες οι προηγούμενες τεχνικές έδειξαν πως τα θετικά σε core ή/και GFP πρωτεΐνες κλάσματα, περιέχουν σφαιρικές φθορίζουσες μορφές, μεγέθους 50-60nm για τα core σε σύζευξη με GFP καψίδια και 35nm για τα core καψίδια. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα, και για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Έτσι, επιτεύχθηκε μια συνεργασία με το εργαστήριο του Δρ. Blaas D. (Max F. Perutz laboratories, Medical University of Vienna, Austria). Τα θετικά ως προς την πρωτεΐνη core κλάσματα υπέστησαν διαπίδυση, συμπυκνώθηκαν με την βοήθεια ειδικών στηλών και στη συνέχεια στάλθηκαν στο συγκεκριμένο εργαστήριο. Την ηλεκτρονική μικροσκοπία ανέλαβε η Δρ. Pickl-Herk AM. σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται στο συγκεκριμένο εργαστήριο για τους ρινοϊούς (rhinovirus). Τεχνικές λεπτομέρειες για την ακριβή μέθοδο που ακολουθήθηκε περιέχονται στο πρακτικό μέρος της δημοσίευσης της παρούσας διατριβής στο περιοδικό Biochimie (201). Στην εικόνα 43 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αρνητικής χρώσης όπου το μέγεθος των καψιδίων φαίνεται να αντιστοιχεί με αυτό που είχε προταθεί με τις προηγούμενες τεχνικές. Εντούτοις, υπήρξαν αρκετές δυσκολίες με τα καψίδια που προέρχονται από τον βακουλοϊό 1741 και έτσι δεν ήταν εφικτή μια φωτογραφία όπως για τα υπόλοιπα φθορίζοντα καψίδια.

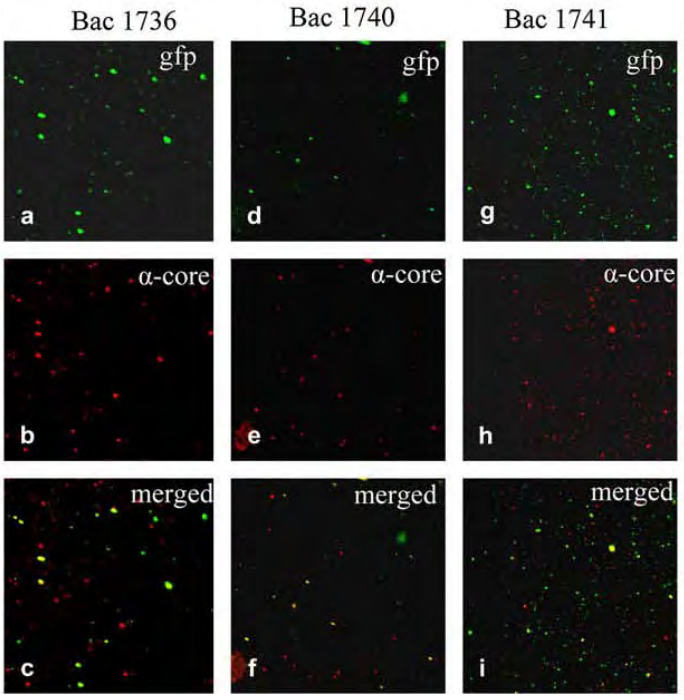
1.4.4. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΤΟΜΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ

Το γεγονός ότι τα κλάσματα που είχαν απομονωθεί μετά από μόλυνση με τον βακουλοϊό 1741 δεν είχαν δώσει μια εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ικανή να αποδείξει την ύπαρξη καψιδίων, αποτέλεσε μείζον πρόβλημα κυρίως γιατί όλες οι προηγούμενες τεχνικές που είχαν χρησιμοποιηθεί μέχρι εκείνη τη στιγμή έδιναν αποτελέσματα ανάλογα με αυτά των υπόλοιπων καψιδίων για τα καψίδια 1741. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 44 : Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM-Atomic Force Microscopy) για τα καψίδια που προέρχονται από το βακουλοϊό Bac1741.



Εικόνα 45 : Μελέτη της αντιγονικότητας των κατασκευασθέντων φθοριζόντων καψιδίων.

Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στην GFP πρωτεΐνη που περιέχουν τα καψίδια, το κόκκινο σε ότι έχει αναγνωριστεί από το αντίσωμα core και το κίτρινο στον συνεντοπισμό κόκκινου και πράσινου χρώματος.

χρησιμοποιηθεί μια άλλη τεχνική, η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy-AFM), κατά την οποία οι δομές μελετούνται στη φυσική τους κατάσταση χωρίς να αλλοιώνονται από διάφορες κατεργασίες όπως συμβαίνει με την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επιπλέον, η τεχνική αυτή επιτρέπει τη μελέτη της επιφάνειας των μορίων και δίνει εικόνες με πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή τους (213,214).

Έτσι, επιτεύχθηκε συνεργασία με το εργαστήριο του Δρ. Hinerdorfer P. και Δρ. Rong Z. (Institute of Biophysics, J. Kepler University, Linz, Austria), οι οποίοι μελέτησαν τις συγκεκριμένες δομές. Στην εικόνα 44 παρουσιάζεται μία σφαιρική δομή που μοιάζει με την αναμενόμενη για τα φθορίζοντα καψίδια 1741, μεγέθους περίπου 60nm. Το γεγονός ότι δεν ήταν ικανοποιητικά τα αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας για τα καψίδια από τον 1741 βακουλοϊό οφείλεται πιθανότατα είτε στο μικρό αριθμό τους (που επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός-εικόνα 42, αλλά και από τα πειράματα σε συνεστιακό μικροσκόπιο-εικόνα 41) είτε από μία πιθανά μεγαλύτερη ευαισθησία του συγκεκριμένου δείγματος στις αναγκαίες για την ηλεκτρονική μικροσκοπία κατεργασίες. Λεπτομέρειες για την μεθοδολογία της συγκεκριμένης τεχνικής υπάρχουν στην δημοσιευμένη εργασία στο περιοδικό Biochimie (201).

1.4.5. ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Για να επιβεβαιωθεί η αντιγονική ιδιότητα των κατασκευασθέντων καψιδίων (πράσινου χρώματος λόγο της GFP πρωτεΐνης), αλλά και η αναγνώριση τους από το αντίσωμα που κατασκευάσθηκε στο εργαστήριο, τα καψίδια σημάνθηκαν με αντίσωμα ενάντι της πρωτεΐνης core (κόκκινο χρώμα) και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην εικόνα 45 αποδεικνύεται πως τα περισσότερα καψίδια αναγνωρίζονται από το core αντίσωμα, μιας και παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα που υποδεικνύει τον συνεντοπισμό. Συνεπώς, τα καψίδια αυτά παρουσιάζουν υψηλή αντιγονικότητα. Παρόλα αυτά η ύπαρξη καψιδίων με είτε το ένα χρώμα είτε το άλλο, ενισχύει την άποψη πως υπάρχουν διάφορες μορφές καψιδίων έστω και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από τις κύριες μορφές.

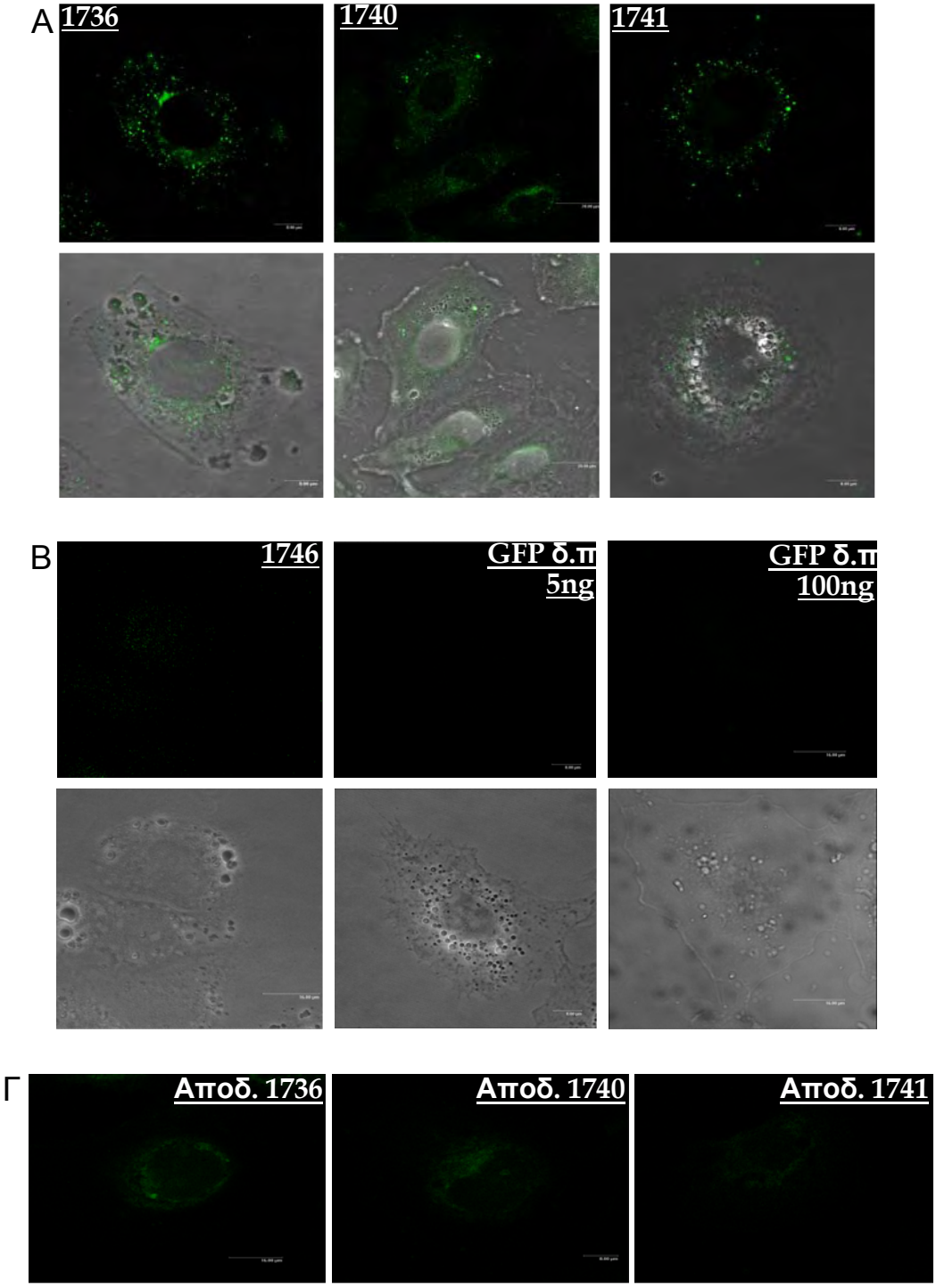
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλες οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν επιβεβαιώνουν πως το σύστημα των βακουλοϊών μπορεί να παράγει καψίδια που έχουν το αναμενόμενο μέγεθος και σχήμα. Επιπλέον, αποδεικνύουν πως η πρωτεΐνη core μπορεί να συζευχθεί στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό της άκρο με την GFP πρωτεΐνη, και να δημιουργηθούν φθορίζοντα καψίδια.

Τα γυμνά καψίδια με core πρωτεΐνη ονομάστηκαν για την παρούσα εργασία 'core καψιδια' και τα αντίστοιχα που περιέχουν την GFP πρωτεΐνη πήραν το όνομα του βακουλοϊού από τον οποίο προήλθαν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 46 : Ανάλυση της πρόσδεσης και εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα.

Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία 37°C με τα καψίδια 1736, 1740 και 1741 (Α) καθώς και με τον μάρτυρα 1746 (Β). Χρησιμοποιήθηκε επίσης διαλυτή GFP πρωτεΐνη (GFP δ.π.) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5 ή 100ng) η οποία επωάστηκε με τα κύτταρα για μια ώρα σε θερμοκρασία 37°C (Β). Τέλος, τα καψίδια αποδιατάχτηκαν με βρασμό και μετά προστέθηκαν στα κύτταρα για μια ώρα στους 37°C (Γ). Παρουσιάζονται μεμονωμένες οπτικές τομές από συνεστιακό μικροσκόπιο.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

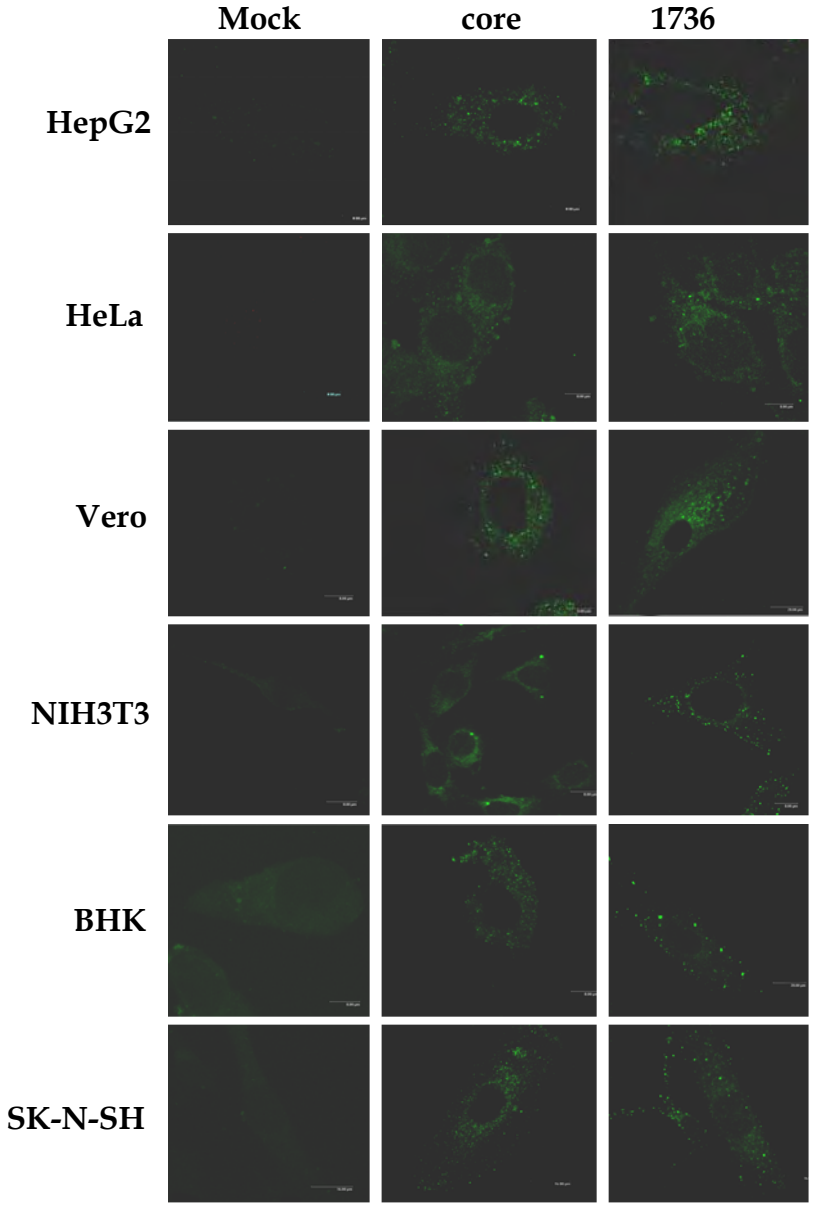
2.1. ΠΡΟΣΔΕΣΗ-ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Ο φυσικός 'στόχος' του ιού της ηπατίτιδας C είναι το ήπαρ και επομένως πρωταρχικός κυτταρικός στόχος τα ηπατικά κύτταρα. Για να εξετάσουμε κατά πόσο τα ανασυνδυασμένα καψίδια, με ή χωρίς GFP πρωτεΐνη, που απομονώσαμε μπορούν να προσδεθούν και να εισέλθουν στα κύτταρα, προσθέσαμε καψίδια στο θρεπτικό υλικό κυττάρων Huh7. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C για μια ώρα, και η πρόσδεση ή/και εισαγωγή στα κύτταρα παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται από την ύπαρξη της στικτής χρώσης (εικόνα 46-Α), παρατηρήθηκε πρόσδεση των απομονωμένων ανασυνδυασμένων καψιδίων στα κύτταρα ηπατικής προέλευσης. Όπως ήταν αναμενόμενο, δεν παρατηρήθηκε πρόσδεση με τη χρήση του κλάσματος από την αντίστοιχη διαβάθμιση σακχαρόζης του αρνητικού μάρτυρα (εικόνα 46-Β). Επιπλέον, η αποδιάταξη του κλάσματος με θέρμανση δεν έδωσε την χαρακτηριστική κοκκιώδη εικόνα υποδηλώνοντας ότι το σήμα που παρατηρείται στο μικροσκόπιο είναι ειδικό για τα κλάσματα που περιέχουν καψίδια (εικόνα 46-Γ).

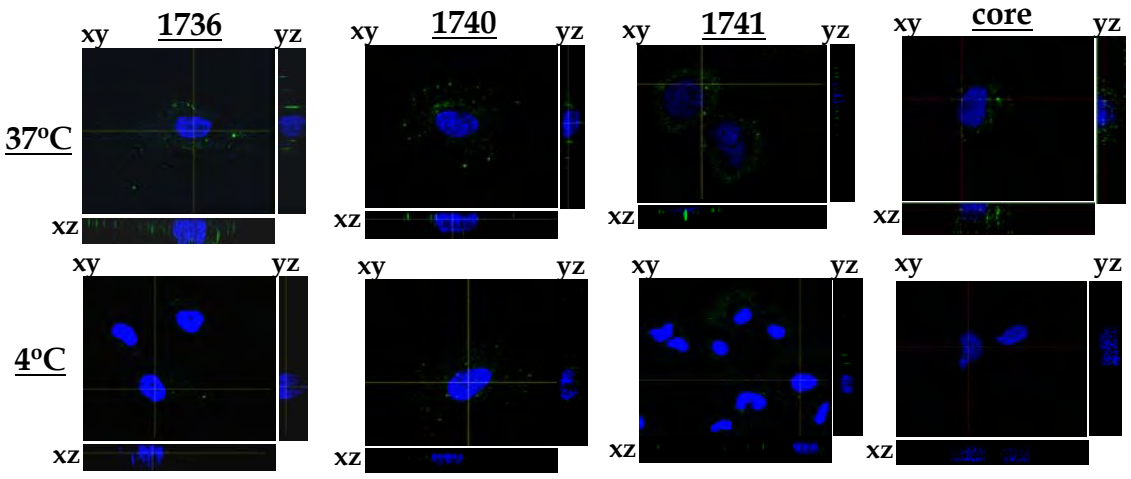
Για να αποδειχτεί ότι τα καψίδια έχουν την ιδιότητα να προσδένονται και πιθανά να εισέρχονται στα κύτταρα με εδικό μηχανισμό χρησιμοποιήθηκε διαλυτή GFP πρωτεΐνη βακτηριακής προέλευσης. Ακόμα και σε συγκέντρωση δεκαπλάσια (100 ng) από αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τα καψίδια, δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση στο εσωτερικό του κυττάρου (εικόνα 46-Β). Επιπλέον, η χρήση ειδικού πολυκλωνικού GFP αντισώματος στα συγκεκριμένα κύτταρα δεν έδωσε σήμα (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Όλες αυτές οι πληροφορίες υποδηλώνουν πως η καψιδιακή μορφή είναι απαραίτητη για την είσοδο, και πως η GFP πρωτεΐνη που περιέχεται στα καψίδια δεν φαίνεται να επηρεάζει τον συγκεκριμένο μηχανισμό.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των core καψιδίων, με ή χωρίς GFP πρωτεΐνη, σε άλλες κυτταρικές σειρές διαφορετικής προέλευσης. Χρησιμοποιήθηκαν ενδεικτικά τα καψίδια 1736 και τα core ως σημείο αναφοράς. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν μετά από προσθήκη των ανάλογων καψιδίων για μία ώρα σε θερμοκρασία 37°C, μετά από απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων καψιδίων. Για τα core καψίδια ακολούθησε σήμανση με core αντίσωμα. Αρχικά δοκιμάσθηκε μια επιπλέον κυτταρική σειρά ηπατικής προέλευσης (HepG2) και στη συνέχεια μια σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων (HeLa). Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που προέρχονται από διάφορα ζώα, όπως πίθηκους (Vero),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 47 : Ανάλυση της πρόσδεσης των καψιδίων σε κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 48 : Ανάλυση της εισόδου των καψιδίων από διάφορες 'οπτικές γωνίες' σε Huh7 κύτταρα.

Τα πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στα καψίδια (με ανοσοσήμανση για την περίπτωση των core καψιδίων) ενώ το μπλε στην ουσία To-pro3 που βάφει ειδικά τους πυρήνες.

ποντίκια (NIH/3T3) και χάμστερ (BHK). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε η γνωστή κοκκιώδης μορφή των καψιδιών στην περι-πυρηνική περιοχή ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ανάμεσα στα core καψίδια και core σε σύζευξη με GFP καψίδια. Η μόνη κυτταρική σειρά που δεν έδωσε αντίστοιχες εικόνες τόσο για τα core όσο και για τα φθορίζοντα καψίδια, είναι τα ανθρώπινα αστεροειδή ηπατικά κύτταρα LX-2 (hepatic stellate cells) (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα καψίδια (με ή χωρίς GFP) προσδένονται και σε νευρικά κύτταρα SK-S-NH, μιας και έχει αποδειχτεί πως ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί να μολύνει νευρικά κύτταρα, και έχει συνδεθεί με αρκετές νευρολογικές παθήσεις (17,18).

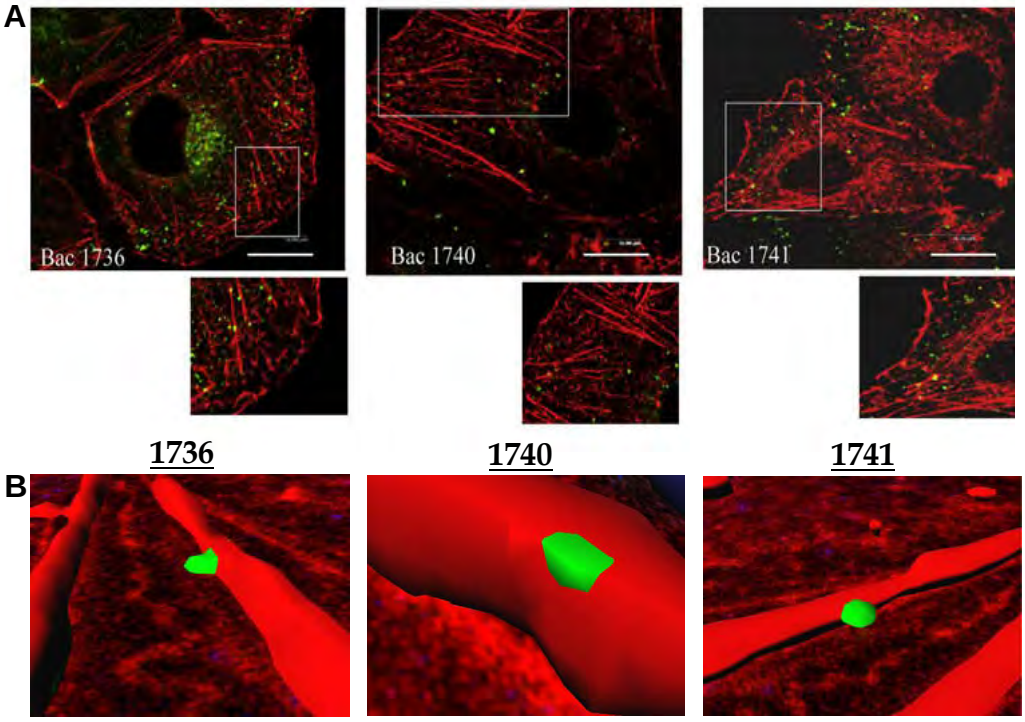
Επιπλέον, είναι αποδεχτό πως ο ιός της ηπατίτιδας C μπορεί να μολύνει εκτός από τα ηπατικά κύτταρα, και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως B και T-λεμφοκύτταρα (14-16). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η πρόσδεση και η πιθανή είσοδος τους σε B και T-λεμφοκύτταρα (BJAB και Jurkat αντίστοιχα) καθώς και σε μακροφάγα (U937). Παρατηρήθηκε ότι τα καψίδια 1736, 1740 και 1741 έχουν την ικανότητα να προσδεθούν και να εισαχθούν σε αυτά τα κύτταρα. Αυτό το κομμάτι της εργασίας εκτελέστηκε από την υποψήφια διδάκτορα Σέρτη Ε., λεπτομέρειες του οποίου υπάρχουν στο δημοσιευμένο μέρος αυτής της εργασίας στο περιοδικό Biochimie (201).

Περαιτέρω μελέτη βρίσκεται σε εξέλιξη στο εργαστήριο, ώστε να προσδιοριστούν οι κοινοί υποδοχείς που υπάρχουν στις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν ώστε να εντοπιστούν οι πιθανοί υποδοχείς που ενδεχομένως να χρησιμοποιούνται για την είσοδο των core καψιδίων στα κύτταρα.

2.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

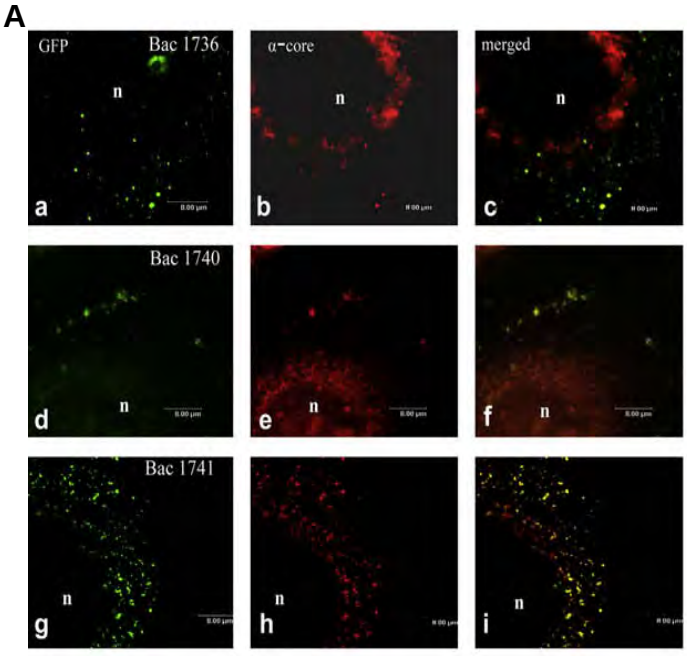
Στις εικόνες 46 και 47 που περιγράφηκαν πιο πάνω, οι φθορίζοντες κόκκοι μπορούσαν να παρατηρηθούν μέσα στο κυτταρόπλασμα και πιο συγκεκριμένα πολύ κοντά στον πυρήνα, υποδηλώνοντας ότι τα καψίδια μπορούν να εισέλθουν στα κύτταρα. Για να μελετηθεί το φαινόμενο χρησιμοποιήθηκε αρχικά μια διαφορετική 'οπτική γωνία' των οπτικών τομών από το συνεστιακό μικροσκόπιο. Συνήθως οι παρατηρήσεις εκτελούνται στον άξονα χ/ψ (x/y). Το συνεστιακό μικροσκόπιο έχει όμως την ιδιότητα να παίρνει φωτογραφίες από πολλές τομές του ιδίου κυττάρου και να προσαρμόζει τις εικόνες στους άξονες ψ/ζ (y/z) και χ/ζ (x/z). Με αυτό τον τρόπο οι εικόνες αποκτούν 'βάθος'. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα καψίδια επωάστηκαν για μία ώρα στους 37°C, στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και οι πυρήνες τους χρωματίστηκαν με To-Pro3, μία ουσία που σημαίνει

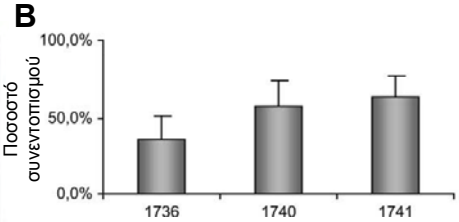
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 49 : Είσοδος των φθοριζόντων καψιδίων σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7.

Κύτταρα Huh7 επωάσθηκαν με τα καψίδια 1736, 1740 και 1741 (πράσινο χρώμα) για μία ώρα στους 37ºC, μονιμοποιήθηκαν και χρωματίστηκαν με φαλλοϊδίνη κόκκινου χρώματος. **Α :** Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου. Στη μεγέθυνση επισημαίνονται τμήματα του κυττάρου όπου φαίνεται ο συνεντοπισμός (κίτρινο χρώμα) των μικροϊνιδίων ακτίνης με τα καψίδια. **Β :** Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου επεξεργασμένες με το λογισμικό Imaris 5.7.2. Τα καψίδια (πράσινα) παρουσιάζονται κοντά, ίσως και πάνω, στα μικροϊνίδια ακτίνης (κόκκινα).





Εικόνα 50 : Συνεντοπισμός (κίτρινο χρώμα) των φθοριζόντων καψιδίων 1736, 1740 και 1741 (πράσινο χρώμα) με το core αντίσωμα (κόκκινο χρώμα) σε κύτταρα Huh7.

Α : Οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου.

Β : Ποσοτικός προσδιορισμός του συνεντοπισμού, με τη χρήση του λογισμικού Image-Pro Plus.

τους πυρήνες με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Αν τα καψίδια εισέρχονται μέσα στο κύτταρο τότε στις εικόνες με άξονες ψ/ζ και χ/ζ θα πρέπει να υπάρχουν καψίδια πολύ κοντά στον πυρήνα, όπως και παρατηρήθηκε (εικόνα 48).

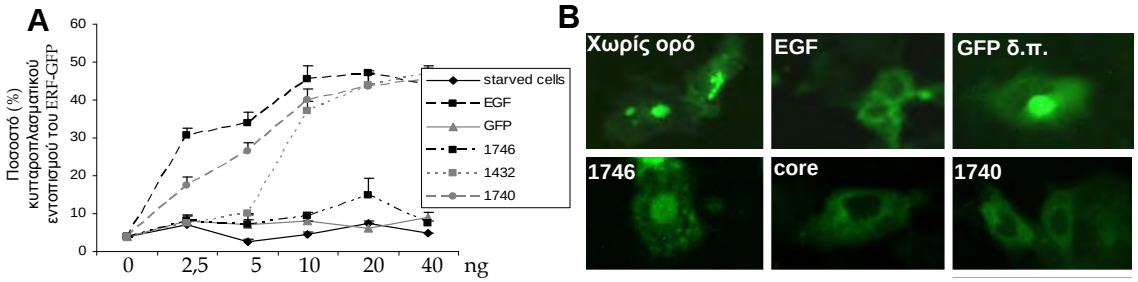
Σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου, έχει δειχτεί ότι τα core καψίδια εισέρχονται στο κύτταρο στους 37°C όχι όμως στους 4°C, όπου τα καψίδια απλά προσδένονται αλλά δεν εισέρχονται (200). Η ιδιότητα αυτή έχει αναφερθεί και σε αρκετούς άλλους ιούς (189,215). Για να ελεγχθεί αν η συγκεκριμένη ιδιότητα υπάρχει και στα κατασκευασθέντα φθορίζοντα καψίδια, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν στους 4°C για μία ώρα, προστέθηκαν καψίδια και η επώαση συνεχίστηκε για μισή επιπλέον ώρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση όπως ακριβώς και προηγουμένως, και μελετήθηκαν οπτικές τομές στον άξονα ψ/ζ και χ/ζ. Όπως φαίνεται στην εικόνα 48 δεν παρατηρούνται πράσινα κοκκία στην περι-πυρηνική περιοχή ούτε των core καψιδίων, αλλά ούτε και των 1736, 1740 και 1741, υποδηλώνοντας ότι τα καψίδια δεν εισέρχονται στο κύτταρο σε αυτή την θερμοκρασία.

Μια επιπλέον απόδειξη ότι τα ανασυνδυασμένα καψίδια έχουν την ιδιότητα όχι μόνο να προσδένονται αλλά και να εισέρχονται σε ηπατικά κύτταρα, επήλθε με τη χρήση φαλλοϊδίνης (Alexa 546-phalloidin), μιας ουσίας η οποία προσδένεται ανάμεσα στα μόρια της F-ακτίνης και χρωματίζει τα μικροϊνίδια της ακτίνης. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα καψίδια για μία ώρα σε θερμοκρασία 37°C, και έπειτα μονιμοποιήθηκαν όπως ακριβώς έχει περιγραφεί και πιο πάνω. Στην εικόνα 49-Α παρουσιάζονται οπτικές τομές από ηπατικά κύτταρα Huh7, που περνάνε από τη μέση του πυρήνα, και στις οποίες παρατηρείται εντοπισμός πολύ κοντά στα μικροϊνίδια ακτίνης όλων των ανασυνδυασμένων καψιδίων που κατασκευάστηκαν. Μια επιπλέον ένδειξη για το συγκεκριμένο φαινόμενο αποκτήθηκε όταν οι εικόνες επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Imaris 5.7.2. (Bitplane), το οποίο έχει την ιδιότητα να μετατρέπει τις 'επίπεδες' εικόνες σε τρισδιάστατες. Τα πράσινα καψίδια βρέθηκαν πολύ κοντά, ίσως και πάνω, στα μακριά μικροϊνίδια της ακτίνης (κόκκινο χρώμα-εικόνα 49-Β). Συμπερασματικά, τα φθορίζοντα γυμνά καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C έχουν την ιδιότητα να προσδένονται και να εισέρχονται σε ηπατικά κύτταρα.

2.3. ΕΙΣΟΔΟΣ ΧΩΡΙΣ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου έδειξε πως τα core καψίδια έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται στα κύτταρα χωρίς να αποικοδομούνται στις χρονικές περιόδους που δοκιμάστηκαν (200). Για να μελετηθεί αν η συγκεκριμένη ιδιότητα ισχύει και στα κατασκευασθέντα φθορίζοντα καψίδια, κύτταρα ηπατικής προέλευσης (Huh7) επωάστηκαν με τα καψίδια 1736, 1740 και 1741, για μια ώρα σε θερμοκρασία 37°C, μονιμοποιήθηκαν και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 51 : Κυτταροπλασματική μετατόπιση της πρωτεΐνης GFP-ERF παρουσία των καψιδιων core και 1740.

A : Γραφική παράσταση στην οποία παρουσιάζεται η αύξηση της μετατόπισης αναλογικά με τη συγκέντρωση.

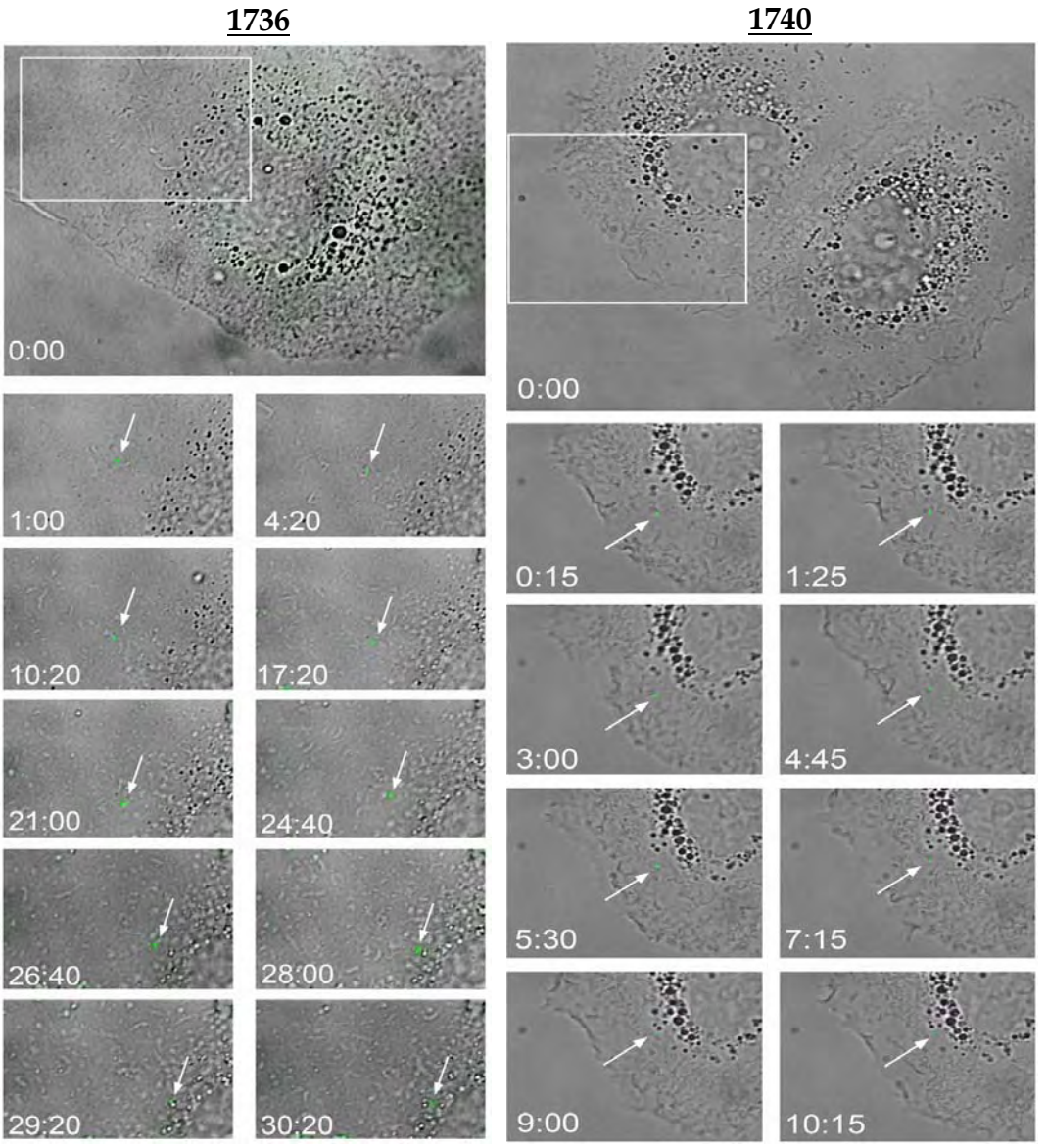
B : Ενδεικτικές φωτογραφίες κυττάρων Huh7 επιμολυσμένα με το πλασμίδιο GFP-ERF.

σημάνθηκαν με core αντίσωμα (κόκκινος χρωματισμός). Στη συνέχεια τα κύτταρα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο και οπτικές τομές παρουσιάζονται στην εικόνα 50. Όπως φαίνεται υπάρχει σχεδόν πλήρης συνεντοπισμός που παρουσιάζεται με τον χαρακτηριστικό κίτρινο χρωματισμό. Ο συνεντοπισμός αυτός είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα ειδικό λογισμικό, το Image-Pro Plus. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα έχει την δυνατότητα να μετράει την ποσότητα του πράσινου χρώματος που βρίσκεται μέσα σε κόκκινο χρώμα (ή και άλλους συνδυασμούς). Με αυτό τον τρόπο ουσιαστικά ποσοτικοποιούνται τα πειράματα. Για να είναι όμως σωστή η μέτρηση χρειάζονται αρκετές οπτικές τομές από διαφορετικά κύτταρα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση εκτελέστηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και μετρήθηκαν με το λογισμικό από 9 έως 15 φωτογραφίες από το κάθε πείραμα. Στην εικόνα 50-Β παρουσιάζονται οι μετρήσεις του ποσοστού των καψιδίων που συνεντοπίζονται με το core αντίσωμα. Τα καψίδια 1736 παρουσιάζουν μικρότερο συνεντοπισμό από τα υπόλοιπα και πιθανά να οφείλεται στην διαφορετική δομή του καψιδίου που ίσως να μην αναγνωρίζεται από το αντίσωμα τόσο αποτελεσματικά όσο τα υπόλοιπα καψίδια. Το σημαντικό όμως είναι πως μετά από μία ώρα επώασης με τα κύτταρα, τα καψίδια δεν φαίνονται να έχουν αποδιαταχτεί, ή αν έχει συμβεί αυτό δε φαίνεται να επηρεάζει την αναγνώριση τους από το αντίσωμα της core.

2.4. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ CORE ΚΑΙ CORE ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΤΗ GFP ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΚΑΨΙΔΙΑ

Είναι αποδεδειγμένο ότι αλληλεπίδραση ιικών καψιδίων με κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος καθώς και κάποιους καθοδικούς στόχους όπως για παράδειγμα γονίδια πρώιμης έκφρασης (216). Το ίδιο ισχύει και για τα core καψίδια, όπου έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζουν το μονοπάτι σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ (200). Για να μελετηθεί η λειτουργικότητα των φθοριζόντων core καψιδίων, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα. Συγκεκριμένα, κύτταρα ηπατικής προέλευσης επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο GFP-ERF, και στη συνέχεια επωάστηκαν με τα καψίδια 1736, 1740, ή τον αρνητικό μάρτυρα (1746). Χρησιμοποιήθηκε επίσης ως θετικός μάρτυρας ο αυξητικός παράγοντας EGF (Epidermal Growth Factor) και ως επιπλέον αρνητικός μάρτυρας, διαλυτή GFP πρωτεΐνη. Ο ERF αποτελεί έναν ευαίσθητο και συνεχή ανιχνευτή της ενεργότητας των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών, παρέχοντας έναν σύνδεσμο μεταξύ του μονοπατιού Ras/$ERK_{1/2}$ και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (187). Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για έναν μεταγραφικό καταστολέα, που είναι μέλος της οικογένειας Ets. Η φωσφορυλίωση του ERF εξαρτάται από τις $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες οι οποίες ελέγχουν την ενεργότητα του μέσω της ρύθμισης του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 52 : Απεικονιστική μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα (live-microscopy) των καψιδίων 1736 και 1740. Τα βέλη υποδεικνύουν τη διαδρομή φθοριζόντων καψιδίων (λεπτά:δευτερόλεπτα).

κυτταρικού εντοπισμού του. Κατά την διέγερση με μιτογόνα, ο ERF παράγοντας φωσφορυλιώνεται και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, μετά την απομάκρυνση του ορού, ο ERF αποφωσφορυλιώνεται γρήγορα και εισάγεται στον πυρήνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 51, η επώαση των κυττάρων αυτών, μετά από στέρηση ορού, με το κλάσμα που ήταν θετικό για το core, είχε ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του ERF από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ακριβώς όπως και με την επίδραση του θετικού μάρτυρα EGF. Αντιθέτως, μετά την επώαση των κυττάρων με τον αρνητικό μάρτυρα και τη διαλυτή GFP πρωτεΐνη, ο ERF παρέμεινε στον πυρήνα. Για να διερευνηθεί αν το φαινόμενο αυτό (δηλαδή η μετατόπιση του ERF) εξαρτάται από την ποσότητα του ερεθίσματος, η επώαση πραγματοποιήθηκε με διαφορετικές ποσότητες καψιδίων, από 0 έως 40ng. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ανασυνδυασμένα core σε σύζευξη με GFP πρωτεΐνη καψίδια 1736, 1740 και 1741, έχουν την ικανότητα να επάγουν το μονοπάτι σηματοδότησης που σχετίζεται με τις $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που τον κάνουν και τα καψίδια που δεν έχουν συζευχθεί με την πρωτεΐνη GFP. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το φαινόμενο αυτό είναι ανάλογο της ποσότητας που προστίθεται στα κύτταρα.

2.5. ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

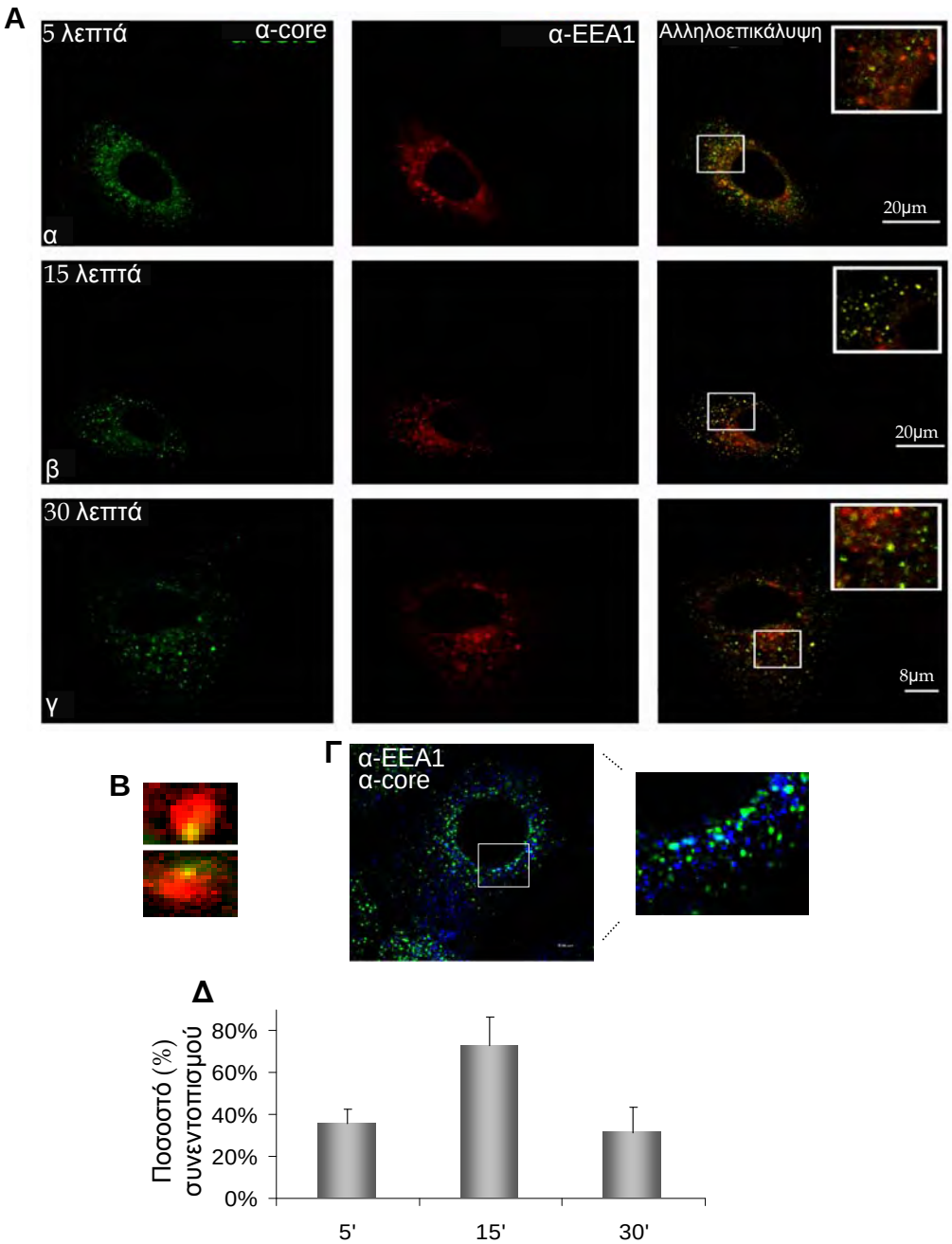
Τα ανασυνδυασμένα φθορίζοντα καψίδια μπορούν να αποδειχτούν ιδιαίτερα χρήσιμα για την οπτικοποίηση φαινομένων που σχετίζονται με την είσοδο τους αλλά και με φαινόμενα που ίσως να προκαλούν όπως η ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης. Αυτό άλλωστε παρουσιάζεται ιδιαίτερα επιτακτικό εξαιτίας της απουσίας αξιόπιστου συστήματος καλλιέργειας του ιού της ηπατίτιδας C. Για να επιβεβαιωθεί η χρησιμότητα των φθοριζόντων core καψιδίων αλλά και η είσοδος τους σε ζωντανά ηπατικά κύτταρα, εκτελέστηκαν πειράματα απεικονιστικής μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα (live-microscopy). Στην εικόνα 52 παρουσιάζονται φωτογραφίες σε διαφορετικούς χρόνους από την είσοδο καψιδίων 1736 και 1740 σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7. Προτιμήθηκαν αυτά τα δύο είδη καψιδίων λόγω του μεγαλύτερου αριθμού καψιδίων που περιέχουν. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι τα φθορίζοντα καψίδια προσδένονται στα κύτταρα και ξεκινούν μία πορεία προς την περι-πυρηνική περιοχή.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα ανασυνδυασμένα καψίδια 1736, 1740 και 1741 έχουν την ιδιότητα να προσδένονται, να εισέρχονται και να επηρεάζουν τις ίδιες κυτταρικές διεργασίες με τα core καψίδια. Επιπλέον αποτελούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον εργαλείο για την μελέτη του μηχανισμού εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα, αλλά και των μεταβολών που μπορούν να προκαλέσουν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 53 : Εντοπισμός των core καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα.

Α : Τα Huh7 κύτταρα επωάστηκαν για 5 (α),15 (β) και 30 (γ) λεπτά με τα core καψίδια, στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζονται σε μεγέθυνση οι επιλεγμένες περιοχές.

Β : Μεγέθυνση τμημάτων κυττάρων που έχουν υποστεί την ίδια κατεργασία όπως και στο (Α).

Γ : Τα κύτταρα επωάστηκαν με καψίδια για 15 λεπτά, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (μπλε) και EEA1 (πράσινο) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζεται η μεγέθυνση της επιλεγμένης περιοχής.

Δ : Μέτρηση του ποσοστού του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

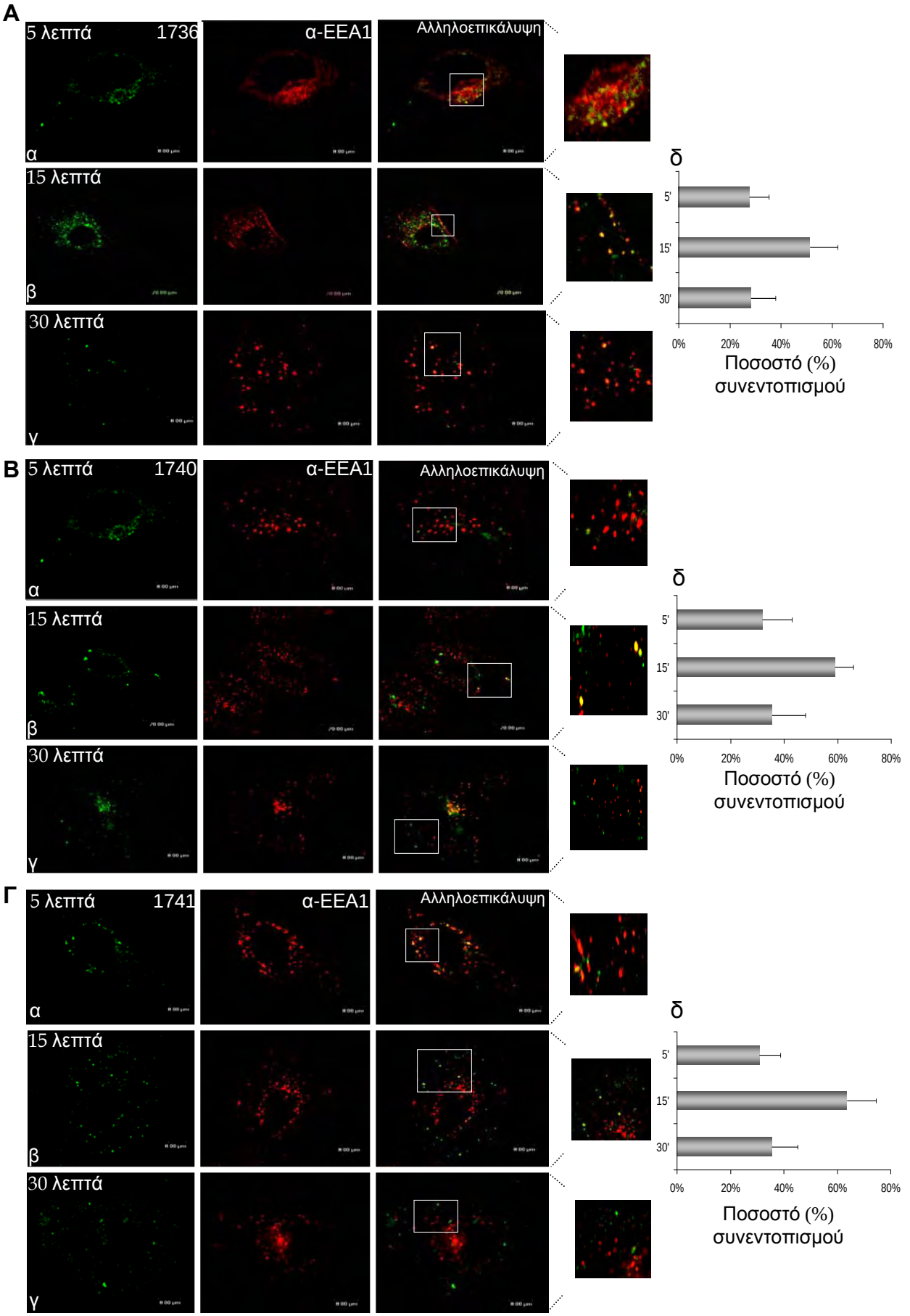
3.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ

3.1.1. ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Οι ιοί είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα. Χρειάζονται λοιπόν να εισέλθουν στα κύτταρα χωρίς να προκαλέσουν πολλές 'απώλειες' ή ξέσπασμα κυτταρικών αμυντικών αντιδράσεων ώστε να μπορέσουν να αναπαραχθούν χωρίς μεγάλες δυσκολίες. Ένας από τους μηχανισμούς που αρκετοί ιοί, μεταξύ των οποίων και οι ιοί της ηπατίτιδας Β και C (HBV, HCV), έχουν επιλέξει για το σκοπό αυτό είναι η ενδοκύτωση. Όπως έχει ήδη περιγραφεί στην εισαγωγή, υπάρχουν διάφορα είδη ενδοκύτωσης: ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης, μέσω καβεολίνης, χωρίς την συμμετοχή καμίας από τις δυο προαναφερθείσες πρωτεΐνες και τέλος η μακροπινοκύτωση. Κοινό τους χαρακτηριστικό αποτελεί το πέρασμα από το ίδιο οργανίδιο, το πρώιμο ενδόσωμα (early endosome), που είναι ένα κυστίδιο μεμβρανικής προελεύσεως. Πάνω στη μεμβράνη αυτή βρίσκονται χαρακτηριστικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τη σωστή του λειτουργία αλλά και για την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης. Παρόλα αυτά κάποιοι ιοί, μεταξύ των οποίων και ιοί χωρίς φάκελο (π.χ. ο ιός της πολιομυελίτιδας-poliovirus) προτιμούν να ανοίγουν μια μικρή οπή στην εξωτερική μεμβράνη του κύτταρου και να εισέρχονται με αυτό τον τρόπο (92,105-110,112).

Όπως αποδείχτηκε με τα πειράματα που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες, τα καψίδια χωρίς φάκελο του ιού της ηπατίτιδας C έχουν την ιδιότητα να προσδένονται και να εισέρχονται στα κύτταρα ηπατικής (και όχι μόνο) προέλευσης. Για να μελετηθεί αν τα συγκεκριμένα καψίδια εισέρχονται διαπερνώντας τη μεμβράνη ή μέσω ενδοκύτωσης, ελέγχθηκε ο εντοπισμός τους μέσα στο κύτταρο. Χρησιμοποιήθηκε ένα αντίσωμα ικανό να αναγνωρίσει μια πρωτεΐνη στην επιφάνεια των πρώιμων ενδοσωμάτων, την EEA1 (Early Endosome Antigen-1). Τα κύτταρα επωάστηκαν για 5, 15 ή 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C με τα καψίδια, μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας αντισώματα για τις πρωτεΐνες core (πράσινο χρώμα) και EEA1 (κόκκινο χρώμα). Όπως φαίνεται στην εικόνα 53, τα core καψίδια συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη EEA1 και επομένως και τα πρώιμα ενδοσώματα. Επιπλέον, σε μεγάλη μεγέθυνση είναι εμφανές πως τα καψίδια δεν βρίσκονται προσκολλημένα στην εξωτερική επιφάνεια των ενδοσωμάτων αλλά στο εσωτερικό τους (εικόνα 53-Β), υποδεικνύοντας ότι ενδοκυταρώνονται.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 54 : Εντοπισμός των φθοριζόντων καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα.

Τα καψίδια 1736 (Α), 1740 (Β) και 1741 (Γ), επωάστηκαν σε κύτταρα Huh7 για 5 (α), 15 (β) ή 30 (γ) λεπτά και ακολούθησε σήμανση με core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή. Στο (δ) παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.

Για να επιβεβαιωθεί ο συνεντοπισμός χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ανοσοσφαιρινών κουνελιού σημασμένα με Alexa Fluor που να εκπέμπουν σε απομακρυσμένα φάσματα. Συγκεκριμένα στο προηγούμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το Alexa-Fluor 488 (πράσινο) και Alexa-Fluor 546 (κόκκινο). Τα φάσματα αυτών τον Alexa-Fluor επικαλύπτονται. Στα συνεστιακά μικροσκόπια, όπως και σε αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, υπάρχουν ειδικές λειτουργίες στα λογισμικά τους ώστε να μειώνονται στο ελάχιστο οι πιθανότητες για ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιήθηκε και ένα επιπλέον ζευγάρι Alexa-Fluor (488-πράσινο και 647-μπλέ) το οποίο δεν παρουσιάζει καμία αλληλοεπικάλυψη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 53-Γ, αφού τα καψίδια επωάστηκαν για 15 λεπτά μαζί με τα Huh7 κύτταρα, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με core (μπλε) και EEA1 (πράσινο) αντίσωμα και ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Στις οπτικές τομές που μελετήθηκαν παρουσιάζεται συνεντοπισμός που στη συγκεκριμένη περίπτωση παρουσιάζεται με γαλάζιο χρώμα.

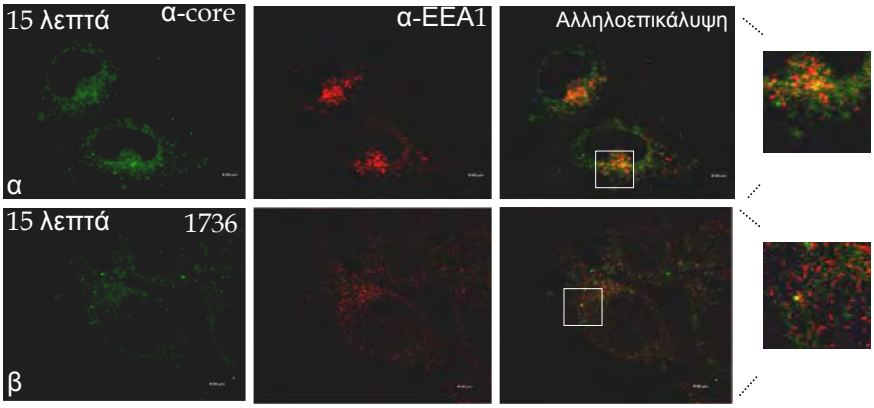
Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image-Pro Plus, πραγματοποιήθηκε ποσοτική μέτρηση του συνεντοπισμού και όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 53-Δ παρατηρείται μέγιστος συνεντοπισμός στα 15 λεπτά επώασης με τα ηπατικά κύτταρα, ενώ υπάρχει αισθητή μείωση στα 30 λεπτά επώασης.

Για να μελετηθεί αν τα ανασυνδυασμένα φθορίζοντα καψίδια που κατασκευάστηκαν, έχουν και αυτά την ιδιότητα να εισέρχονται σε ηπατικά κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης, εκτελέστηκαν ιδίου τύπου πειράματα με αυτά που περιγράφηκαν πιο πάνω. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα φθορίζοντα καψίδια και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός όπου σημάνθηκε η πρωτεΐνη EEA1 (κόκκινο). Οι οπτικές τομές παρουσιάζονται στην εικόνα 54.

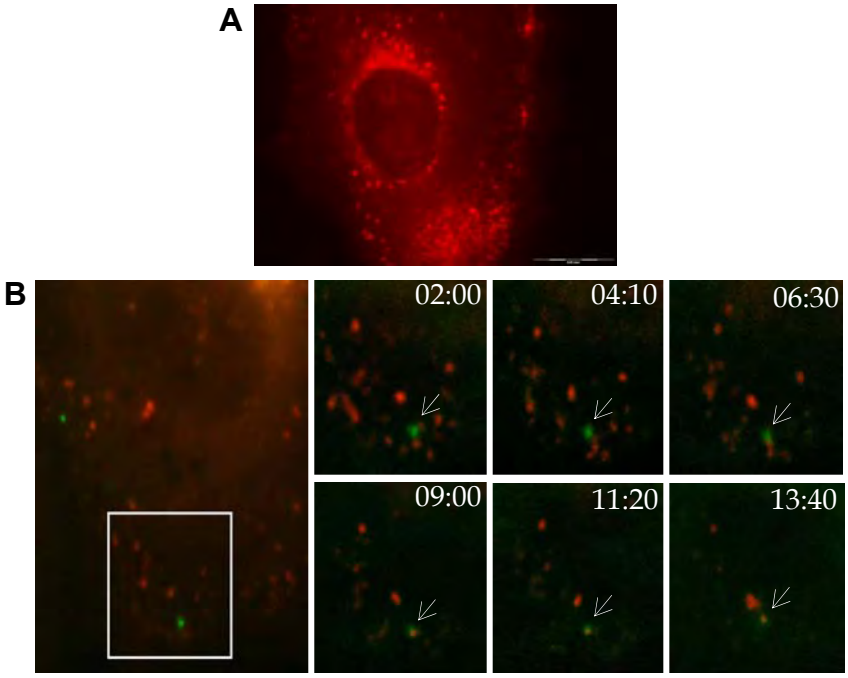
3.1.2. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως έχει αναφερθεί τόσο τα ανασυνδυασμένα core καψίδια όσο και τα core καψίδια σε σύζευξη με τη GFP πρωτεΐνη, έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης και εισόδου όχι μόνο σε ηπατικά κύτταρα αλλά και σε κύτταρα διαφορετικής προέλευσης όπως για παράδειγμα επιθηλιακά (HeLa). Για να μελετηθεί αν και σε αυτό το είδος κυττάρου τα καψίδια, με ή χωρίς GFP πρωτεΐνη, εισέρχονται με ενδοκύτωση ελέγχθηκε ο συνεντοπισμός τους με την πρωτεΐνη EEA1, οπως ακριβώς και προηγουμένως. Στην εικόνα 55 είναι εμφανής ο συνεντοπισμός υποδηλώνοντας ότι τα καψίδια μεταφέρονται στα ενδοσώματα και σε κύτταρα HeLa. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ενδοκύτωση ως μηχανισμό εισόδου και σε ένα διαφορετικό είδος κυττάρου. Υπάρχουν περιπτώσεις ιών που χρησιμοποιούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 55 : Εντοπισμός των καψιδίων core (α) και 1736 (β) στα πρώιμα ενδοσώματα σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa. Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή.



Εικόνα 56 : Εντοπισμός των καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα σε ζωντανά ηπατικά κύτταρα Huh7.

A : Παρουσιάζεται φωτογραφία τμήματος ζωντανού κυττάρου επιμολυσμένο με το πλασμίδιο RFP-Rab5.

B : Φωτογραφίες τμήματος κυττάρου, επιμολυσμένου με το πλασμίδιο RFP-Rab5, στο οποίο έχουν προστεθεί φθορίζοντα καψίδια 1740. Πάνω δεξιά παραθέτεται η χρονική ένδειξη κατά την οποία πάρθηκε η κάθε φωτογραφία (λεπτά:δευτερόλεπτα), ενώ το βέλος υποδεικνύει ένα καψίδιο.

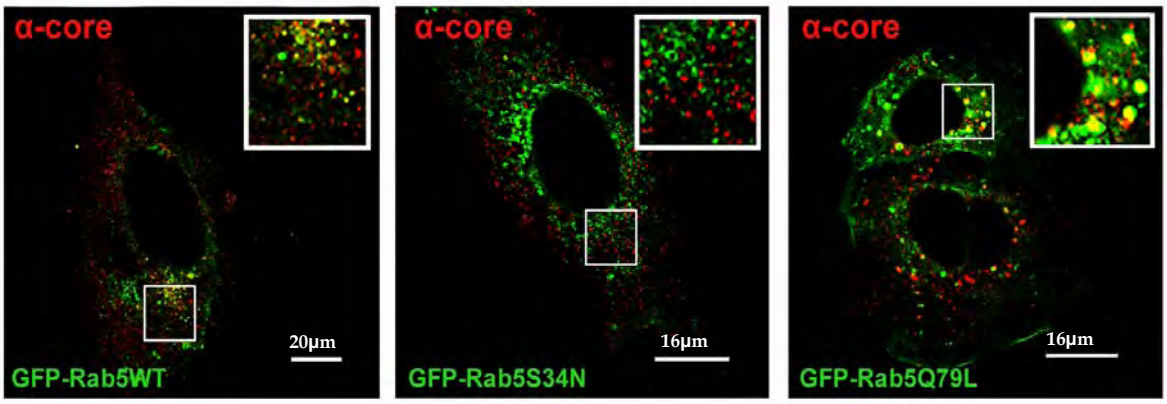
διαφορετική μέθοδο εισόδου ανάλογα με το είδος του κυττάρου ξενιστή. Για παράδειγμα, ο ιός 40 των πιθηκοειδών (SV40-Simian virus 40), εισέρχεται με ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης στα κύτταρα στόχους του, όμως έχει την ιδιότητα να εισέρχεται ακόμα και σε κύτταρα που δεν εκφράζουν καβεολίνη όπως τα Huh7, με ένα ακόμη αδιευκρίνιστο τρόπο (77). Μια άλλη περίπτωση είναι ο ιός του δάγγειου πυρετού(dengue virus) της οικογένειας των φλαβιιών (flavivirus), που χρησιμοποιεί διαφορετικές οδούς εισόδου ανάλογα με το κύτταρο-στόχο (217).

3.1.3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

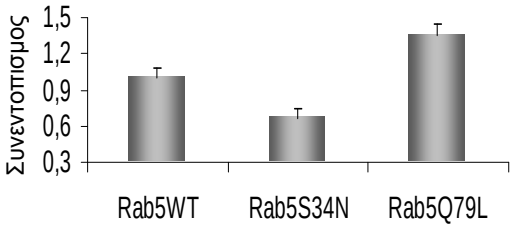
Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, τα φθορίζοντα core καψίδια έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται στα κύτταρα όπως ακριβώς και τα αντίστοιχα core καψίδια. Επομένως αποτελούν ένα ιδιαίτερο εργαλείο για την μελέτη της ενδοκύτωσης σε ζωντανά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο RFP-Rab5 (Red Fluorescence Protein-Ras analogue in brain). Η Rab5 είναι μια πρωτεΐνη της κατηγορίας των GTPασών, που βρίσκεται προσκολλημένη στην μεμβράνη των πρωίμων ενδοσωμάτων, και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την σωστή λειτουργία του (70,83,84). Όταν το πλασμίδιο RFP-Rab5 εκφράζεται, τα κύτταρα, παρουσιάζονται με μεγάλα κόκκινα κοκκία στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 55). Για να μελετηθεί η ενδοκύτωση χρησιμοποιήθηκε ένα μικροσκόπιο ικανό να φωτογραφίζει ζωντανά κύτταρα σε τακτά χρονικά διαστήματα (time-lapse Olumpus X181 Cell-R) παρουσία των φθοριζόντων καψιδίων 1740. Όπως φαίνεται στην εικόνα 55, παρατηρείται συνεντοπισμός ανάμεσα στο ‘κόκκινο’ πρώιμο ενδόσωμα και το ‘πράσινο’ καψίδιο περίπου μετά από 9 λεπτά επώασης και παραμένει τουλάχιστον έως τα 14 λεπτά. Η συγκεκριμένη μετάβαση των καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα συμπίπτει χρονικά με αντίστοιχους χρόνους άλλων ιών, είτε της οικογένειας των φλαβιιών (*flavivirus*) όπως για παράδειγμα τον ιό του δάγγειου (dengue virus) είτε γνωστών ιών χωρίς φάκελο, όπως ο ιός του αφθώδους πυρετού ή της ποδοστοματικής νόσου (Foot-and-Mouth Disease Virus-FMDV) και ο ιός Σεμλίκι (Semliki Forest Virus) (102,189,218).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

A



B



Εικόνα 57 : Εμπλοκή της Rab5 πρωτεΐνης στην ενδοκύτωση των core καψιδίων.

A : Κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια GFP-Rab5, GFP-Rab5S34N και GFP-Rab5Q79L, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (κόκκινο) αντίσωμα.

B : Μέτρηση του ποσοστού συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.

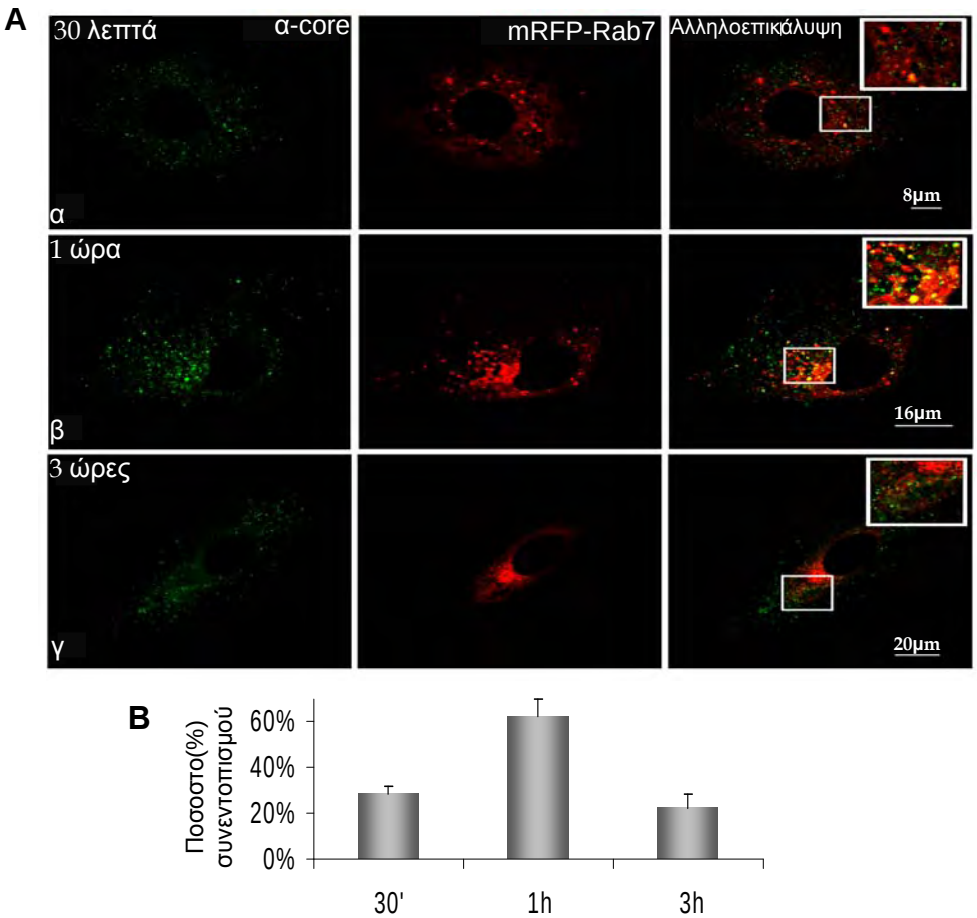
3.2. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ RAB5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Η Rab5 πρωτεΐνη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μια GTPάση που βρίσκεται στην επιφάνεια των πρώιμων ενδοσωμάτων και παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία για την σωστή τους λειτουργία. Μπορεί να βρίσκεται είτε σε ενεργή μορφή συνδεόμενη με GTP είτε σε ανενεργή όταν συνδέεται με GDP. Για να μελετηθεί η σημασία της στην ενδοκύτωση των HCV γυμνών core καψιδίων, χρησιμοποιήθηκαν δυο πλασμίδια συνδεδεμένα με τη φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη που περιέχουν μεταλλάξεις της Rab5 πρωτεΐνης. Το ένα πλασμίδιο ονομάζεται GFP-Rab5S34N και περιέχει μια μετάλλαξη που προσδίδει στην Rab5 πρωτεΐνη την ιδιότητα να παραμένει ενωμένη με GDP, ενώ το δεύτερο πλασμίδιο ονομάζεται GFP-Rab5Q79L και έχει μετάλλαξη που αναγκάζει το GTP να προσδένεται με την πρωτεΐνη, έτσι ώστε να την καθιστά συνεχώς ενεργή. Όπως φαίνεται στην εικόνα 57, η έκφραση του GFP-Rab5S34N παρουσιάζεται πιο διάχυτη μέσα στο κύτταρο, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, ενώ αυτή του GFP-Rab5Q79L, δημιουργεί μεγαλύτερα από το αναμενόμενο πρώιμα ενδοσώματα με περι-πυρηνικό εντοπισμό. Παρά τις μικρές διαφορές κυρίως στον κυτταρικό εντοπισμό των ενδοσωμάτων, αυτά παραμένουν λειτουργικά (219). Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα καψίδια για 15 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός όπου τα καψίδια χρωματίστηκαν κόκκινα. Με το λογισμικό Image-Pro Plus μετρήθηκε το ποσοστό συνεντοπισμού σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων και παρουσιάζεται με τη μορφή γραφικής παράστασης. Η είσοδος των καψιδίων σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7, φαίνεται να επηρεάζεται από την κατάσταση της πρωτεΐνης Rab5. Όταν είναι σε ενεργή κατάσταση, δηλαδή ενωμένη με GTP (GFP-Rab5Q9L) περισσότερα καψίδια εισέρχονται στα κύτταρα, ενώ στην ανενεργή της μορφή (GFP-Rab5S34N) εισέρχονται πολύ λιγότερα (εικόνα 57). Η συγκεκριμένη ιδιότητα έχει παρατηρηθεί και κατά την διάρκεια της ενδοκύτωσης άλλων ιών όπως ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV) και ο αδενοϊός (92,220).

3.3. ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ

Μετά την είσοδο στα πρώιμα ενδοσώματα τα καψίδια, όπως και κάθε άλλη ουσία-σωματίδιο που ενδοκυταρώνεται, έχει τρεις επιλογές: Να επιστρέψει στην επιφάνεια μέσω 'ενδοσωμάτων ανακύκλωσης' (recycling endosomes), να μεταβεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή να περάσει στα λυσοσώματα, για να αποδιαταχθεί (65). Αυτή η τελευταία περίπτωση δοκιμάστηκε καταρχήν ως πιθανότερη επιλογή εξαιτίας του περι-πυρηνικού εντοπισμού που παρατηρήθηκε στις φωτογραφίες οπτικών τομών κυττάρων με καψίδια,

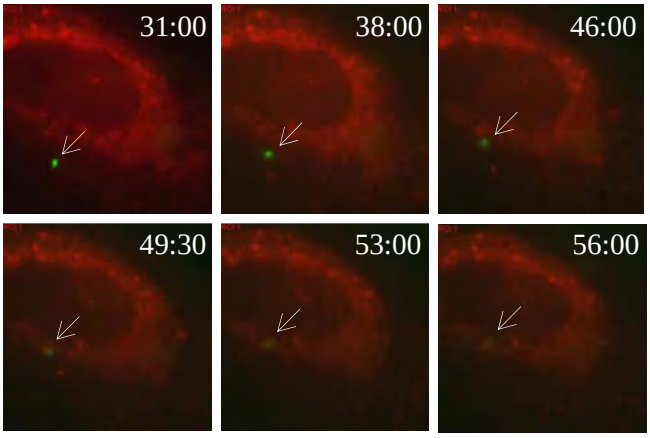
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 58 : Εντοπισμός των ενδοσωμάτων στα όψιμα ενδοσώματα.

A : Huh7 κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο RFP-Rab7 (κόκκινο), επωάστηκαν με core καψίδια για 30 λεπτά (α), 1 ώρα (β) ή 3 ώρες (γ), μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core αντίσωμα (πράσινο). Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή.

B : Μέτρηση του ποσοστού του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.



Εικόνα 59 : Εντοπισμός των ενδοσωμάτων στα όψιμα ενδοσώματα σε ζωντανά Huh7 κύτταρα.

Παρουσιάζονται φωτογραφίες τμήματος κυττάρου επιμολυσμένου με το πλασμίδιο RFP-Rab7, στο οποίο έχουν προστεθεί φθορίζοντα καψίδια 1740. Πάνω δεξιά παραθέτεται η χρονική ένδειξη κατά την οποία πάρθηκε η κάθε φωτογραφία (λεπτά:δευτερόλεπτα), ενώ το βέλος υποδεικνύει ένα καψίδιο.

φθορίζοντα ή μη, του συνεστιακού μικροσκοπίου. Επιπλέον, τα γυμνά καψίδια ενός άλλου κοντινού ιού, του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), είναι γνωστό πως κατευθύνονται στα λυσοσώματα μετά το πέρασμα τους από τα πρώιμα ενδοσώματα (92).

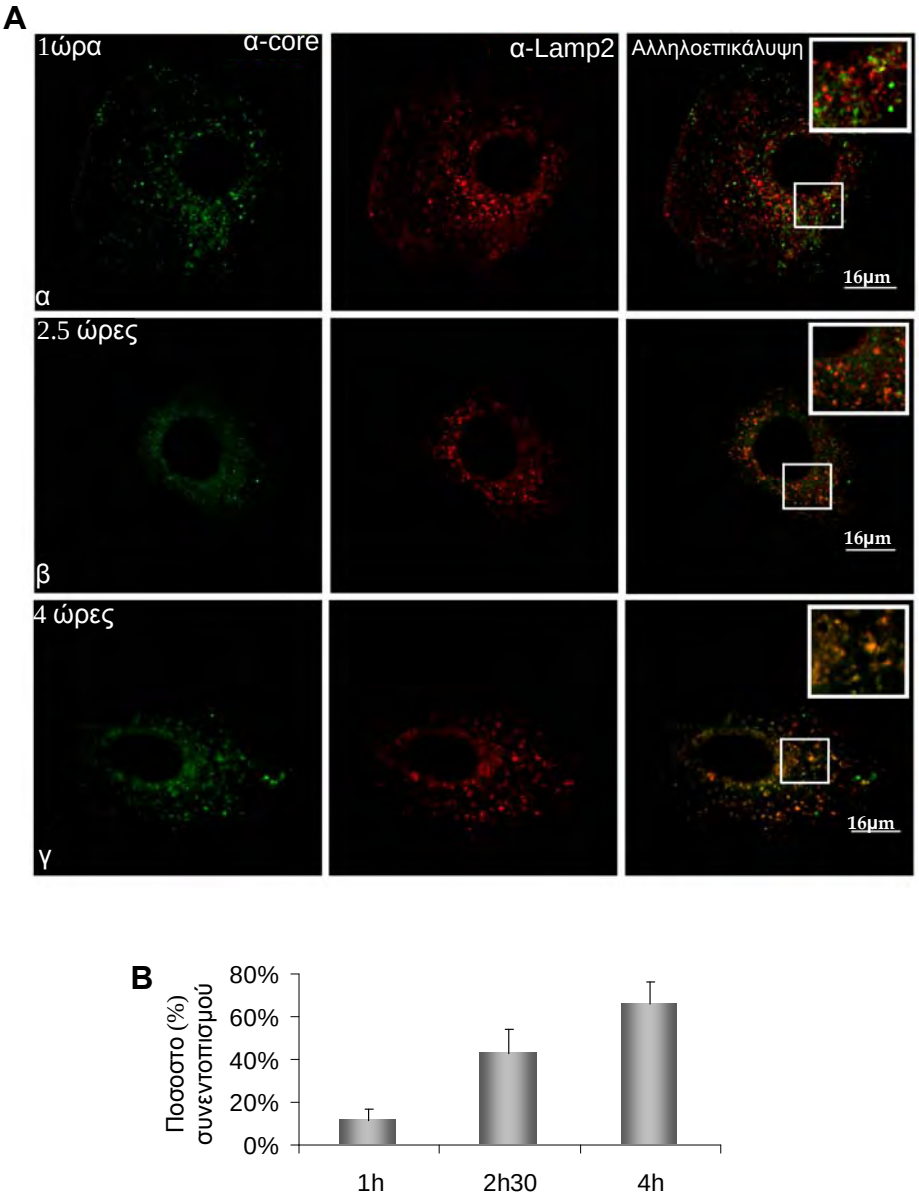
3.3.1. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΟΨΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ

Για να μελετηθεί αυτή η περίπτωση ελέγχθηκε αρχικά ο συνεντοπισμός των core καψιδίων με μια πρωτεΐνη που υπάρχει στα όψιμα ενδοσώματα, την Rab7. Τα όψιμα ενδοσώματα αποτελούν όπως και τα πρώιμα ενδοσώματα, μεμβρανικά κυστίδια με δική τους λειτουργία και δικές τους χαρακτηριστικές πρωτεΐνες (94-97). Η Rab7 είναι μια GTPάση, όπως και η Rab5, και έχει και αυτή μια ενεργή και μία ανενεργή μορφή. Στη συγκεκριμένη περίπτωση (εικόνα 58), κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο RFP-Rab7, 24 ώρες μετά επωάστηκαν με core καψίδια για 30 λεπτά, 1 ώρα ή 3ώρες και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός όπου τα καψίδια σημάνθηκαν με core αντίσωμα (πράσινος χρωματισμός). Τα καψίδια παρουσιάζουν συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη Rab7, γεγονός που σημαίνει ότι μετά τα πρώιμα ενδοσώματα μετατοπίζονται/'ωριμάζουν' στα όψιμα ενδοσώματα. Επιπλέον, μετά από μέτρηση του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus, αποδεικνύεται πως 62.5% των καψιδίων παρουσιάζουν συνεντοπισμό με την Rab7 πρωτεΐνη, 1 ώρα μετά την προσθήκη τους στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, υποδηλώνοντας τη μετάβαση τους από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα.

3.3.2. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Για να επιβεβαιωθεί η μετακίνηση των core καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα όψιμα σε όσο γίνεται πιο ρεαλιστικές (*in vivo*) συνθήκες, επιλέχτηκε η τεχνική της απεικονιστικής μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα (live-microscopy). Κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επιμολύνθηκαν με το πλάσμίδιο RFP-Rab7, όπως ακριβώς και προηγουμένως. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το ειδικό μικροσκόπιο (time-lapse Olumpus X181 Cell-R). Τα κύτταρα επωάστηκαν με τα φθορίζοντα καψίδια και ταυτόχρονα φωτογραφήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στην εικόνα 59 παρουσιάζεται ο συνεντοπισμός της Rab7 πρωτεΐνης με τα καψίδια 1740 μετά από 53 λεπτά επώασης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 60 : Εντοπισμός των core καψιδίων στα λυσοσώματα.

A : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με core καψίδια για 1 (α), 2.5 (β) ή 4 (γ) ώρες μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (πράσινο) και Lamp2 (κόκκινο) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή.

B : Ποσοτική μέτρηση του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.

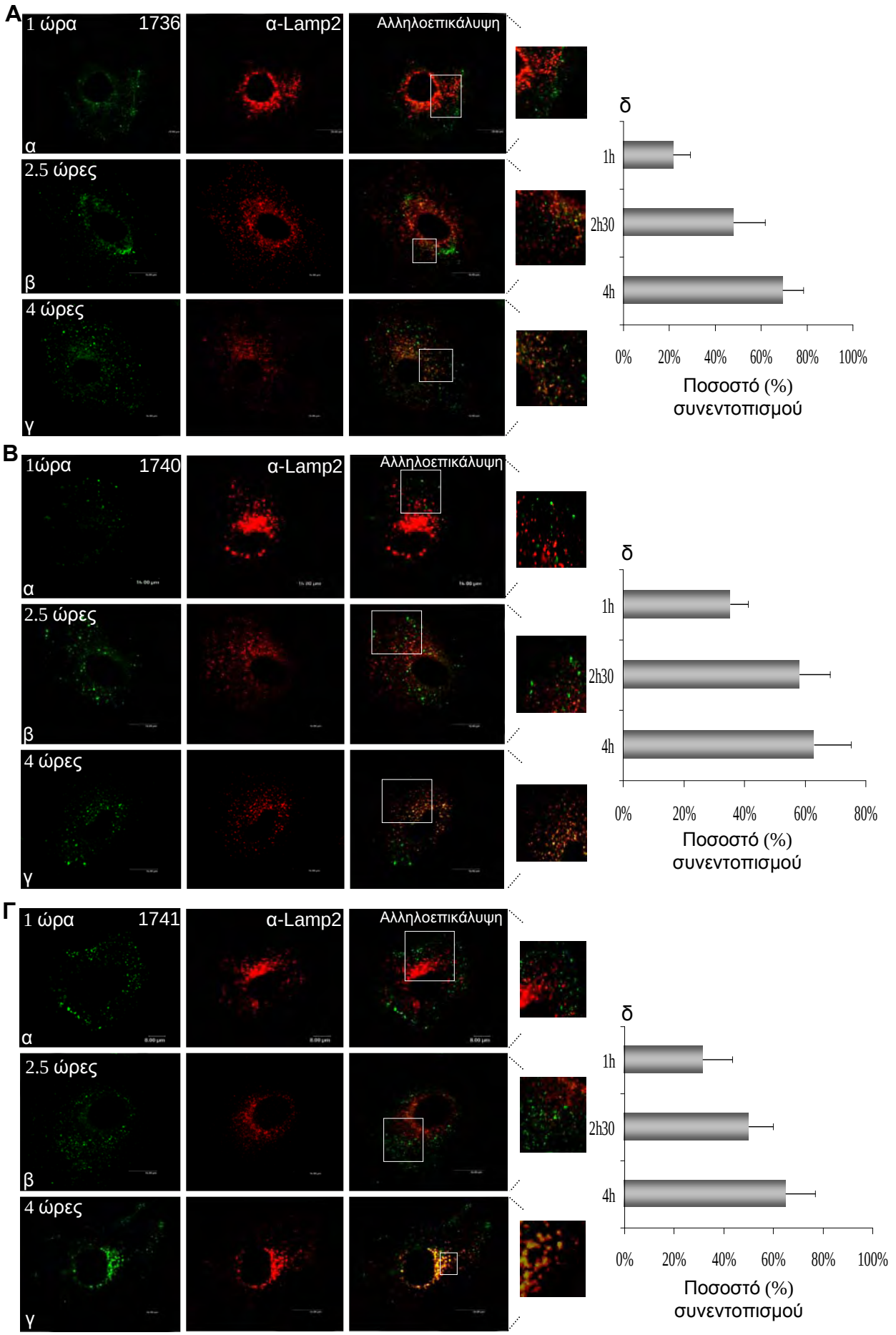
3.3.3. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ

Φυσιολογική πορεία μετά τα όψιμα ενδοσώματα είναι η μετατόπιση της ενδοκυταρωμένης ουσίας-σωματίδιο στα λυσοσώματα. Πρόκειται για ενδοκυτταρικά μεμβρανο-συνδεόμενα οργανίδια που περιέχουν πολλά υδρολυτικά ένζυμα, ενεργά κατά κύριο λόγο στο πολύ όξινο pH (4.5) το οποίο δημιουργούν. Θεωρούνται ως τελικό σημείο αποικοδόμησης, και οτιδήποτε μεταφέρεται σε αυτά τα διαμερίσματα καταλήγει αποδιαταγμένο ή/και τεμαχισμένο. Από πολλούς χαρακτηρίζονται ως απλοί 'σάκοι απορριμμάτων' του κυττάρου. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη άποψη τελευταία αμφισβητείται και τείνει να αλλάξει, λόγω της καλύτερης κατανόησης της μεταφοράς του υλικού που ενδοκυταρώνεται καθώς πιστοποιήθηκε η ύπαρξη λυσοσώματων που εκκρίνουν το περιεχόμενο τους μετά από σύντηξη με τη μεμβράνη (94,95,97,101).

Για να ελεγχθεί αν τα core καψίδια μεταφέρονται στα συγκεκριμένα οργανίδια αλλά και για να επιβεβαιωθεί έμμεσα το προηγούμενο αποτέλεσμα του εντοπισμού τους στα όψιμα ενδοσώματα, μελετήθηκε ο συνεντοπισμός με την πρωτεΐνη Lamp-2 (Lysosome Associated Membrane Protein 2). Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στην μεμβράνη των λυσοσωμάτων και εμπλέκεται στην διατήρηση της οξύτητας τους και την προστασία της μεμβράνης τους από το πολύ όξινο περιβάλλον. Κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επωάστηκαν για 1, 2.5 και 4 ώρες με core καψίδια. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός, χρησιμοποιώντας core (πράσινο) και Lamp2 (κόκκινο) αντισώματα. Στην εικόνα 60 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπου παρατηρείται αυξανόμενος συνεντοπισμός με το πέρασμα του χρόνου. Για την ακρίβεια μετά από 4 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C, 66% των καψιδίων εντοπίζονται στα λυσοσώματα.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τα core καψίδια, αλλά και της σωστής λειτουργίας των φθοριζόντων καψιδίων, μελετήθηκε ακριβώς όπως περιγράφτηκε και πιο πάνω ο εντοπισμός αυτών των καψιδίων και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 61 είναι αντίστοιχα με αυτά των καψιδίων που δεν είναι συζευγμένα με την πρωτεΐνη GFP.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

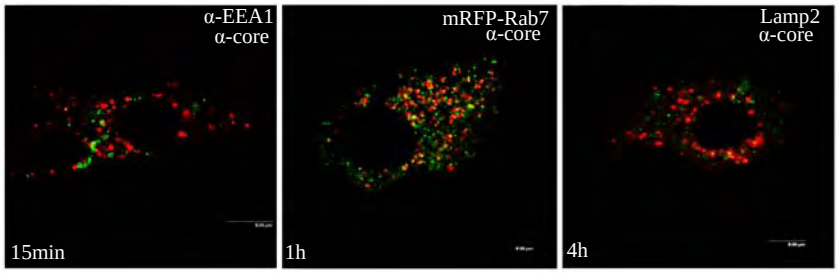


Εικόνα 61 : Εντοπισμός των φθοριζόντων καψιδίων στα λυσοσώματα.

Τα καψίδια 1736 (Α), 1740 (Β) και 1741 (Γ), επωάστηκαν σε κύτταρα Huh7 για 1 (α), 2.5 (β) ή 4 (γ) ώρες και ακολούθησε σήμανση με core (πράσινο) και Lamp2 (κόκκινο) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή. Στο (δ) παρουσιάζεται ποσοτικοποίηση του συνεντοπισμού με το λογισμικό Image-Pro Plus.

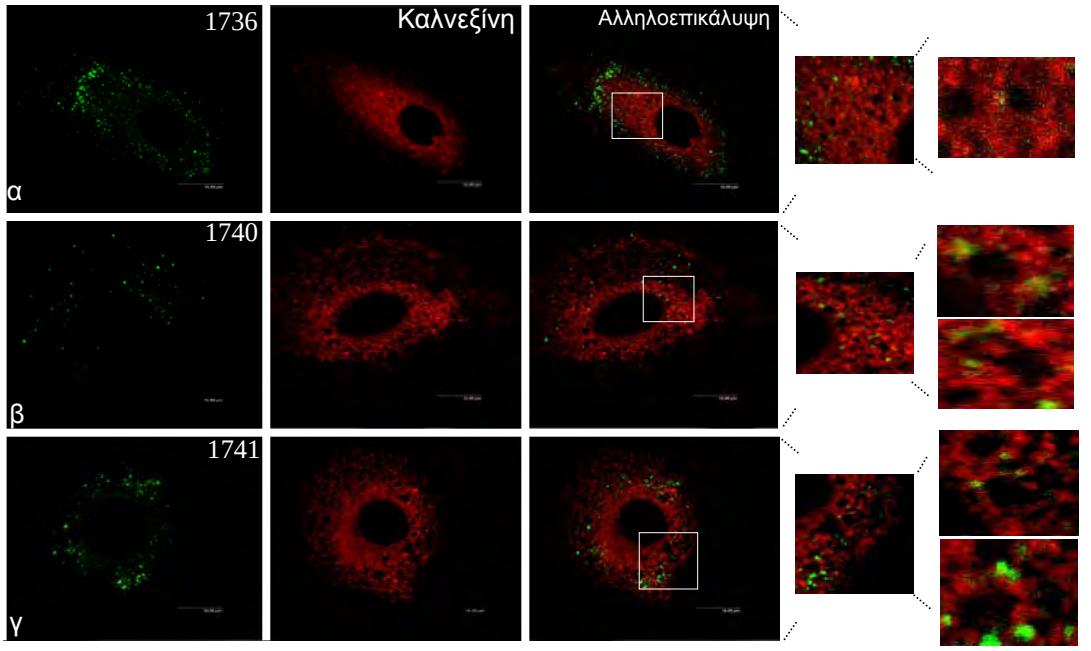
3.3.4. ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗΣ ΣΕ HEPG2 ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Αρκετά από τα πειράματα που ακολουθήσουν έγιναν σε μια άλλη κυτταρική σειρά ηπατικής προέλευσης (HepG2), κυρίως επειδή περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών και επομένως διευκολύνεται η μελέτη διαφορών έκφρασης και μετα-μεταγραφικών αλλαγών των πρωτεϊνών. Αντιθέτως το σχήμα των συγκεκριμένων κυττάρων καθώς και η τάση που έχουν να δημιουργούν συστάδες κάνει την μελέτη τους σε πειράματα ανοσοφθορισμού ιδιαίτερα δύσκολη. Παρόλα αυτά, πριν χρησιμοποιηθούν, μελετήθηκε η πορεία της ενδοκύτωσης των core καψίδιων στα συγκεκριμένα κύτταρα, καθώς και ο συσχετισμός τους με το χρόνο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 62 και είναι ανάλογα με αυτά των ηπατικών κυττάρων Huh7. Τα core καψίδια συνεντοπίζονται με τις πρωτεΐνες EEA1 (πρώιμα ενδοσώματα), Rab7 (όψιμα ενδοσώματα) και Lamp-2 (λυσοσώματα) μετά από 15 λεπτά, 1 ή 4 ώρες επώασης αντίστοιχα.



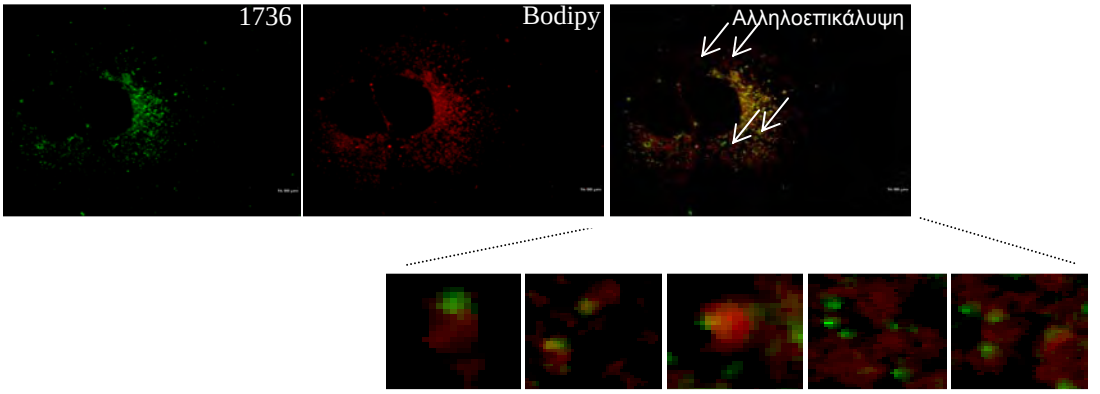
Εικόνα 62 : Συνεντοπισμός core καψιδίων (πράσινο) με την EEA1 πρωτεΐνη (15 λεπτά), Rab7 πρωτεΐνη (1 ώρα) και Lamp2 πρωτεΐνη (4 ώρες) (κόκκινο).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 63 : Πιθανός εντοπισμός των καψιδίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 1.5 ώρες με τα καψίδια 1736 (α), 1740 (β) και 1741 (γ), και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη καλνεξίνη (calnexin) (κόκκινο). Δεξιά παρουσιάζονται σε μεγέθυνση οι επιλεγμένες περιοχές.



Εικόνα 64 : Πιθανός εντοπισμός των καψιδίων στα λιποσταγονίδια.

Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 30 λεπτά με τα καψίδια 1736 και ακολούθησε χρωματισμός με την ουσία Bodipy, που αντιδρά με διάφορες ομάδες λιπιδίων στα κύτταρα. Κάτω παρουσιάζονται οι επιλεγμένες περιοχές.

3.4. ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΣΤΟ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ

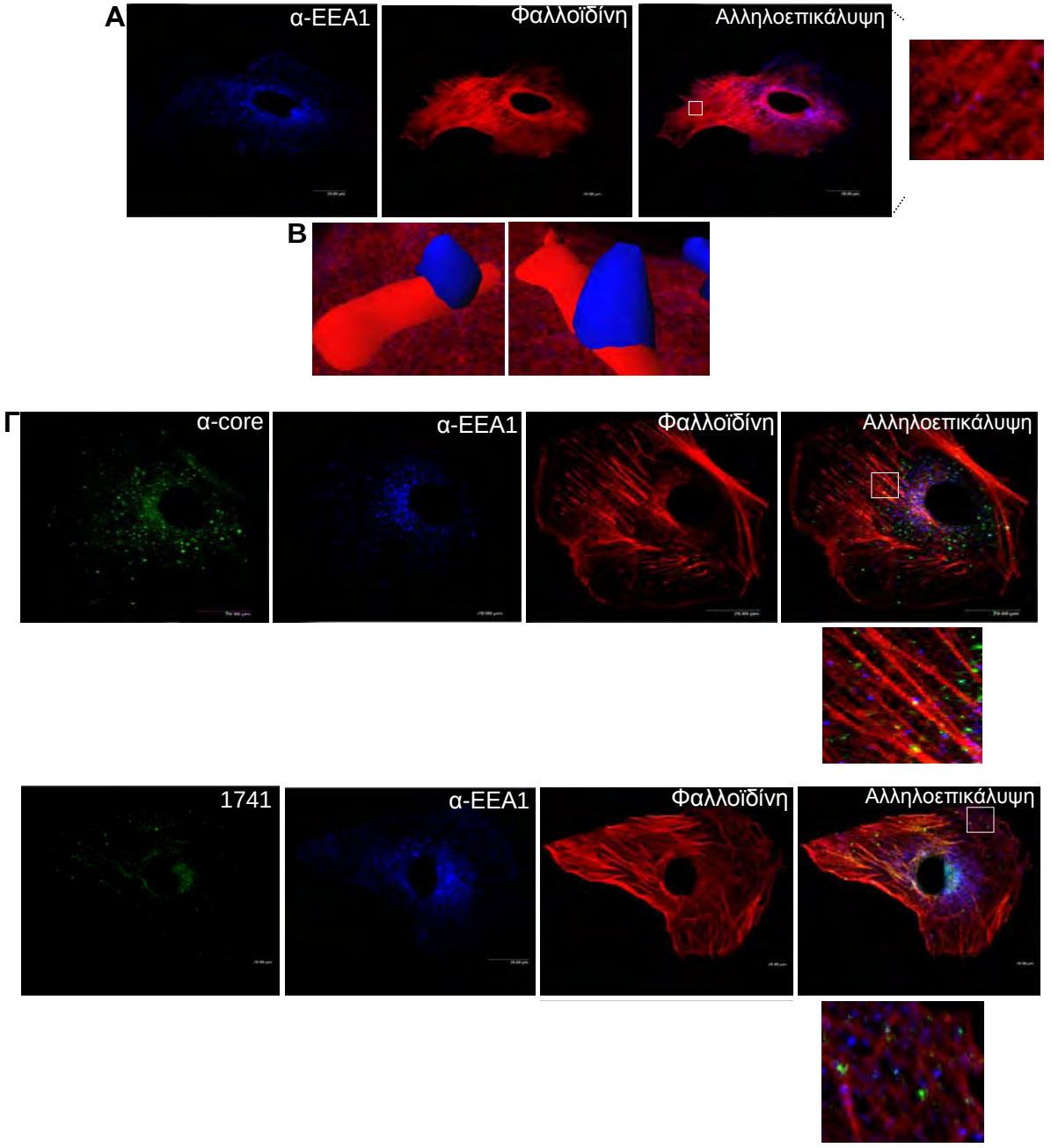
Όπως έχουμε ήδη αναφέρει τα καψίδια μετά την είσοδο τους στα πρώιμα ενδοσώματα έχουν διάφορες επιλογές. Μια από αυτές είναι και η μεταφορά τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Για τη μελέτη της συγκεκριμένης πιθανότητας, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα ανοσοφθορισμού αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη καλνεξίνη (calnexin). Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που βρίσκεται κυρίως στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και ο ρόλος της είναι να φροντίζει ώστε οι νεοσυντειθέμενες γλυκοπρωτεΐνες να έχουν τη σωστή δομή πριν απελευθερωθούν προς χρήση στο κύτταρο. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν για πρακτικούς λόγους τα φθορίζοντα καψίδια 1736, 1740 και 1741, τα οποία επωάστηκαν στους 37°C για 1.5 ώρα με κύτταρα ηπατική προέλευσης Huh7 και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης καλνεξίνης (calnexin). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 63. Σε κάποια σημεία τα καψίδια εντοπίζονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Θα πρέπει να τονιστεί πως η μεγάλη μεγέθυνση στα δεξιά της εικόνας προκαλεί την μείωση της ευκρίνειας της.

Τα αποτελέσματα αυτά, ίσως να υποδεικνύουν ότι τα καψίδια έρχονται σε επαφή με το ενδοπλασματικό δίκτυο, πράγμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον δεδομένου ότι το σημείο όπου γίνεται ο πολλαπλασιασμός του ιού της ηπατίτιδας C είναι το συγκεκριμένο οργανίδιο (6). Επιπλέον, είναι αποδεδειγμένο ότι η core πρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδρά με RNA και ίσως και να το εσωκλείει (221-223). Είναι λοιπόν ιδιαίτερα δελεαστικό να υποθέσει κανείς πως τα καψίδια χωρίς φάκελο θα μπορούσαν να μεταφέρουν το RNA του ιού (ολόκληρο ή ελλιπές) στο ενδοπλασματικό δίκτυο για τον πολλαπλασιασμό του. Παρόλα αυτά πρέπει να τονιστεί πως τα αποτελέσματα αυτά παραμένουν προκαταρτικά και χρειάζονται ακόμα επαναλήψεις αλλά και διαφορετικές προσεγγίσεις για να επιβεβαιωθούν, όπως για παράδειγμα την χρήση core καψιδίων προερχόμενα από ασθενείς.

3.5. ΠΙΘΑΝΗ ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΣΤΑΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ένα επιπλέον αποτέλεσμα που χρήζει περαιτέρω μελέτης για την αποσαφήνιση του, είναι αυτό της εμπλοκής των λιποσταγονιδίων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 64, τα ανασυνδυασμένα καψίδια μετά από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία 37°C με κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7, σημάνθηκαν με core (πράσινο) αντίσωμα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η χρωστική ουσία Bodipy, που αποτελεί μία χρωστική με την ιδιότητα να αντιδρά με διάφορες ομάδες λιπιδίων του κυττάρου. Όπως είναι φανερό τα καψίδια βρίσκονται σε μικρή απόσταση, ενδεχομένως και ακριβώς πάνω σε λιποσταγονίδια. Το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 65 : Μετακίνηση των καψιδίων με την βοήθεια των μικροϊνιδίων ακτίνης.

Α : Huh7 κύτταρα, μονιμοποιημένα και σημασμένα με EEA1 αντίσωμα (μπλε) και φαλλοϊδίνη (κόκκινο).

Β : Τρισδιάστατη σχηματική απεικόνιση ενός ενδοσώματος πάνω σε μικροϊνίδιο ακτίνης. Η επεξεργασία έγινε σε οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου με το λογισμικό Imaris 5.7.2.

Γ : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν για 15 λεπτά με core ή 1741 καψίδια, μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με EEA1 αντίσωμα (μπλε), φαλλοϊδίνη (κόκκινο), και όπου χρειαζόταν, core αντίσωμα (πράσινο).

συγκεκριμένο φαινόμενο δεν είναι ιδιαίτερα περίεργο αρχικά γιατί η core πρωτεΐνη έχει την ιδιότητα να αντιδρά με αυτά (35-37,224), και έπειτα γιατί αποδείχτηκε πρόσφατα ότι τα ενδοσώματα αλληλεπιδρούν με τα λιποσταγονίδια του κυττάρου, με τρόπο που ρυθμίζεται από τις Rab GTPάσες (225). Παρόλα αυτά, πρόκειται για προκαταρτικά αποτελέσματα και χρειάζονται πολλά ακόμη πειράματα και εναλλακτικές προσεγγίσεις για να μπορέσει να κατανοηθεί ο ρόλος τους στην είσοδο των core καψιδίων στα κύτταρα.

3.6. ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ

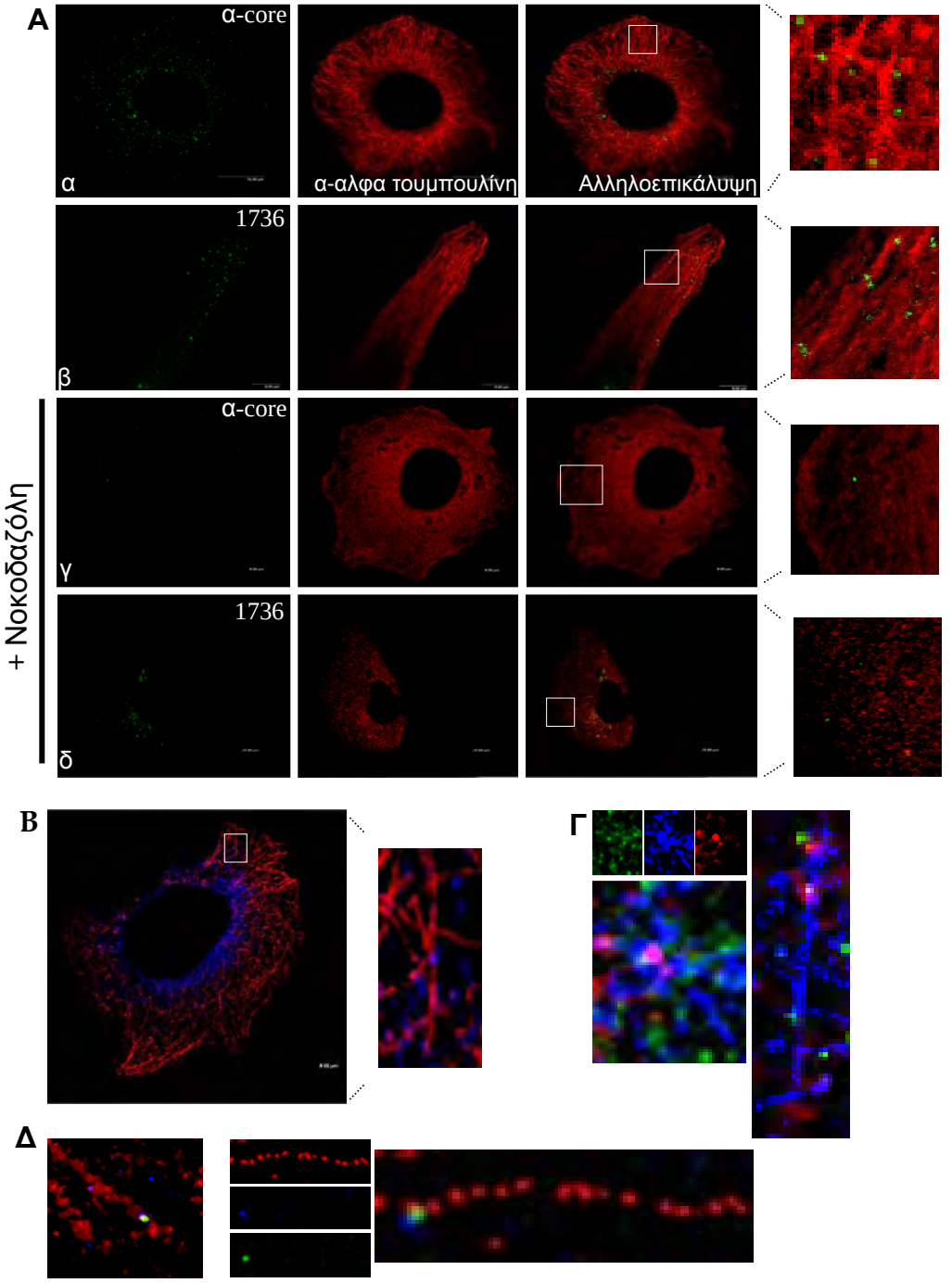
3.6.1. ΜΙΚΡΟΪΝΙΔΙΑ ΑΚΤΙΝΗΣ

Έχει ήδη αποδειχτεί σε προηγούμενες ενότητες της παρούσας εργασίας (εικόνα 49) ότι τα καψίδια όταν εισέρχονται στα κύτταρα βρίσκονται δίπλα, ή ενδεχομένως πάνω, στα μικροϊνίδια ακτίνης. Πρόκειται για στοιχεία του κυτταρικού σκελετού που αποτελούν την πολυμερισμένη μορφή (F μορφή) σφαιρικών μορίων ακτίνης (G μορφή). Έχουν διάμετρο 50-90 Å και είναι ιδιαίτερα σημαντικά στα πρώιμα στάδια της ενδοκύτωσης (108). Πιθανότητα τα καψίδια να βρίσκονται δίπλα ή πάνω στα μικροϊνίδια ακτίνης εξαιτίας του εντοπισμού τους στα ενδοσώματα, και έτσι θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η μελέτη του φαινόμενου. Αρχικά ελέγχθηκε αν το σύστημα μελέτης με ανοσοφθορισμό είναι το κατάλληλο για την συγκεκριμένη επιστημονική ερώτηση. Όπως αναμενόταν τα ενδοσώματα εντοπίζονται πολύ κοντά ή ακόμα και πάνω στα μικροϊνίδια ακτίνης (εικόνα 65-Α). Στη συνέχεια κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με καψίδια (core και 1741) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με EEA1 (μπλε) αντίσωμα και όπου ήταν αναγκαίο με core (πράσινο) αντίσωμα. Έπειτα ακολούθησε χρώση με φαλλοϊδίνη (Alexa 546-phalloidin) και τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Παρατηρήθηκε τριπλός συνεντοπισμός που παρουσιάζεται με το χαρακτηριστικό λευκό χρώμα (εικόνα 65-Γ). Αυτό υποδηλώνει πως τα καψίδια μετακινούνται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσα στα ενδοσώματα με τη βοήθεια της ακτίνης.

3.6.2. ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΙΣΚΟΙ

Ένα άλλο στοιχείο του κυτταρικού σκελετού που ενδέχεται να χρησιμοποιείται με έμμεσο η άμεσο τρόπο από τα καψίδια, είναι οι μικροσωληνίσκοι, δηλαδή μικρές σωληνοειδείς κυτταροπλασματικές δομές με διάμετρο 250 Å. Βιοχημικές αναλύσεις έχουν δείξει πως αποτελούνται από διμερή μόρια τουμπουλίνης (tubulin) α και β, με διάμετρο περίπου 4nm για την κάθε υπομονάδα, καθώς και κάποιες επιπλέον πρωτεΐνες, για

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 66 : Μετακίνηση των καψιδίων μέσα στα ενδοσώματα με την βοήθεια των μικροσωληνίσκων.

Α : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με core (α, γ) ή 1736 (β, δ) καψίδια για 30 λεπτά, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με αντίσωμα αλφα-τουμπουλίνης (κόκκινο) και όπου ήταν αναγκαίο core αντίσωμα (πράσινο).

Β : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με core καψίδια για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με EEA1 (μπλε) και αλφα-τουμπουλίνη (κόκκινο) αντισώματα.

Γ : Huh7 κύτταρα επιμολυσμένα με το πλασμίδιο RFP-Rab5, επωάστηκαν για 15 λεπτά με core καψίδια, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (πράσινο) και αλφα-τουμπουλίνη (μπλε) αντισώματα. Παρουσιάζονται τμήματα από δύο διαφορετικά κύτταρα.

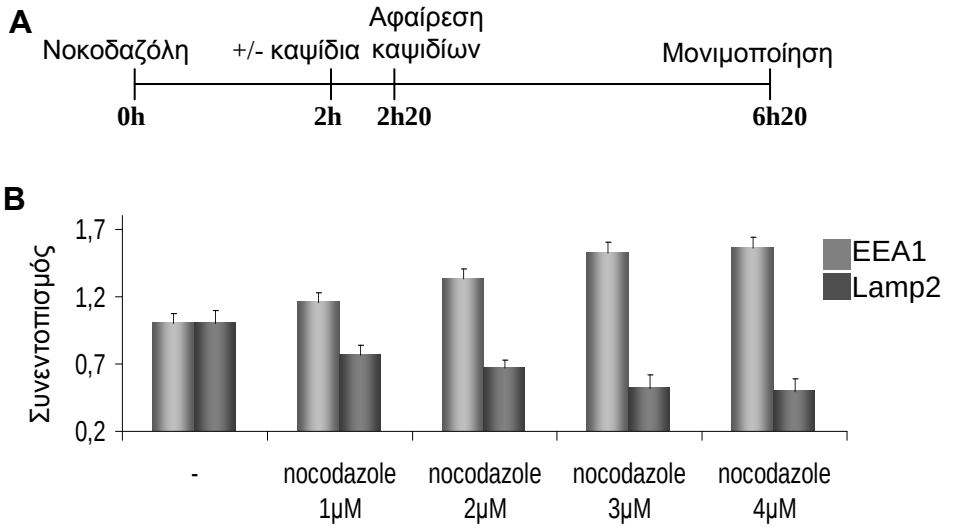
Δ : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν για 15 λεπτά με 1736 καψίδια, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με EEA1 (μπλε) και αλφα-τουμπουλίνη (κόκκινο) αντισώματα. Παρουσιάζονται τμήματα δύο διαφορετικών κυττάρων.

παράδειγμα τη γ-τουμπουλίνη που σχετίζεται με τα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων. Η τουμπουλίνη υπάρχει άφθονη στο κύτταρο, ειδικά στα ηπατικά κύτταρα όπου έχει βρεθεί πως η διαθέσιμη πρωτεΐνη θα μπορούσε να σχηματίσει μικροσωληνίσκο 1,9 cm. Για να μελετηθεί αν διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην είσοδο των καψιδίων στο κύτταρο, αρχικά ελέγχθηκε ο εντοπισμός τους σε σχέση με τους μικροσωληνίσκους. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C με τα core καψίδια αλλά και τα φθορίζοντα καψίδια 1736, και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με α-τουμπουλίνη (κόκκινο) ή/και core (πράσινο) αντισώματα. Στην εικόνα 66 αποδεικνύεται πως τα καψίδια εντοπίζονται πολύ κοντά σε αυτές τις δομές.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε νοκοδαζόλη (nocodazole), μία ουσία που αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη με αποτέλεσμα να της προκαλεί δομικές αλλαγές και επομένως να παρεμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων (226). Τα κύτταρα επωάστηκαν με τον χημικό αναστολέα (3.3μM) για 2 ώρες και στην συνέχεια εκτελέστηκε το πείραμα όπως ακριβώς και προηγουμένως. Τα καψίδια φαίνεται να προσδένονται ή/και να εισέρχονται στα κύτταρα σε ελαφρώς μικρότερο ποσοστό. Το κυριότερο όμως είναι πως φαίνεται να παραμένουν στην περιφέρεια του κυττάρου και να μην κινούνται προς τον πυρήνα όπως θα αναμενόταν.

Έχει προταθεί πως η core ενδεχομένως να αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους στα πρώτα στάδια της μόλυνσης (227). Είναι επίσης γνωστό ότι οι μικροσωληνίσκοι χρησιμοποιούνται από τα ενδοσώματα για την μετακίνηση τους (108-109). Για να μελετηθεί η πιθανή έμμεση ή άμεση αλληλεπίδραση των καψιδίων με τους μικροσωληνίσκους, αποφασίστηκε να ελεγχθεί ο συνεντοπισμός τους με τα ενδοσώματα και την α-τουμπουλίνη ταυτόχρονα. Αρχικά, όπως ακριβώς έγινε και με τα μικροϊνίδια της ακτίνης, επιβεβαιώθηκε πως τα ενδοσώματα βρίσκονται πάνω στους μικροσωληνίσκους (εικόνα 66-Β). Έπειτα, μελετήθηκε αν τα καψίδια μετακινούνται μέσα στα ενδοσώματα και πάνω στους μικροσωληνίσκους. Για το λόγο αυτό κύτταρα επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο RFP-Rab5 και μετά από 24 ώρες επωάστηκαν με core καψίδια για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός και σήμανση με core (πράσινο), και α-τουμπουλίνης (μπλε) αντισώματα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 66-Γ, παρατηρείται το λευκό χρώμα, χαρακτηριστικό του τριπλού συνεντοπισμού. Για να επιβεβαιωθεί το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με καψίδια 1736 για 15 λεπτά, και στον ανοσοφθορισμό που ακολούθησε σημάνθηκε με κόκκινο χρώμα η α-τουμπουλίνη και με μπλε τα ενδοσώματα (EEA1). Αποδείχτηκε όπως ακριβώς και προηγουμένως η ύπαρξη λευκών κοκκίων, επομένως και τριπλού συνεντοπισμού. Αυτό υποδηλώνει πως τα καψίδια

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 67 : Αναγκαιότητα ακέραιων μικροσωληνίσκων στην μετακίνηση των core καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.

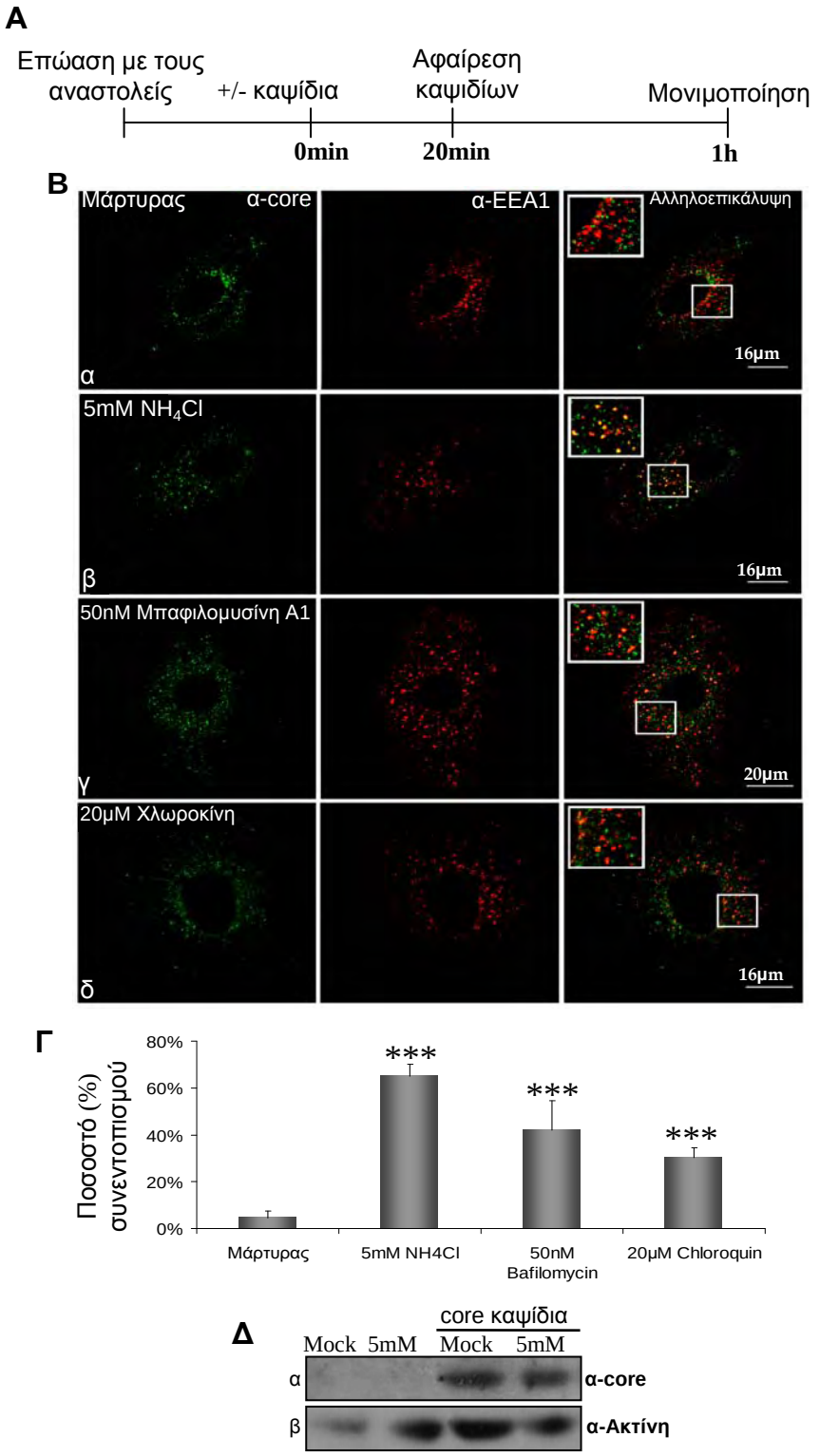
A : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

B : Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με καψίδια όπως περιγράφεται στο (A), και ακολούθησε ανοσοφθορισμός με core (πράσινο) και EEA1 ή Lamp2 (κόκκινο) αντισώματα. Τουλάχιστον 45 φωτογραφίες από 3 ανεξάρτητα πειράματα και μετρήθηκαν με το λογισμικό Image-Pro Plus, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με την μορφή γραφικής παράστασης.

και τα ενδοσώματα, όπως είναι αναμενόμενο, χρησιμοποιούν τους μικροσωληνίσκους για την μεταφορά τους.

Ουσιαστικά τα ενδοσώματα χρησιμοποιούν τους μικροσωληνίσκους για να μεταφέρονται στο οργανίδιο που 'επιθυμούν'. Για να προσδιοριστεί η ειδικότητα αυτού του μηχανισμού, μελετήθηκε η μεταφορά των καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα. Κύτταρα Huh7, επωάστηκαν με αυξάνουσες ποσότητες νοκοδαζόλης, και στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. 20 λεπτά αργότερα, τα καψίδια αφαιρέθηκαν και προστέθηκε νέο υλικό με (ή χωρίς για τον μάρτυρα) τον χημικό αναστολέα. Η επώαση συνεχίστηκε για 4 επιπλέον ώρες, ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων, σήμανση με EEA1 ή Lamp2 αντισώματα και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Εκτελέστηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και μετρήθηκε ο συνεντοπισμός με το λογισμικό Image-Pro Plus, περίπου δεκαπέντε φωτογραφιών από κάθε πείραμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή γραφικής παράστασης στην εικόνα 67. Όπως παρατηρείται, αυξανόμενης της συγκέντρωσης της νοκοδαζόλης, αυξάνεται και ο συνεντοπισμός τον core καψιδίων με την EEA1 πρωτεΐνη και επομένως με τα πρώιμα ενδοσώματα. Ταυτόχρονα, μειώνεται ο συνεντοπισμός τους με την πρωτεΐνη Lamp2, δηλαδή με τα λυσοσώματα. Αυτό συμβαδίζει με προηγούμενα αποτελέσματα όπου η χρήση νοκοδαζόλης ανάγκαζε τα καψίδια να μένουν στην περιφέρεια του κυττάρου (εικόνα 66). Συνεπώς, τα καψίδια μέσω των μικροσωληνίσκων μετακινούνται από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 68 : Ενδοκύτωση pH-εξαρτώμενη.

Α : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

Β : Τα κύτταρα επωάστηκαν με core καψίδια όπως στο (Α). Χρησιμοποιήθηκαν οι χημικοί αναστολείς χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) (α), χλωροκίνη (β) και μπαφιλομυσίνη Α1 (γ). Δεξιά εμφανίζεται η μεγέθυνση της επιλεγμένης περιοχής.

Γ : Ποσοτική μέτρηση του συνεντοπισμού με Image-Pro Plus (***:$P<0.001$)

Δ : Ανοσοαποτύπωση τύπου Western με χρήση αντισωμάτων core (α) και ακτίνης (β) σε εκχυλίσματα κυττάρων, παρουσία ή όχι χλωριούχου αμμωνίου και core καψιδίων.

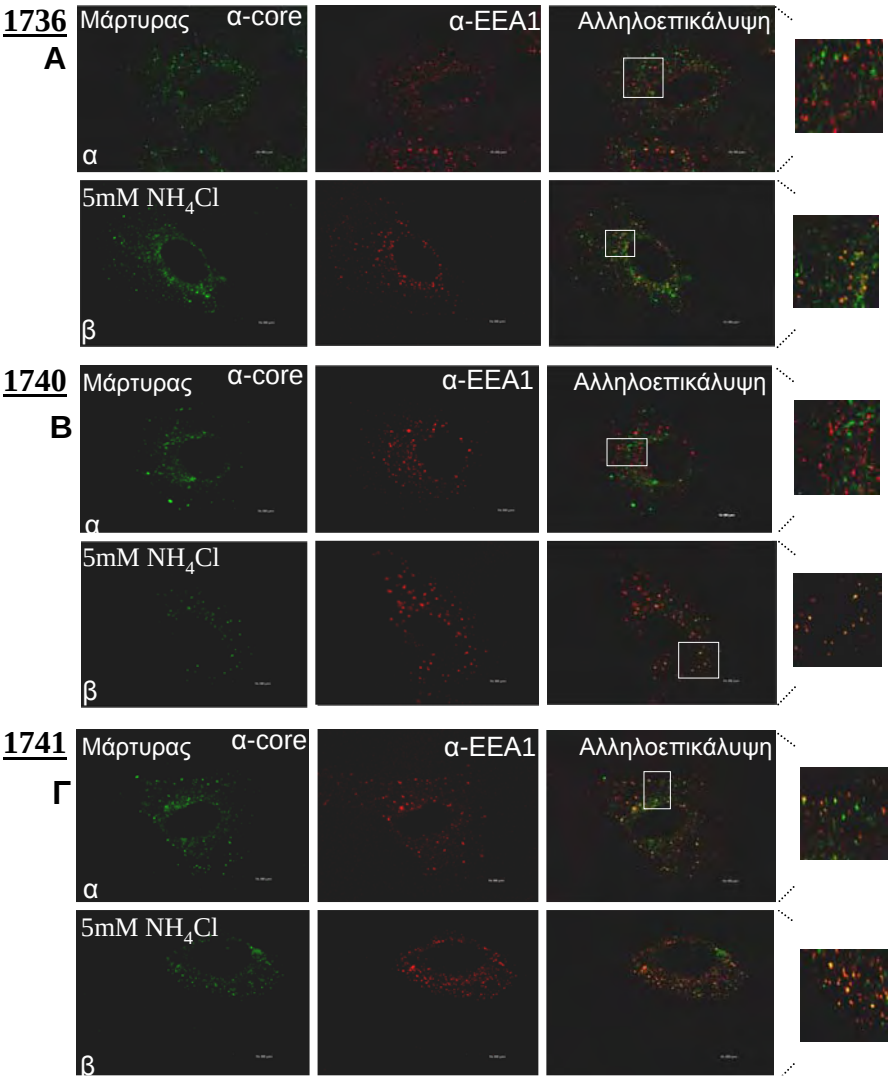
3.7. pH-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ

Μια από τις ιδιότητες των ενδοσωμάτων είναι η αλλαγή του pH στο εσωτερικό τους χάρη στις αντλίες H^+ V-τύπου που περιέχουν στη μεμβράνη τους. Υπάρχουν ιοί των οποίων η μόλυνση δεν επηρεάζεται καθόλου από αυτή την ιδιότητα. Κάποιοι άλλοι όμως, κυρίως ιοί με φάκελο χρησιμοποιούν την αλλαγή στο pH ώστε να επιτευχθεί σύντηξη του φακέλου τους με την ενδοσωμική μεμβράνη και να ελευθερωθεί το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα (pH-εξαρτώμενη διείσδυση) (102-110,228). Αυτό συμβαίνει και σε ιούς που το καψίδιο τους δεν περιβάλλεται από φάκελο, ενώ συνήθως το χαμηλό pH προκαλεί είτε αλλαγές στη δομή του καψιδίου είτε την αποσύνδεση από τον ειδικό τους υποδοχέα (92,112,229-231).

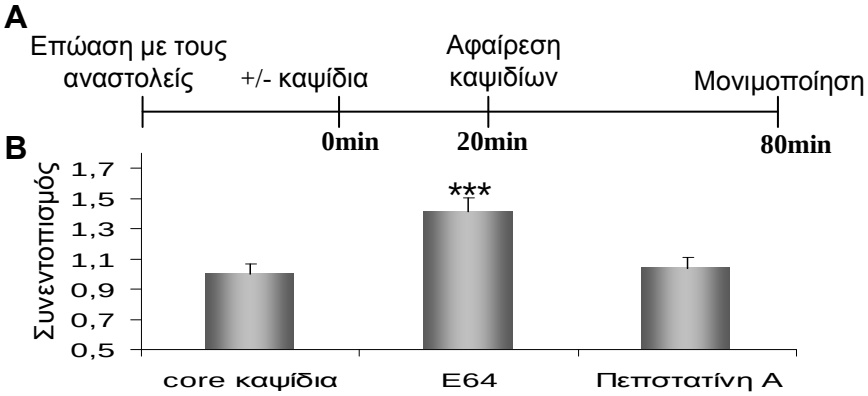
Για να μελετηθεί η επίδραση των αλλαγών του pH των πρώιμων ενδοσωμάτων στην είσοδο των καψιδίων χρησιμοποιήθηκαν τρεις ειδικοί χημικοί αναστολείς το χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), η χλωροκίνη (chloroquin) και η μπαφιλομυσίνη A1 (Bafilomycin A1), οι οποίες έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν την μείωση του pH στο εσωτερικό των ενδοσωμάτων (232,233). Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με τον κάθε αναστολέα για το κατάλληλο χρονικό διάστημα (15 λεπτά για το χλωριούχο αμμώνιο και 30 λεπτά για τη χλωροκίνη και τη μπαφιλομυσίνη A1). Στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια στο θρεπτικό υλικό και 20 λεπτά αργότερα αφαιρέθηκαν για να προστεθεί νέο υλικό με ή χωρίς χημικούς αναστολείς. Μετά από 40 επιπλέον λεπτά επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε ανσοφθορισμός. Τα καψίδια σημάνθηκαν με core αντίσωμα (πράσινο) ενώ τα ενδοσώματα με EEA1 αντίσωμα (κόκκινο) και ελέγχθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Εκτελέστηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και περισσότερες από 50 φωτογραφίες μετρήθηκαν στο λογισμικό Image-Pro Plus. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση που περιλάμβανε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA) και ανάλυση t ελέγχου δειγμάτων με υποτιθέμενες άνισες διακυμάνσεις (*Student t test)*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 68, και είναι στατιστικά σημαντικά ($P < 0,001$).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενα πειράματα τα καψίδια μεταφέρονται στα πρώιμα ενδοσώματα μετά από 15 λεπτά επώασης με τα κύτταρα, και στη συνέχεια προωθούνται στα όψιμα ενδοσώματα μετά από μία ώρα επώασης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο μάρτυρας που δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία με τους χημικούς αναστολείς περιλαμβάνει καψίδια που έχουν περάσει από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα λόγω της προχωρημένης ώρας επώασης. Αντιθέτως η χρήση των χημικών αναστολέων προκαλεί την αύξηση του συνεντοπισμού των core καψιδίων με τα ενδοσώματα, υποδηλώνοντας ότι δεν μπόρεσαν να μετακινηθούν στα όψιμα ενδοσώματα εξαιτίας της αύξησης του pH στο εσωτερικό τους. Οι χημικοί αναστολείς δοκιμάστηκαν σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 69 : Ενδοκύτωση pH-εξαρτώμενη για τα φθορίζοντα καψίδια 1736 (A), 1740 (B) και 1741 (Γ). Το πείραμα εκτελέστηκε ακριβώς όπως στην εικόνα 68. Δεξιά παρουσιάζεται σε μεγέθυνση η επιλεγμένη περιοχή.



Εικόνα 70 : Εμπλοκή των καθεψινών (cathepsins) B και L στην ενδοκύτωση των core καψιδίων.

A : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

B : Κύτταρα Huh7 επεξεργάστηκαν όπως στο (A), και φωτογραφίες οπτικών τομών από τρία ανεξάρτητα πειράματα μετρήθηκαν για τον συνεντοπισμό core καψιδίων/ενδοσωμάτων με το λογισμικό Image-Pro Plus. Ακολούθησε στατιστική μελέτη (***:P‹0.001).

διάφορες συγκεντρώσεις ώστε να μην προκαλούν τοξικότητα στα κύτταρα και το φαινόμενο της αύξησης του συνεντοπισμού των καψιδίων με τα ενδοσώματα φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση του χημικού αναστολέα (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Οι διαφορές που παρουσιάζονται στα ποσοστά συνεντοπισμού ανάμεσα στους χημικούς αναστολείς οφείλονται πιθανότατα στη διαφορετική αποτελεσματικότητα ή στο διαφορετικό τρόπο λειτουργίας τους.

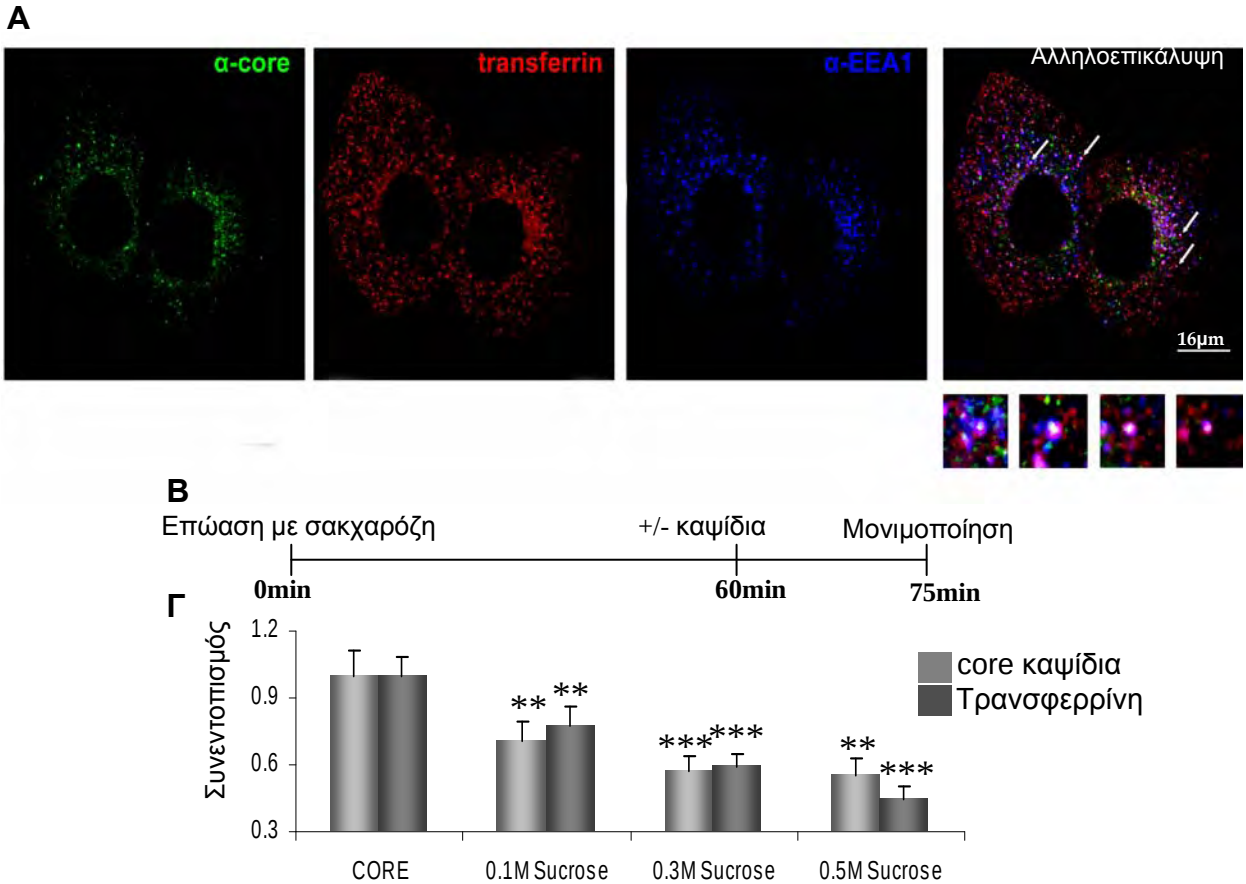
Για να αποδειχτεί ότι η είσοδος των καψιδίων δεν επηρεάζεται από τους χημικούς αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν εκτελέστηκε ανασοαποτύπωση τύπου Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα που είχαν προηγουμένως επωαστεί με τους χημικούς αναστολείς. Ενδεικτικά παρουσιάζονται στην εικόνα 68-Δ τα αποτελέσματα με την χρήση του χημικού αναστολέα χλωριούχου αμμωνίου, όπου παρατηρείται πως η είσοδος των καψιδίων δεν επηρεάζεται καθόλου από το συγκεκριμένο αναστολέα.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αλλά και για να μελετηθεί για ακόμη μία φορά η λειτουργικότητα των ανασυνδυασμένων φθοριζόντων καψιδίων, έγιναν αντίστοιχα πειράματα χρησιμοποιώντας τον αποτελεσματικότερο χημικό αναστολέα, δηλαδή το χλωριούχο αμμώνιο, και όπως φαίνεται στην εικόνα 69, τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα.

3.8. ΕΠΙΡΡΟΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΚΑΘΕΨΙΝΕΣ B ΚΑΙ L

Οι καθεψίνες (cathepsins) αποτελούν υδρολάσες που υπάρχουν στα ενδοσώματα και ενεργοποιούνται από το χαμηλό pH. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αλλά στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι καθεψίνες τύπου κυστεΐνη και ασπαρτική. Οι πρώτες απενεργοποιούνται παρουσία του χημικού αναστολέα E64 ενώ οι δεύτερες παρουσία της πεπστατίνης A (peptastin A). Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με τους χημικούς αναστολείς E64 (50μM) και πεπστατίνη A (pepstatin A–50μM) για 2.5 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Μετά από 20 λεπτά, αλλάχτηκε το υλικό και αντικαταστάθηκε με καινούριο που περιείχε (ή όχι) τους αναστολείς. Ακολούθησε περαιτέρω επώαση για 1 ώρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Εκτελέστηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα και ελέγχθηκαν 15 με 20 φωτογραφίες οπτικών τομών από το καθένα, για το συνεντοπισμό καψιδίων και ενδοσωμάτων με το λογισμικό Image-Pro Plus. Ακολούθησε στατιστική μελέτη όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 70. Η χρήση του χημικού αναστολέα καθεψινών B και L, E64, εμποδίζει τη μεταφορά των καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα όψιμα, ενώ ο χημικός αναστολέας ασπαρτικών πρωτεασών πεπστατίνη A, δεν προκαλεί καμία αλλαγή στη μεταφορά τους. Ο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 71 : Ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης.

Α : Huh7 κύτταρα επωάστηκαν με core καψίδια και τρανσφερρίνη (κόκκινο) για 15 λεπτά στους 37°C, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (μπλε) αντισώματα. Δεξιά παρουσιάζονται σε μεγέθυνση οι επιλεγμένες περιοχές.

Β : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

Γ : Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν όπως στο (Β). Ακολούθησε μέτρηση του συνεντοπισμού φωτογραφιών οπτικών τομών 3 ανεξάρτητων πειραμάτων με το λογισμικό Image-Pro Plus, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή γραφικής παράστασης (**:P‹0,01, ***:P‹0.001).

αναστολέας E64 αλληλεπιδρά με τις δύο συγκεκριμένες καθεψίνες, εμποδίζοντας την ενεργοποίηση τους από το χαμηλό pH (90). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμβαδίζει με προηγούμενο αποτέλεσμα που επιτεύχθηκε με τη χρήση της χλωροκίνης (chloroquin) (εικόνα 68) μιας ουσίας που εκτός από αναστολέας της αύξησης του pH στα ενδοσώματα είναι και αναστολέας των καθεψινών B και L (90).

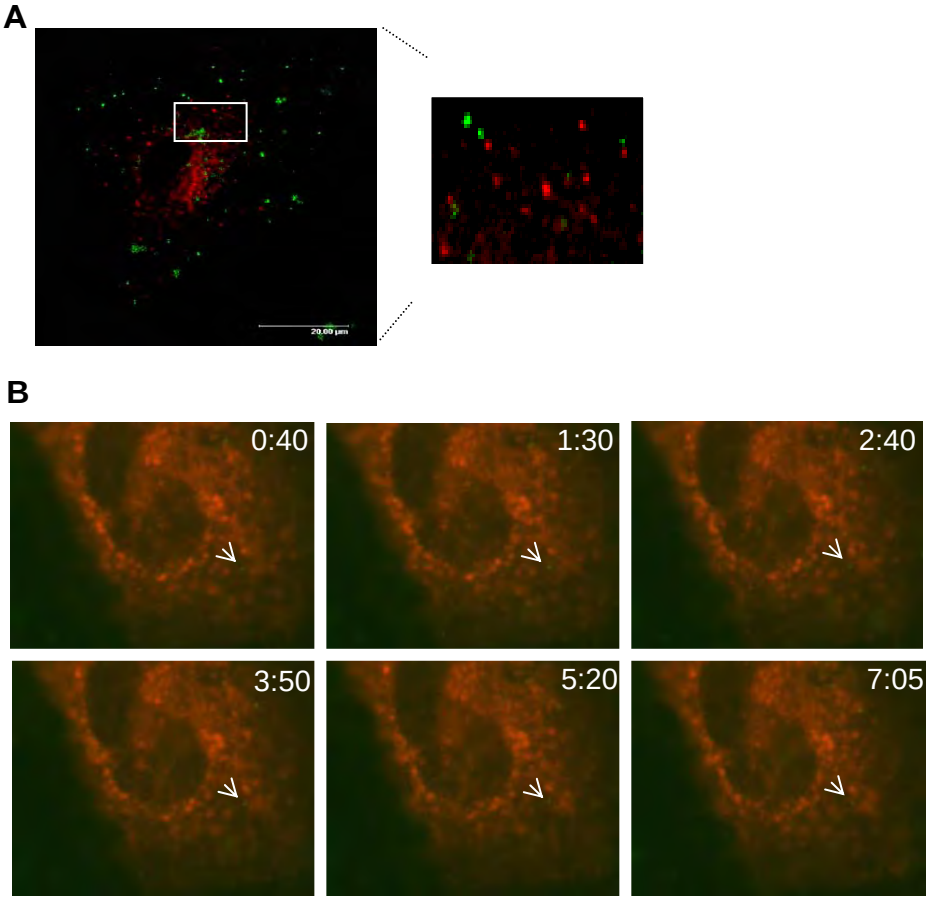
3.9. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΗΝ ΚΛΑΘΡΙΝΗ

Όπως προαναφέρθηκε, η είσοδος των core καψιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων γίνεται με κάποιο μηχανισμό που επιτρέπει την αλλαγή του pH. Η πιο γνωστή μέθοδος εισόδου που να συμπεριλαμβάνει τέτοιες αλλαγές είναι η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Για να μελετηθεί αν τα γυμνά καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C εκμεταλλεύονται το συγκεκριμένο τρόπο εισόδου, χρησιμοποιήθηκε τρανσφερρίνη (trasnferrin). Πρόκειται για μία γλυκοπρωτεΐνη που μεταφέρει σίδηρο σε διάφορα είδη ιστών. Είναι γνωστό πως χρησιμοποιεί την ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης, μετατοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα όπου ελευθερώνει τα μόρια σιδήρου που κουβαλάει και στη συνέχεια επιστρέφει μέσω των 'ενδοσωμάτων ανακύκλωσης' (recycling endosomes) στην επιφάνεια του κυττάρου (71,72).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η ιδιότητα της να ενδοκυταρώνεται μέσα σε κυστίδια που περιέχουν κλαθρίνη. Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν ταυτόχρονα με core καψίδια και τρανσφερρίνη (κόκκινο χρώμα) για 15 λεπτά, μονιμοποιήθηκαν και σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (μπλε) αντισώματα. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο όπου παρατηρήθηκε ο χαρακτηριστικός λευκός χρωματισμός που παρουσιάζεται σε περίπτωση τριπλού συνεντοπισμού (εικόνα 71-Α). Αυτό υποδηλώνει πως η κλαθρίνη ενδεχομένως να συμμετέχει στην είσοδο των καψιδίων.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε σακχαρόζη, ένας ιδιαίτερα διαδεδομένος αναστολέας της ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης, ο οποίος επηρεάζει το διασκορπισμό των τρισκελών κλαθρίνης πάνω στη μεμβράνη και επομένως και τη δημιουργία του δικτυώματος στο κυστίδιο. Τα κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επωάστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37°C με αυξανόμενες ποσότητες σακχαρόζης, και προστέθηκαν είτε core καψίδια είτε τρανσφερρίνη για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισώματα και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Φωτογραφίες οπτικών τομών από τρία ανεξάρτητα πειράματα, ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Image-Pro Plus, και παρουσιάζονται στην εικόνα 71-Γ. Παρατηρήθηκε πως με την αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης μειωνόταν ο συνεντοπισμός τόσο των core καψιδίων, όσο και της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 72 : Τα core καψίδια δεν εισέρχονται με ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης.

A : Huh7 κύτταρα επιμολυσμένα με το πλασμίδο RFP-Caveolin-1 για 24 ώρες επωάστηκαν με φθορίζοντα καψίδια 1741 για 5 λεπτά. Ακολούθησε μονιμοποίηση και έλεγχος σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Δεξιά παραθέτεται η μεγέθυνση της επιλεγμένης περιοχής.

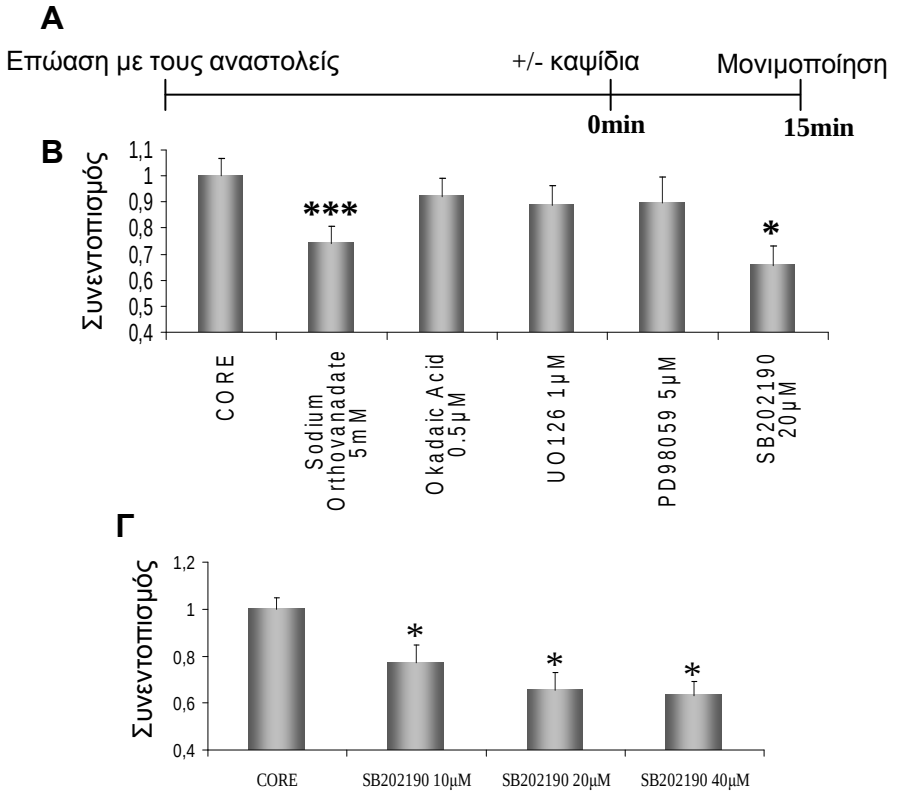
B : Απεικονιστική μικροσκοπία σε ζωντανά κύτταρα Huh7, επιμολυσμένα με το πλασμίδιο RFP-Caveolin-1 και φθορίζοντα 1740 καψίδια. Πάνω δεξιά παραθέτεται η χρονική ένδειξη κατά την οποία πάρθηκε η κάθε φωτογραφία (λεπτά:δευτερόλεπτα), ενώ το βέλος υποδεικνύει ένα καψίδιο.

τρανσφερρίνης με τα πρώιμα ενδοσώματα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως τα καψίδια εισέρχονται με ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης. Παρόλα αυτά ο συνεντοπισμός με την κλαθρίνη δεν είναι ολικός, και επιπλέον η επεξεργασία των κυττάρων με σακχαρόζη δεν αποτρέπει ολοκληρωτικά την είσοδο των καψιδίων στο κύτταρα, υπονοώντας ότι ενδεχομένως να εμπλέκεται και άλλος εναλλακτικός μηχανισμός εισόδου.

3.10. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΔΕΝ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΙ ΤΗΝ ΚΑΒΕΟΛΙΝΗ

Η ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (caveolin-mediated endocytosis) θα μπορούσε να αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο εισόδου για τα core καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C. Το γεγονός όμως ότι τα κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία δεν παράγουν ικανοποιητικές ποσότητες της πρωτεΐνης καβεολίνης (caveolin), μειώνει σημαντικά αυτή την πιθανότητα. Παρόλα αυτά θεωρήθηκε αναγκαίο να μελετηθεί η πιθανότητα εμπλοκής του συγκεκριμένου μηχανισμού εισόδου των core καψιδίων. Αν η πρωτεΐνη καβεολίνη (caveolin) υπερεκφραστεί στα κύτταρα Huh7 έχει την τάση να δημιουργεί λειτουργικά καβεοσώματα (76). Με αφορμή αυτό το γεγονός κύτταρα Huh7 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο RFP-Caveolin-1 και 24 ώρες μετά προστέθηκαν φθορίζοντα καψίδια 1741 για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 72 δεν παρουσιάζεται κανένας συνεντοπισμός ανάμεσα στα καψίδια και την πρωτεΐνη καβεολίνη. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν με τη μέθοδο της απεικονιστικής μικροσκοπίας ζωντανών κυττάρων (live-microscopy). Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα επιμολυσμένα με το πλασμίδιο RFP-Caveolin-1 και φθορίζοντα καψίδια 1740. Συνεπώς η ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης δεν φαίνεται να είναι πιθανή εναλλακτική μέθοδος για την είσοδο των γυμνών καψιδίων σε Huh7 κύτταρα. Εντούτοις, δεν αποκλείεται η χρήση του μηχανισμού αυτού σε άλλα είδη κυττάρων στόχων των core καψιδίων. Είναι άλλωστε γνωστό πως κάποιοι ιοί προσαρμόζουν τον μηχανισμό εισόδου τους αναλόγως με το κύτταρο που πρόκειται να εισέλθουν (76,217).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 73 : Οι χημικοί αναστολείς ορθοβαναδικό νάτριο και SB202190 επηρεάζουν την είσοδο των καψίδιων.

A : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

B : Κύτταρα Huh7 επεξεργάστηκαν με διάφορους χημικούς αναστολείς όπως στο (A). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με τα αντισώματα core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) και ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Ακολούθησε μέτρηση του συνεντοπισμού σε τουλάχιστον 50 εικόνες οπτικών τομών από τρία ανεξάρτητα πειράματα, και στατιστική μελέτη (***:P‹0.001, *:P‹0.05).

Γ : Το πείραμα εκτελέστηκε ακριβώς όπως πριν, με χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του χημικού αναστολέα SB202190 (10, 20, 40μM).

3.11. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΕΙΣΟΔΟ ΤΩΝ CORE ΚΑΨΙΔΙΩΝ

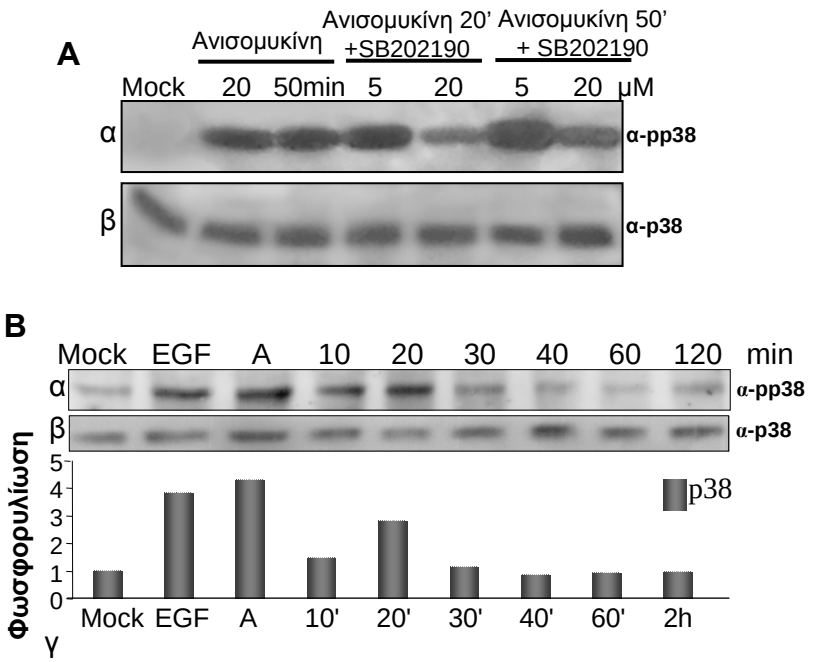
Η ενδοκύτωση και η ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης είναι στενά συνδεδεμένες λειτουργίες. Για όλους τους μηχανισμούς ενδοκύτωσης υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για πρωτεΐνες που ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης (82-84,158-162). Για να μελετηθεί αν υπάρχουν πρωτεΐνες που να ενεργοποιούνταν από την είσοδο των καψιδίων ή/και ενδεχομένως να βοηθούν στην είσοδο τους, χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι χημικοί αναστολείς που εμποδίζουν την προσθήκη φωσφόρου σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών.

3.11.1. ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ - ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση πρωτεϊνών στην είσοδο των καψιδίων από την μεμβρανική επιφάνεια μέχρι τα πρώιμα ενδοσώματα. Για το σκοπό αυτό κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 επωάστηκαν με τους αναστολείς για το ανάλογο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισώματα και εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα και μετρήθηκαν περισσότερες από 15 φωτογραφίες οπτικών τομών από το καθένα. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση, με την βοήθεια του στατιστικολόγου Δρ. Λαζαρίδη Κ. (Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Βιοχημείας), που περιλάμβανε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA) και έλεγχος δειγμάτων με υποτιθέμενες άνισες διακυμάνσεις (*Student t test)*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 73, και είναι στατιστικά σημαντικά (*** : P ‹ 0,001, * : P ‹ 0.05). Όπως φαίνεται το ορθοβαναδικό νάτριο (5mM-30 λεπτά) προκαλεί την μείωση του συνεντοπισμού των καψιδίων με τα ενδοσώματα. Πρόκειται για μία ουσία που αναστέλλει την λειτουργία φωσφατασών τύπου τυροσίνης, αλλά και διαφόρων ATPασών. Μείωση του συνεντοπισμού παρατηρείται επίσης και με τον χημικό αναστολέα SB202190 (20μM-1.5 ώρες) που εμποδίζει την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού p38. Επιπλέον, η μείωση φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενη (εικόνα 74). Οι αναστολείς του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$, UO126 (1μM-1.5 ώρες) και PD98059 (5μM-1.5 ώρες), καθώς και η χρήση οκαδαϊκού οξέος (0.5μM-30 λεπτά) δεν φαίνεται να επηρεάζουν την είσοδο των καψιδίων στο κύτταρο.

Στη συνέχεια, ερευνήθηκε η ενεργοποίηση του p38 μονοπατιού ώστε να επαληθευτούν τα παραπάνω αποτελέσματα. Αρχικά, δοκιμάστηκε αν ο συγκεκριμένος χημικός αναστολέας SB202190 πράγματι απέτρεπε την φωσφορυλίωση της p38 πρωτεΐνης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 74 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης p38 από τα core καψίδια.

A : Τα κύτταρα επωάστηκαν με 5 και 20μM του αναστολέα του μονοπατιού σηματοδότησης p38, SB202190. Ανοσομυκίνη προστέθηκε για 20 και 50 λεπτά για την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της φωσφορυλιωμένης (α) ή μη (β) μορφή της πρωτεΐνης p38 (~42kDa).

B : Κύτταρα HepG2 μετά από διατήρηση τους σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες, επωάστηκαν με core καψίδια, συλλέχθηκαν στους χρόνους που υποδεικνύονται, και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση όπως στο (A). Χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ο αυξητικός παράγοντας EGF (50nM-10 λεπτά) και η ουσία ανισομυκίνη (A) (10μM-1 ώρα). (γ) Γραφική παράσταση που αναπαριστάνει το ποσοστό φωσφορυλίωσης της p38 πρωτεΐνης στα κύτταρα μετά από ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση με το λογισμικό Quantity One 4.4.1.

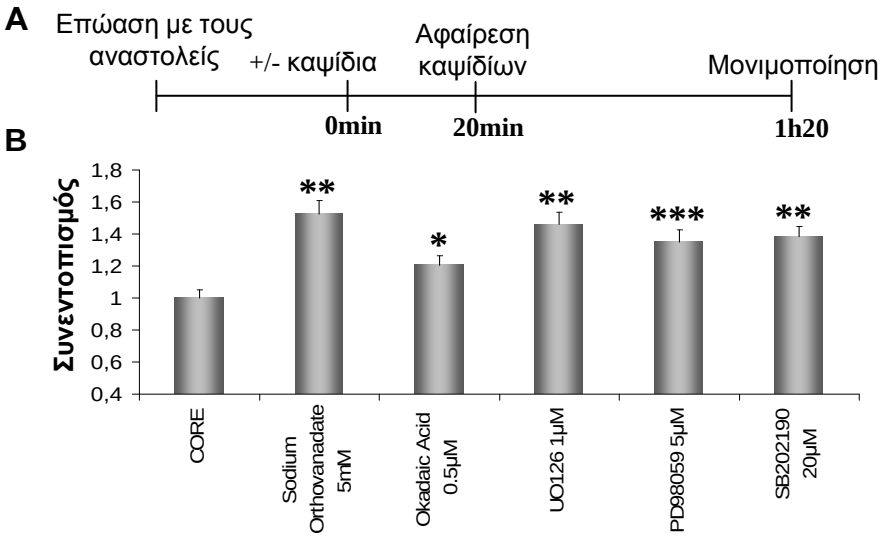
στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Για το σκοπό αυτό κύτταρα μετά από 24ωρη στέρηση ορού, επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις της ουσίας SB202190 για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστέθηκε ανισομυκίνη (anisomycin) σε δύο συγκεντρώσεις. Η συγκεκριμένη ουσία ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης p38. Όπως φαίνεται στην εικόνα 74 παρατηρείται μείωση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p38 που προκαλείται από την ανισομυκίνη παρουσία του αναστολέα. Παρόλα αυτά η μείωση δεν είναι ικανοποιητική. Θεωρήθηκε ότι αυτό ενδέχεται να οφείλετε στον μικρό χρόνο επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα. Για αυτό το λόγο στα πειράματα που εκτελέστηκαν για να μελετηθεί η είσοδος των κυττάρων που αναφέρθηκε πιο πάνω αυξήθηκε το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα επώασης με τον αναστολέα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης p38 παρουσία core καψιδίων. Κύτταρα HepG2, μετά από 24 ώρες στέρησης ορού, επωάστηκαν με core καψίδια για διάφορα χρονικά διαστήματα και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση τύπου Western. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ενάντια στη φωσφορυλιωμένη μορφή της p38 πρωτεΐνης αλλά και της ολικής πρωτεΐνης. Παρατηρείται μια αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p38 που μεγιστοποιείται 20 λεπτά μετά την προσθήκη καψιδίων στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Παρόλα αυτά ενεργοποίηση εμφανίζεται από τα πρώτα 10 λεπτά της επώασης. Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγο της ενδοκύτωσης των καψιδίων, που λαμβάνει χώρα περίπου στα πρώτα 15 λεπτά μετά την προσθήκη core καψιδίων. Ενδεχομένως τα καψίδια να φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p38 για να ενεργοποιήσουν την πρωτεΐνη GDI και επομένως να αυξήσουν την ενδοκύτωση, παρόλα αυτά, περαιτέρω μελέτη είναι αναγκαία για την διερεύνηση του φαινομένου.

3.11.2. ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ – ΛΥΣΟΣΩΜΑΤΑ

Μετά τον εντοπισμό των core καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα αυτά μετατοπίζονται στα όψιμα ενδοσώματα για να καταλήξουν στα λυσοσώματα. Για να μελετηθεί η εμπλοκή κυτταρικών πρωτεϊνών κυρίως με την ιδιότητα της φωσφορυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι χημικοί αναστολείς με πριν. Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν με τους αναστολείς και στη συνεχεία προστέθηκαν core καψίδια. Σε αντίθεση όμως με τα προηγούμενα πειράματα, 20 λεπτά αργότερα τα καψίδια αφαιρέθηκαν, προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό με ή χωρίς τους αναστολείς και τα κύτταρα επωάστηκαν για επιπλέον 1 ώρα. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με τα αντισώματα core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) και εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο για συνεντοπισμό core καψιδίων και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 75 : Εμπλοκή κυτταρικών πρωτεϊνών στη μετακίνηση των core καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.

A : Σχηματική αναπαράσταση του πειράματος.

B : Κύτταρα Huh7 επεξεργάστηκαν όπως στο (A). Ακολούθησε ανοσοφθορισμός με χρήση core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισωμάτων. Εκτελέστηκαν τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα, και τουλάχιστον 60 οπτικές τομές από αυτά τα κύτταρα ελέγχθηκαν για συνεντοπισμό με το λογισμικό Image-Pro Plus. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$).

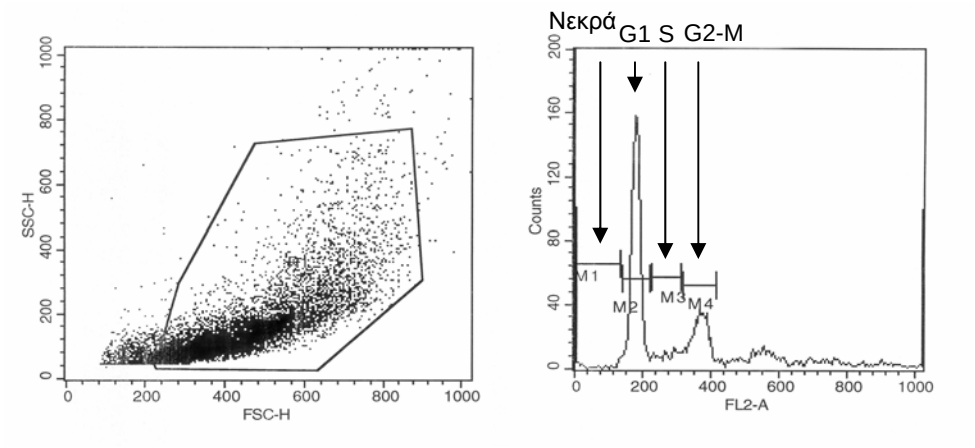
πρώιμων ενδοσωμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 75, η χρήση των χημικών αναστολέων ορθοβαναδικού νατρίου και SB202190 επηρεάζουν όπως και πριν την μετακίνηση από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα, καθώς αυξάνεται ο συνεντοπισμός. Αυτό υποδηλώνει πως πρωτεΐνες φωσφατάσες τύπου τυροσίνης/αλκαλίνης και ATPάσες καθώς και το μονοπάτι σηματοδότησης p38 επηρεάζουν την συγκεκριμένη μετακίνηση. Επιπλέον παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα με τους υπόλοιπους χημικούς αναστολείς. Το μονοπάτι σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ φαίνεται να εμπλέκεται στην μεταφορά των καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα όψιμα, μιας και η χρήση των ειδικών χημικών αναστολέων του UO126 (1μM-1.5 ώρες) και PD98059 (5μM-1.5 ώρες), προκαλεί την αύξηση του συνεντοπισμού των καψιδίων με τα ενδοσώματα. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχε και η χρήση του οκαδαϊκού οξέος, ενός γνωστού αναστολέα των φωσφατασών τύπου σερίνης/θρεονίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ :

Τα ανασυνδυασμένα core και φθορίζοντα GFP καψίδια, ενδοκυταρώνονται πιθανότατα μέσω κλαθρίνης και μετά από 15 περίπου λεπτά εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα. Στη συνέχεια μετατοπίζονται στα όψιμα ενδοσώματα (μετά από 1 ώρα επώασης) για να καταλήξουν στα λυσοσώματα (στις 4 ώρες). Στη μετακίνηση αυτή εμπλέκονται το χαμηλό pH, οι καθεψίνες B και L καθώς και διάφορες κυτταρικές φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες όπως η p38, οι $ERK_{1/2}$ και συγκεκριμένες φωσφατάσες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

A



B

Huh7

0% serum 12h	**0,5% serum 12h**	**2% serum 12h**	**10% serum 12h**
Νεκρά 13,62 %	Νεκρά 16,88 %	Νεκρά 6,05 %	Νεκρά 9,22 %
→ G1 39,91 %	G1 41,06 %	G1 36,60 %	G1 41,09 %
S 12,22 %	S 10,19 %	S 10,56 %	S 13,57 %
G2-M 13,56 %	G2-M 14,25 %	G2-M 12,38 %	G2-M 16,51 %
0% serum 36h	**0,5% serum 36h**	**2% serum 36h**	**10% serum 36h**
Νεκρά 5,81 %	Νεκρά 13,33 %	Νεκρά 7,44 %	Νεκρά 18,90 %
→ G1 27,50 %	G1 31,65 %	G1 48,86 %	G1 37,73 %
S 13,26 %	S 15,71 %	S 10,61 %	S 12,56 %
G2-M 14,62 %	G2-M 13,99 %	G2-M 11,99 %	G2-M 10,54 %

HepG2

0% serum 12h	**0,5% serum 12h**	**2% serum 12h**	**10% serum 12h**
Νεκρά 1,54 %	Νεκρά 2,54 %	Νεκρά 0,98 %	Νεκρά 6,10 %
→ G1 40,36 %	G1 33,52 %	G1 46,9 %	G1 43,83 %
S 8,6 %	S 11,64 %	S 5,81 %	S 8,28 %
G2-M 17,80 %	G2-M 18,79 %	G2-M 19,86 %	G2-M 18,34 %
0% serum 36h	**0,5% serum 36h**	**2% serum 36h**	**10% serum 36h**
Νεκρά 2.21 %	Νεκρά 3.84 %	Νεκρά 0.75 %	Νεκρά 6.88 %
→ G1 40.55 %	G1 47.82 %	G1 50.72 %	G1 41.40 %
S 7.11 %	S 5.70 %	S 9.09 %	S 9.64 %
G2-M 17.22 %	G2-M 18.99 %	G2-M 18.11 %	G2-M 15.37 %

Εικόνα 76 : Κυτταρομετρία ροής (FACS) για τον προσδιορισμό των συνθηκών συγχρονισμού των κυττάρων.

A : Ενδεικτικά αποτελέσματα από τις γραφικές παραστάσεις της κυτταρομετρίας ροής. Οι κορυφές της γραφικής παράστασης αντιστοιχούν σε διαφορετικές κυτταρικές φάσεις.

B : Αριθμητικά αποτελέσματα από πειράματα κυτταρομετρίας ροής διαφορετικών φάσεων ζωής HepG2 και Huh7 κυττάρων μετά από επώαση με αυξάνουσες συγκεντρώσεις ορού.

4. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ

4.1. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$

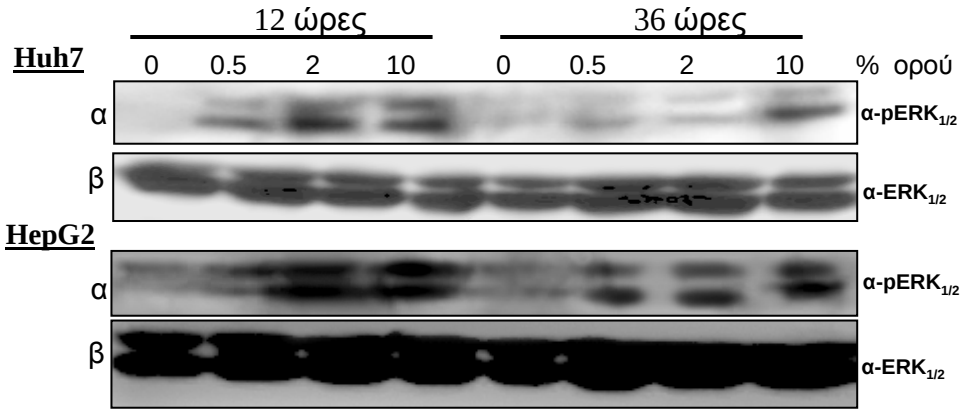
Η ενδοκύτωση, όπως αποδείχτηκε και πιο πάνω, είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης (82,83,158-162). Το μονοπάτι σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ εμπλέκεται εκτός από την ενδοκύτωση και σε πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες και γι'αυτό αποτελεί στόχο για πολλούς ιούς που προσπαθούν να εκμεταλλευτούν κυτταρικές διεργασίες προς όφελος τους (162,234). Στη συγκεκριμένη περίπτωση υπήρχαν αρκετές ενδείξεις για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού, αρχικά με την αποδεδειγμένη μετατόπιση της πρωτεΐνης ERF, δείκτη της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης $ERK_{1/2}$ (200,201) και έπειτα με την χρήση των χημικών αναστολέων UO126 και PD98059 που φαίνεται να επηρεάζουν την μετακίνηση των καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα.

4.1.1. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ $ERK_{1/2}$

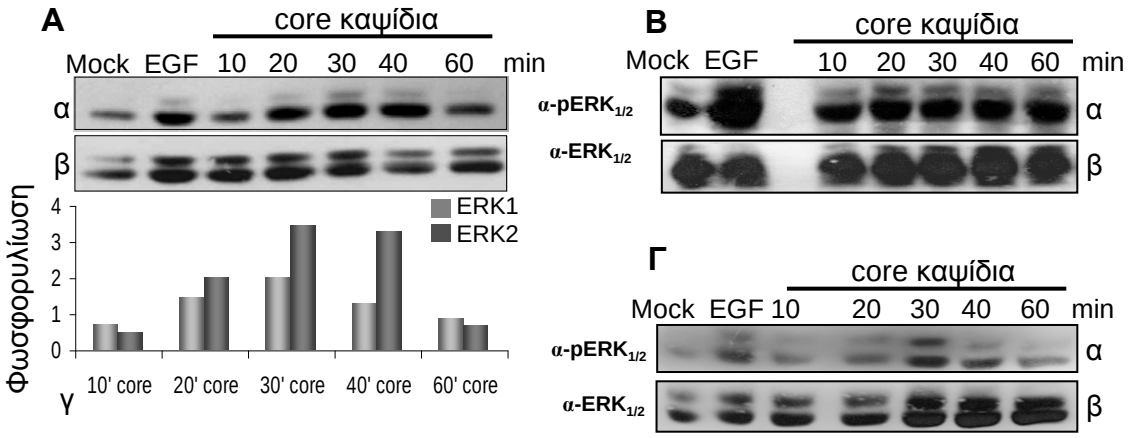
Αρχικά μελετήθηκαν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες τα κύτταρα (HepG2 και Huh7) παρουσιάζουν τα χαμηλότερα ποσοστά ενεργοποίησης των πρωτεϊνών ERK1 και ERK2. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι ιδιαίτερα ενεργοποιημένες σε κύτταρα που βρίσκονται υπό διαίρεση. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τέσσερις φάσεις: την 'G1', στην οποία τα κύτταρα αρχίζουν να διπλασιάζονται, την 'S' κατά την οποία γίνεται η αντιγραφή του DNA, την 'G2' που γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών και την 'M' που αντιστοιχεί στην μίτωση.

Για να προσδιοριστεί η φάση ζωής καθώς και ο συγχρονισμός των κυττάρων και επομένως και ο βαθμός ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$, τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού για διαφορετικές χρονικές περιόδους και ακολούθησαν πειράματα κυτταρομετρίας ροής (FACS). Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια γρήγορη, δυναμική και πολύπαραμετρική τεχνική που βασίζεται στην ανάλυση του κάθε κυττάρου χωριστά. Αρχικά αναπτύχθηκε με κύριο σκοπό τον κυτταροδιαχωρισμό, στον οποίο οφείλει και το όνομα FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter), όμως πλέον χρησιμοποιείται ως ένα εξαιρετικά χρήσιμο διαγνωστικό μέσο. Τα κύτταρα εξετάζονται καθώς διέρχονται μια νηματική ροή από σταθερό σημείο, όπου προσπίπτει μια ακτίνα laser. Οπως φαίνεται και στην εικόνα 76, τα κύτταρα επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις ορού για 12 ή 36 ώρες και στη συνέχεια εκτελέσθηκε με την βοήθεια της συναδέλφου Δρ. Oz-Arslan D., η κυτταρομετρία ροής. Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την μέτρηση μεγάλου αριθμού

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 77 : Προσδιορισμός συνθηκών ελάχιστης ενεργοποίησης του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού, με ανοσοαποτύπωση τύπου Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα Huh7 και HepG2, με αντίσωμα που αναγνωρίζει τις φωσφορυλιωμένες (α) ή μη (β) μορφές των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών (42 και 44 kDa).



Εικόνα 78 : Ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού σηματοδότησης από core καψίδια σε HepG2 (Α), Huh7 (Β) και SK-S-NH (Γ) κύτταρα.

Κύτταρα επωάστηκαν με τα καψίδια για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων (α) ή μη (β) μορφών των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών (42 και 44 kDa). Ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση με το λογισμικό Quantity One 4.4.1. (γ).

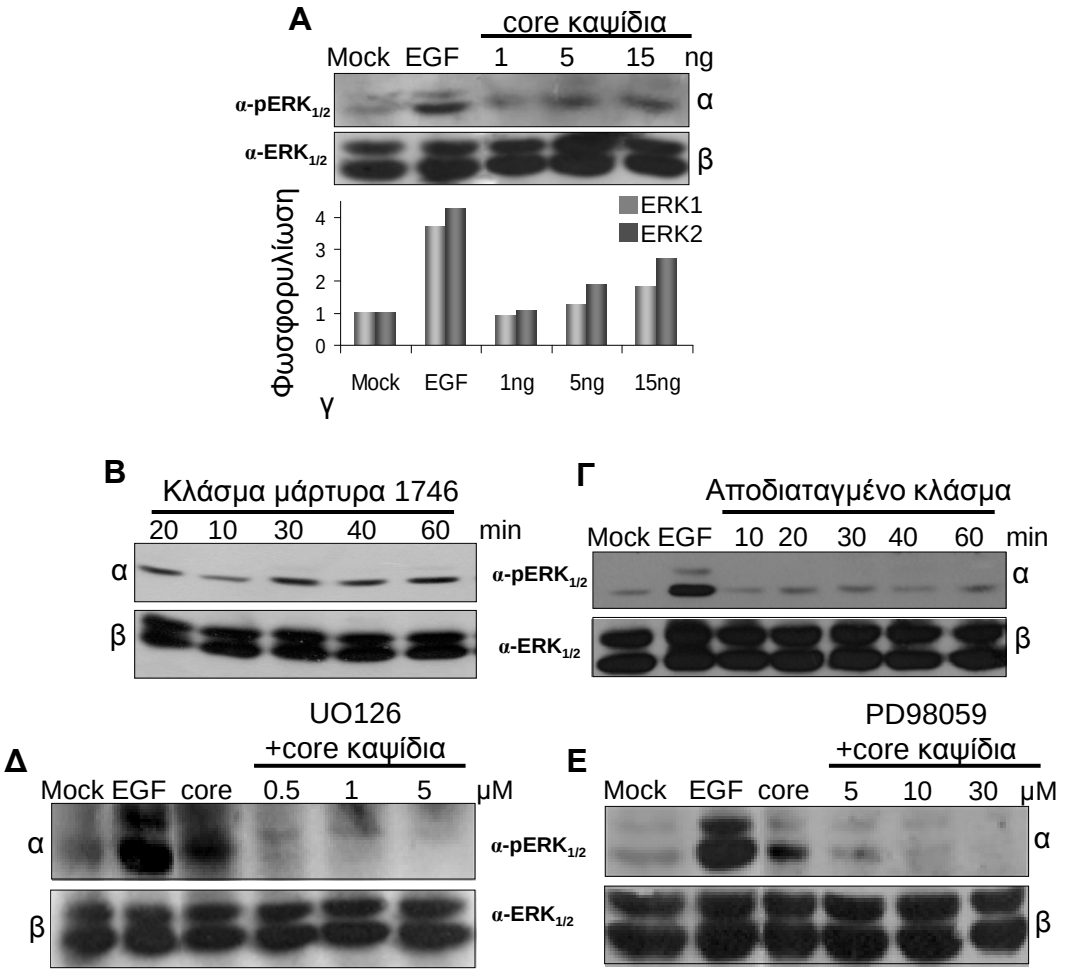
κυττάρων (στη συγκεκριμένη περίπτωση μετρήθηκαν 10000 κύτταρα) και παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία. Όπως παρατηρείται τόσο τα κύτταρα Huh7 όσο και τα HepG2 μετά από 12 ώρες επώασης με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό σχεδόν 40% βρίσκονται στην φάση G1, και μόλις περίπου 15% βρίσκεται στη φάση της μίτωσης, ενώ ο αριθμός των νεκρών κυττάρων είναι μικρός (εικόνα 76). Η προσθήκη ορού, όπως ήταν αναμενόμενο, φαίνεται να προκαλεί την αύξηση των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση της μείωσης. Στις 36 ώρες τα αποτελέσματα είναι παρόμοια αν και παρατηρείται μια αύξηση των νεκρών κυττάρων.

Στη συνέχεια τα ίδια δείγματα (και για τα δύο είδη κυττάρων) ελέγχθηκαν για την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης μέσο ανοσοαποτύπωσης τύπου Western χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν την φωσφορυλιωμένη μορφή των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ ή την ολική πρωτεΐνη (εικόνα 77). Παρατηρείται πως εμφανίζεται ελάχιστη ενεργοποίηση του μονοπατιού στις μηδενικές συνθήκες προσθήκης ορού. Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με τις μετρήσεις κυτταρομετρίας ροής βοήθησαν στην επιλογή των συνθηκών που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη εργασία για το συγχρονισμό των κύτταρών και την ελαχιστοποίηση της ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$. Όπως φαίνεται η καλύτερη συνθήκη είναι η δωδεκάωρη στέρηση όρου. Παρόλα αυτά για να μειωθεί περισσότερο ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στην φάση 'S' αποφασίστηκε η χρήση εικοσιτετράωρης στέρησης ορού.

4.1.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ

Για τη μελέτη της ενεργοποίησης του μονοπατιού χρησιμοποιήθηκαν αρχικά κύτταρα HepG2 τα οποία υπέστησαν εικοσιτετράωρη στέρηση ορού, και στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια για διάφορες χρονικές περιόδους. Κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% και ακολούθησε ανασοστύπωση τύπου Western. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της $ERK_{1/2}$ καθώς και των ολικών πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 78 μέγιστη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών παρατηρείται μετά από 30 λεπτά επώασης με τα καψίδια. Για την ακρίβεια παρατηρείται 2 φορές αύξηση της φωσφορυλίωσης της ERK1 πρωτεΐνης και 3.5 της ERK2 σε σχέση με τα κυτταρικά εκχυλίσματα μάρτυρες. Παρόλα αυτά στα 60 λεπτά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών παραμένουν πιο υψηλά από αυτά των υπό στέρηση ορού κυττάρων. Ο αυξητικός παράγοντας EGF (Epidermal Growth Factor) γνωστός για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού (50nM–10 λεπτά) χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Αντίστοιχα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με την προσθήκη core καψιδίων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 79 : Ενεργοποίηση του $MEK_{1/2}$ - $ERK_{1/2}$ μονοπατιού η οποία παρουσιάζεται δοσοεξαρτώμενη.

Α : Αυξανόμενες συγκεντρώσεις καψιδίων.

Β : Επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα με το κλάσμα μάρτυρα ίδιας πυκνότητας που προέρχεται από μόλυνση Sf9 κυττάρων με το βακουλοϊό 1746.

Γ : Επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα με αποδιαταγμένα καψίδια (1 ώρα σε θερμοκρασία 100°C).

Δ και Ε : Η χρήση αυξανόμενων συγκεντρώσεων των χημικών αναστολέων UO126 και PD98059 προκαλεί μείωση της ενεργοποίησης.

Όλα τα παραπάνω πειράματα εκτελέστηκαν με ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις φωσφορυλιωμένες (α) ή μη (β) μορφές των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (42 και 44 kDa). Ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση εκτελέστηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Quantity One 4.4.1. (γ).

σε άλλες κυτταρικές σειρές, όπως τα κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh7 καθώς και τα νευρικά κύτταρα SK-S-NH.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι δοσοεξαρτώμενο καθώς η αύξηση της συγκέντρωσης των καψιδίων προκαλεί την αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1 και ERK2 πρωτεϊνών (εικόνα 79-Α).

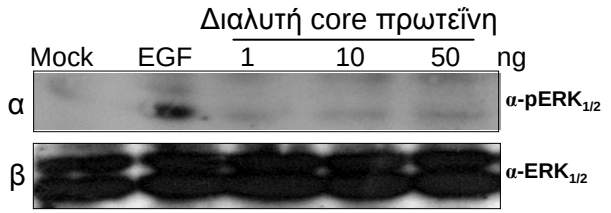
Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αφενός το κλάσμα αντίστοιχης πυκνότητας από κλίση σακχαρόζης με κύτταρα Sf9 που μολύνθηκαν με τον βακουλοϊό 1746 και αφετέρου το αντίστοιχο κλάσμα, που περιέχει core καψίδια, που όμως υπέστησαν βρασμό για 1 ώρα στους 100°C, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους. Όπως φαίνεται στην εικόνα 79 Β και Γ, και στις δύο αυτές περιπτώσεις δεν παρατηρείται το ίδιο πρότυπο φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών ERK1 και ERK2 σε σχέση με αυτό που προκύπτει μετά από την προσθήκη core καψιδίων.

4.1.3. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ERK$_{1/2}$ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΑΝΟΔΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ MEK$_{1/2}$

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν δύο γνωστοί χημικοί αναστολείς του μονοπατιού σηματοδότησης ERK$_{1/2}$, ο UO126 και ο PD98059. Πρόκειται για ειδικούς χημικούς αναστολείς που έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών MEK1 και MEK2. Παρόλα αυτά λειτουργούν με διαφορετικό τρόπο. Ο αναστολέας UO126 έχει αποδειχτεί πως προσδένεται πάνω στις MEK1 και MEK2 πρωτεΐνες και εμποδίζει την φωσφορυλίωση τους. Για τον PD98059 τα αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά σε σχέση με την δυνατότητα πρόσδεσης του πάνω στις συγκεκριμένες δύο πρωτεΐνες. Επιπλέον, ο UO126 εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της MEK1 πρωτεΐνης πιο αποτελεσματικά από τη MEK2 (235).

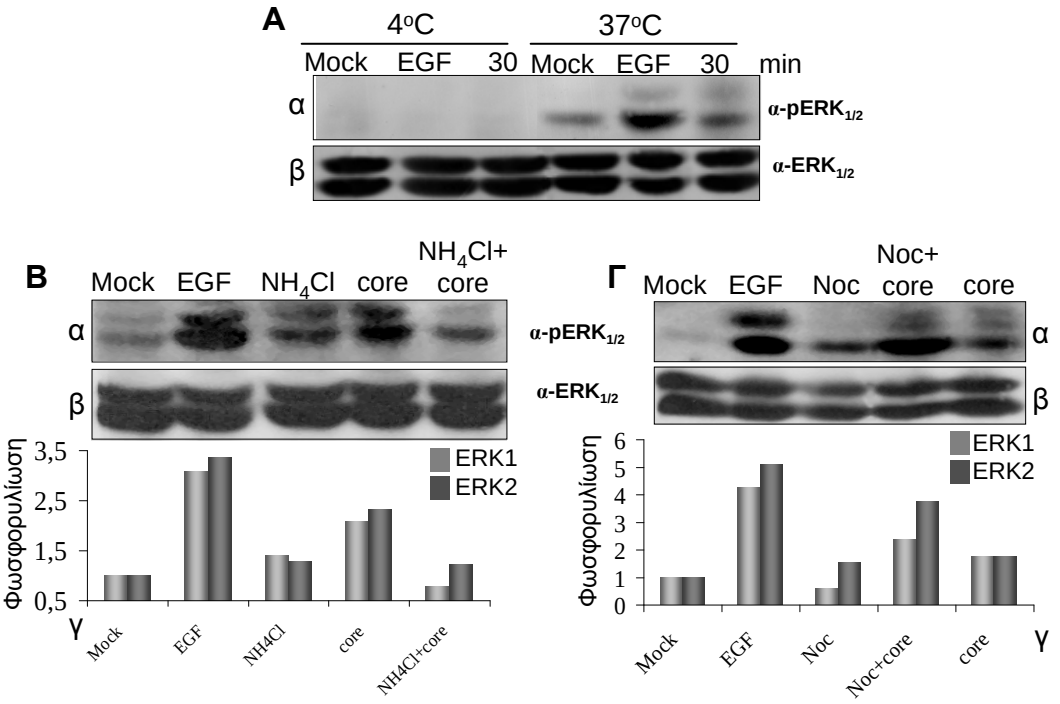
Κύτταρα HepG2, επωάστηκαν με τους δύο χημικούς αναστολείς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και προστέθηκαν core καψίδια για 30 λεπτά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 79-Δ και Ε η χρήση των δύο χημικών αναστολέων προκάλεσε την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης των ERK1 και ERK2 πρωτεϊνών από τα core καψίδια αναλογικά με την συγκέντρωση τους. Συνεπώς, η παρατηρούμενη ενεργοποίηση των ERK$_{1/2}$ πρωτεϊνών από τα καψίδια, οφείλεται στην ενεργοποίηση των MEK$_{1/2}$ πρωτεϊνών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 80 : Μη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ από διαλυτή πρωτεΐνη core βακτηριακής προέλευσης.

Κύτταρα HepG2, επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυτής πρωτεΐνης και τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης 10%. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με αντισώματα ενάντια στις φωσφορυλιωμένες (α) ή μη (β) $ERK_{1/2}$ μορφές (42 και 44 kDa) .



Εικόνα 81 : Ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού από την ενδοκύτωση των core καψιδίων.

Α : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με EGF (10 λεπτά) και core καψιδια (30 λεπτά) είτε σε θερμοκρασία 4ºC είτε σε 37ºC.

Β : Κύτταρα επωάστηκαν με χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) (5mM-15 λεπτά) πριν την προσθήκη core καψιδίων για 30 λεπτά

Γ : Επώαση κυττάρων με νοκοδαζόλη (Nocodazole-Noc) (4μM-2 ώρες) πριν από την προσθήκη core καψιδίων για 30 λεπτά.

Όλα τα παραπάνω πειράματα, μετά την κυτταρική λύση διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με χρήση αντισωμάτων ενάντια στις φωσφορυλιωμένες (α) ή μη (β) μορφές των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (42 και 44 kDa) ενώ η ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση εκτελέστηκε με το λογισμικό Quantity One 4.4.1. (γ).

4.2. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗ ΔΟΜΗ

HepG2 κύτταρα επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις διαλυτής core πρωτεΐνης βακτηριακής προέλευσης για 30 λεπτά. Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 80, η χρήση ακόμα και πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης δεν προκάλεσε την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$. Επομένως, είναι η καψιδιακή δομή των core καψιδίων που προκαλούν την φωσφορυλίωση των $MEK_{1/2}$ και στη συνέχεια των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών και οχι η πρωτεΐνη core *per se*.

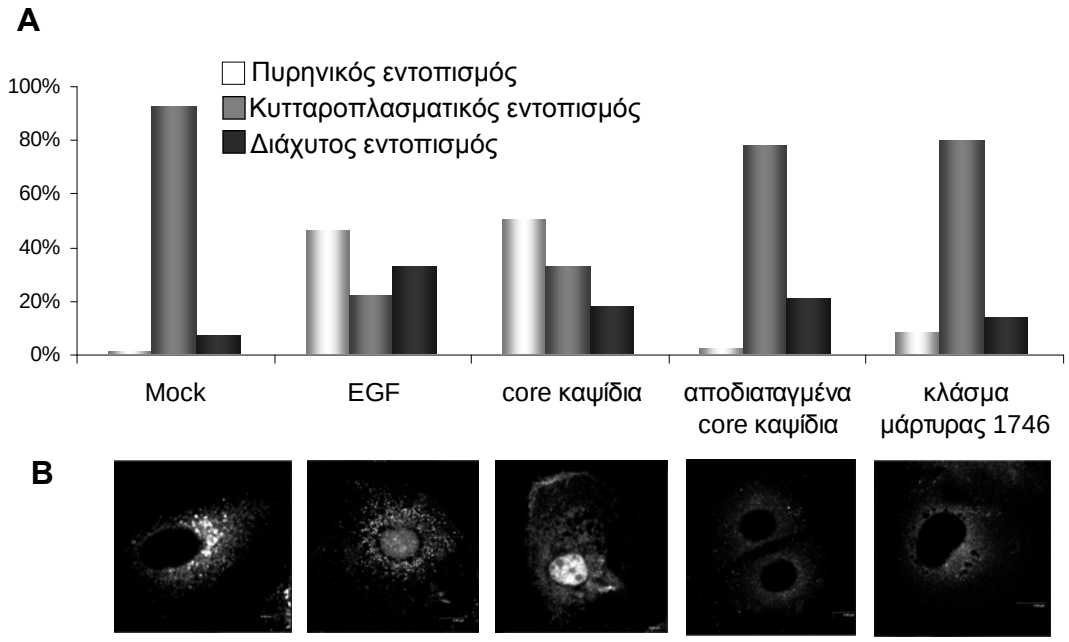
4.3. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ

Για να μελετηθεί αν η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης εξαρτάται από την ενδοκύτωση ή από την πρόσδεση των καψιδίων, τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα στους 4^oC και στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια για 30 λεπτά. Ακολούθησε λύση των κυττάρων, διαχωρισμός σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% και ανασοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις φωσφορυλιωμένες $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες καθώς και τις ολικές. Είναι γνωστό πως στους 4^oC εμποδίζεται η ενδοκύτωση όχι μόνο ουσιών όπως ο EGF αλλά, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, και των core καψιδίων (200,201). Στην εικόνα 81-Α, αποδεικνύεται πως σε θερμοκρασία 4^oC, δεν παρατηρείται καμία ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης, σε αντίθεση με την επώαση σε θερμοκρασία 37^oC.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η αποδεδειγμένη σε προηγούμενα πειράματα ικανότητα του χημικού αναστολέα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) να αυξάνει το pH στα πρώιμα ενδοσώματα 'εγκλωβίζοντας' τα καψίδια στο εσωτερικό των πρώιμων ενδοσωμάτων ακόμα και μετά από αρκετή ώρα επώασης. Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με το χημικό αναστολέα για 15 λεπτά πριν την προσθήκη core καψιδίων (30 λεπτά) και ακολούθησε αντίστοιχη επεξεργασία των κυττάρων όπως και προηγουμένως. Στην εικόνα 81-Β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και είναι εμφανές πως παρουσία του χλωριούχου αμμωνίου δεν υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$.

Τέλος, είναι αποδεδειγμένο πως η ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης σχετίζεται άμεσα με την σωστή δομή του κυτταρικού σκελετού. Όπως παρουσιάστηκε ανωτέρω, ο χημικός αναστολέας νοκοδαζόλη (nocodazole) επηρεάζει την μεταφορά των καψιδίων από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα, και επιπλέον προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ (236). Όπως φαίνεται στην εικόνα 81-Γ, η χρήση της νοκοδαζόλης, όπως ήταν αναμενόμενο, προκαλεί την φωσφορυλίωση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά η προσθήκη core καψιδίων για 30

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 82 : Πυρηνικός εντοπισμός των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών παρουσία core καψιδίων.

A : Οπτικές τομές από 100 κύτταρα που έχουν επωαστεί με core καψίδια ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο για τον κυτταρικό εντοπισμό των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ο αυξητικός παράγοντας EGF, το κλάσμα ίδιας πυκνότητας του βακουλοϊού 1746 και καψίδια αποδιαταγμένα με βρασμό.

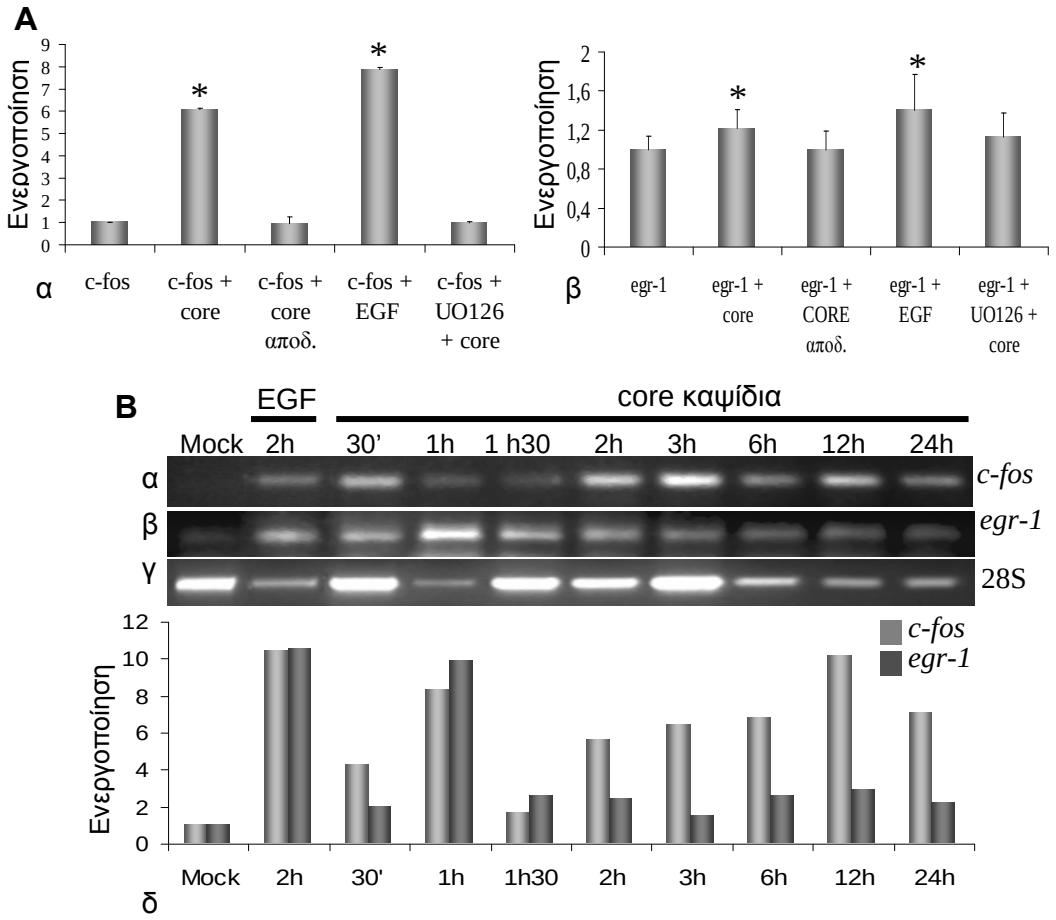
B : Ενδεικτικές φωτογραφίες οπτικών τομών που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις.

λεπτά, μετά από επώαση με νοκοδαζόλη, προκαλεί μία ισχυρότερη αύξηση της φωσφορυλίωσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η νοκοδαζόλη παρεμποδίζει την κανονική πορεία της ενδοκύτωσης των καψιδίων και τα αναγκάζει να παραμένουν στα πρώιμα ενδοσώματα στην περιφέρεια του κυττάρου. Συμπερασματικά, αποδεικνύεται ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ εξαρτάται από την ενδοκύτωση των καψιδίων και πιθανά να εμπλέκονται σε αυτήν τα πρώιμα ενδοσώματα.

4.4. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ $ERK_{1/2}$

Οι φωσφορυλιωμένες, εξαιτίας κάποιου βιολογικού σήματος, πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$ μπορούν είτε να παραμείνουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου και να επηρεάζουν διάφορες πρωτεΐνες είτε να μετατοπιστούν στον πυρήνα όπου επηρεάζουν συνήθως καθοδικούς στόχους (127,237). Για να μελετηθεί ποια από τις δύο αυτές πιθανότητες ισχύει στην περίπτωση των core καψιδίων, οπτικές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου εκατό κύτταρων Huh7 παρατηρήθηκαν και αξιολογήθηκαν ανάλογα με τον εντοπισμό των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 82, τα κύτταρα που έχουν υποστεί στέρηση ορού, καθώς επίσης και τα κύτταρα που επωάστηκαν για 30 λεπτά με το κλάσμα μάρτυρα από τον βακουλοϊό 1746, ή τα αποδιαταγμένα καψίδια (1 ώρα στους 100°C), παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό κυτταροπλασματικού εντοπισμού των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$. Αντίθετα, τα κύτταρα που επωάστηκαν για 10 λεπτά με τον αυξητικό παράγοντα EGF ή 30 λεπτά με τα core καψίδια, παρουσιάζουν 46 και 50% πυρηνικό εντοπισμό αντίστοιχα. Συνεπώς οι πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$ μετά την φωσφορυλίωση τους έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο πυρήνα και να επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 83 : Ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1* από τα core καψίδια.

A : Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pFosWT-GL3 (c-fos) (α) ή pEgr1.2-luc (egr-1) (β) για 24 ώρες, ακολούθησε 12ωρη στέρηση ορού και προστέθηκαν core καψίδια για 18 ώρες. Μετρήθηκε η φωταύγεια και ομαλοποιήθηκε με την ολική πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (*:P‹0.05).

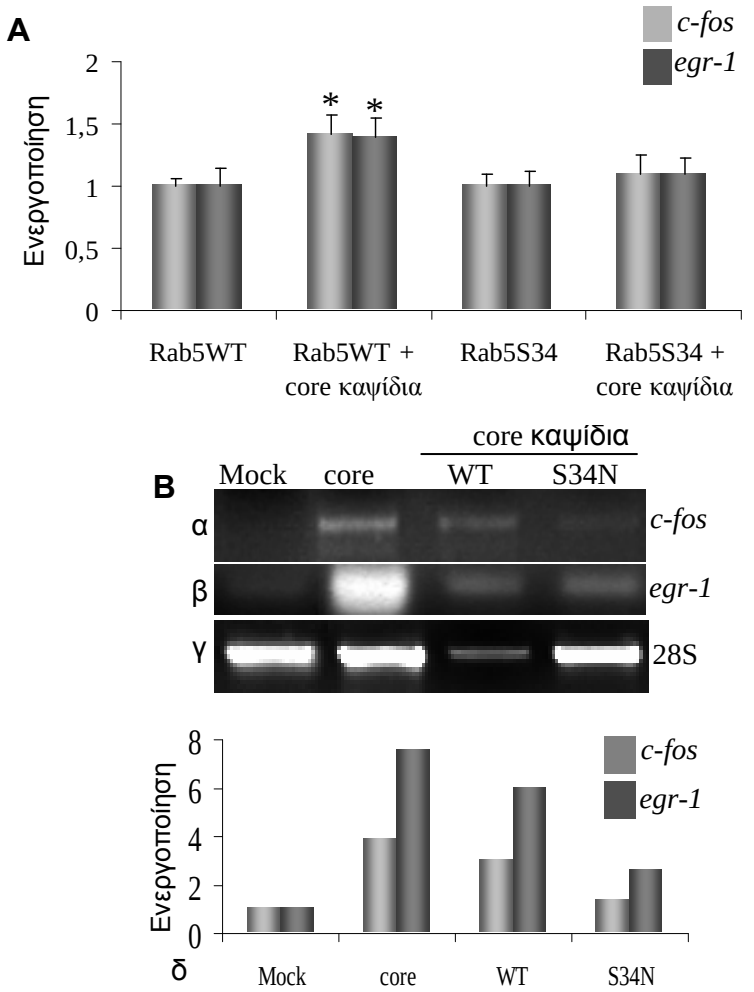
B : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν μετά από 12ωρη στέρηση ορού με core καψίδια για διάφορα χρονικά διαστήματα. Απομονώθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα, μετατράπηκαν σε cDNA και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) με τα κατάλληλα μόρια εκκινητές για τα γονίδια *c-fos* (α) και *egr-1* (β). Το 28S χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (γ). Γραφική παράσταση της ποσοτικοποίησης και ομαλοποίησης με το λογισμικό Quantity One 4.4.1. (δ).

4.5. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΩΙΜΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ *c-fos* ΚΑΙ *egr-1*

Η ενεργοποίηση των γονιδίων πρώιμης απόκρισης αποτελεί την πρώτη μεταγραφική αντίδραση του κυττάρου σε αλλαγές των MAPκινασών, ικανή να επηρεάζει πολλές κυτταρικές διεργασίες (129). Ειδικότερα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ είναι διαπιστωμένο ότι επηρεάζει τους προαγωγείς των γονιδίων πρώιμης απόκρισης (237-239). Για να μελετηθεί αν οι ενεργοποιημένες $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες, που εισέρχονται στο πυρήνα θα μπορούσαν να επηρεάζουν γονίδια πρώιμης απόκρισης, μελετήθηκαν δύο πολύ γνωστά γονίδια: το *c-fos* (Feline OsteoSarcoma virus-οστεοσαρκωματικός ιός αιλουροειδούς) και το *egr-1* (Early Growth Response-1). Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που περιείχαν τον προαγωγέα του κάθε γονιδίου συζευγμένο με την πρωτεΐνη αναφοράς λουσιφεράση (Luciferase) (pFosWT-GL3 και pEgr1.2-luc) και 24 ώρες μετά υπέστησαν δωδεκάωρη στέρηση ορού. Στη συνέχεια προστέθηκαν core καψίδια για 18 ώρες, και μετά από κυτταρική λύση, έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις φωταύγειας καθώς και ολικής πρωτεΐνης. Στην εικόνα 83-Α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τουλάχιστον πέντε ανεξάρτητα πειράματα με δείγματα εις διπλούν που είναι στατιστικά σημαντικά ($P<0.05$). Όπως φαίνεται, τόσο για το γονίδιο *c-fos* όσο και για το *egr-1*, η προσθήκη core καψιδίων αυξάνει την παραγωγή της πρωτεΐνης λουσιφεράσης υποδεικνύοντας πως ο προαγωγέας των συγκεκριμένων γονιδίων 'χρησιμοποιείται' περισσότερο από ότι όταν δεν υπάρχουν καψίδια ή τα καψίδια αυτά είναι αποδιαταγμένα. Η χρήση του χημικού αναστολέα των $MEK_{1/2}$, UO126 φαίνεται να εμποδίζει ολοκληρωτικά την παραγωγή επιπλέον πρωτεΐνης λουσιφεράσης παρουσία καψιδίων στην περίπτωση του γονιδίου *c-fos*, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$. Αντιθέτως για το γονίδιο *egr-1*, η επώαση με τον αναστολέα UO126 μειώνει αλλά δεν απαλείφει πλήρως την παραγωγή πρωτεΐνης λουσιφεράσης παρουσία καψιδίων, υποδηλώνοντας πως επιπλέον μονοπάτια σηματοδότησης εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού.

Για την επιβεβαίωση του συγκεκριμένου αποτελέσματος, απομονώθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα που είχαν επωαστεί, μετά από 24ωρη στέρηση ορού, με core καψίδια για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (εικόνα 83-Β). Από τα εκχυλίσματα αυτά έγινε απομόνωση ολικού RNA, μετατροπή σε cDNA και στη συνέχεια ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με ζεύγη εκκινητών που αναγνώριζαν χαρακτηριστικές περιοχές του γονίδιου, ώστε να υπολογιστεί η μεταγραφή των γονιδίων αυτών. Όπως φαίνεται παρουσιάζεται μέγιστη ενεργοποίηση των γονιδίων μια ώρα μετά την προσθήκη core καψιδίων στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων. Παρουσιάζει δε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 84 : Ενεργοποίηση της μεταγραφής των πρώιμων γονιδίων απόκρισης *c-fos* και *egr-1* από την ενδοκύτωση των core καψιδίων.

A : Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pFosWT-GL3 (c-fos) ή pEgr1.2-luc (egr-1) και τα πλασμίδια GFP-Rab5WT ή GFP-Rab5S34N για 24 ώρες, ακολούθησε 12ωρη στέρηση ορού και προστέθηκαν core καψίδια για 18 ώρες. Μετρήθηκε η φωταύγεια και ομαλοποιήθηκε με την ολική πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (*:P‹0.05).

B : Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια GFP-Rab5WT ή GFP-Rab5S34N για 24 ώρες και μετά από 12ωρη στέρηση ορού επωάστηκαν με core καψίδια για 1ώρα. Απομονώθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα, μετατράπηκαν σε cDNA και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) με τα κατάλληλα μόρια υποκινητές για τα γονίδια *c-fos* (α) και *egr-1* (β). Το 28S χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας (γ). Γραφική παράσταση της ποσοτικοποίησης και ομαλοποίησης με το λογισμικό Quantity One 4.4.1. (δ).

ενδιαφέρον το γεγονός ότι ακόμα και σε προχωρημένες ώρες τα επίπεδα παραγωγής των γονιδίων παραμένουν υψηλά ιδιαίτερα στην περίπτωση του *c-fos*.

4.6. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΡΩΙΜΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ (*c-fos*, *egr-1*) ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΝΔΟΚΥΤΩΣΗ

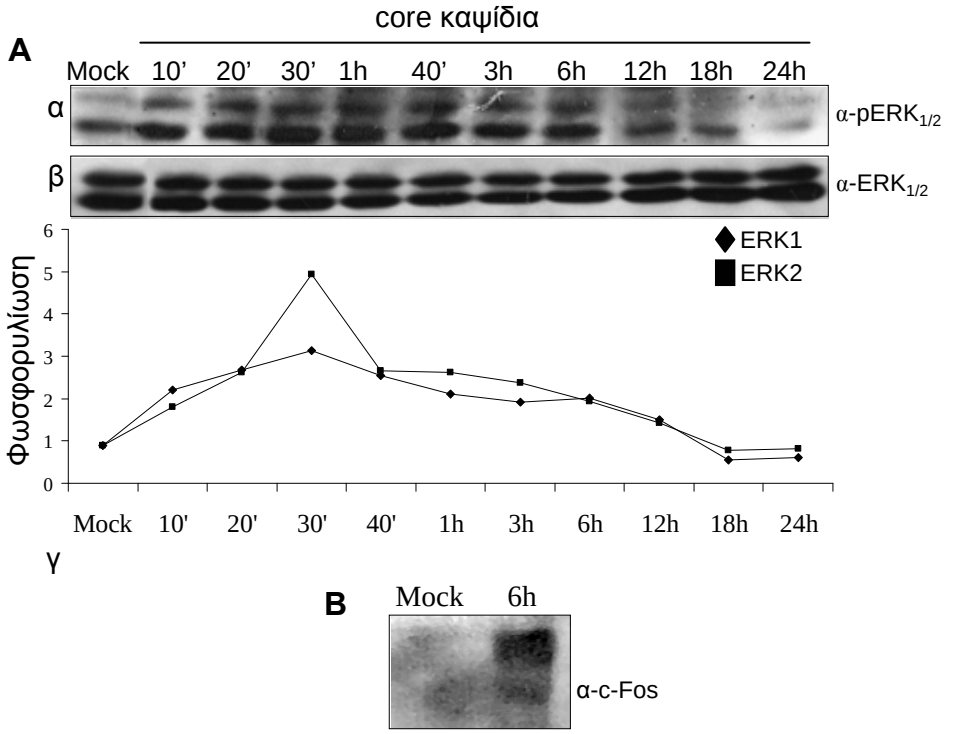
Για να μελετηθεί αν η ενδοκύτωση μπορεί να επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *c-fos* και *egr-1*, κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια GFP-Rab5WT ή GFP-Rab5S34N και ταυτόχρονα με τα πλασμίδια που περιέχουν τους προαγωγείς των γονιδίων σε ζεύξη με την πρωτεΐνη λουσιφεράση. 24 ώρες μετά υπέστησαν στέρηση ορού για 12 ώρες και ακολούθησε προσθήκη core καψιδίων για 18 ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ποσοστά φωταύγειας και ολικής πρωτεΐνης ώστε να ομαλοποιηθούν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 84. Παρατηρείται μια αύξηση της παραγωγής των συγκεκριμένων προαγωγέων παρουσία των καψιδίων όταν εκφράζεται η πρωτεΐνη Rab5. Εντούτοις, κυρίως στην περίπτωση του γονιδίου *c-fos*, η αύξηση είναι πολύ μικρότερη από αυτήν που παρατηρήθηκε στο προηγούμενο πείραμα (εικόνα 83-Β). Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης Rab5. Η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Rab5S34N, που όπως έχει αποδειχτεί σε προηγούμενα πειράματα μειώνει την είσοδο των core καψιδίων, φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση και των γονιδιών *c-fos* και *egr-1*.

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα, εκτελέστηκε ακριβώς το ίδιο πείραμα όπως και προηγουμένως, μόνο που τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα με τα core καψίδια, και στη συνεχεία ελέγχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα, όπως και στην προηγούμενη παράγραφο, για τα ποσοστά μεταγραφής τους. Στην εικόνα 84, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και είναι εμφανές πως η παραγωγή της πρωτεΐνης Rab5S34N μειώνει την μεταγραφή των γονιδίων παρουσία core καψιδίων. Επομένως, η ενδοκύτωση συνδέεται άμεσα με την ενεργοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων.

4.7. ΠΑΡΑΤΕΤΑΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ $ERK_{1/2}$ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ

Είναι αποδεδειγμένο πως η ένταση και η χρονική διάρκεια της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού $ERK_{1/2}$ επηρεάζει τη κυτταρική του δράση καθώς επίσης και την έκφραση και σταθεροποίηση των γονιδίων πρώιμης απόκρισης (127,238,239). Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εικόνα 83, παρατηρήθηκε παρατεταμένη έκφραση των γονιδίων πρώιμης απόκρισης και κυρίως του γονιδίου *c-fos*. Για τους λόγους αυτούς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 85 : Παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ από τα core καψίδια.

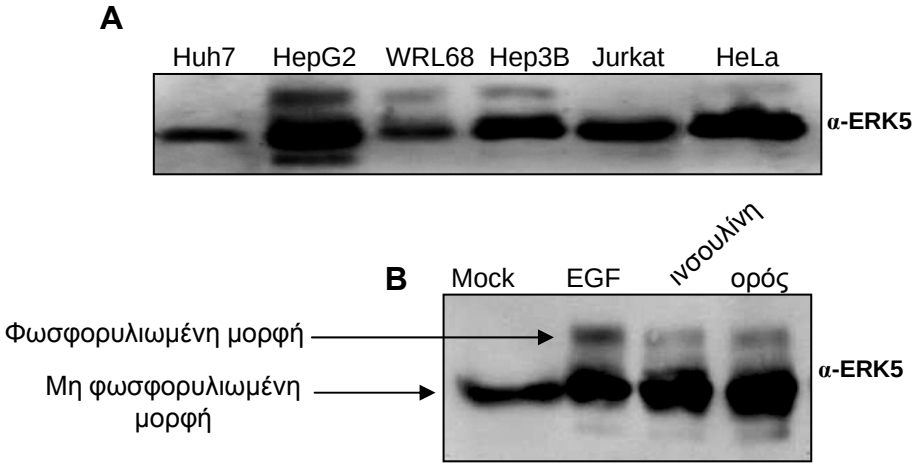
A : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με core καψίδια για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις φωσφορυλιωμένες (α) ή μη (β) μορφές των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (42 και 44 kDa). Στη γραφική παράσταση παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση με το λογισμικό πρόγραμμα Quantity One 4.4.1. (γ).

B : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με core καψίδια για 6 ώρες, τα κυτταρικά εκχυλίσματα υπέστησαν διαχωρισμό πυρήνων και κυτταροπλάσματος και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισώματος ενάντια στη πρωτεΐνη c-Fos (60kDa).

μελετήθηκε η διάρκεια του βιολογικού σήματος, δηλαδή της διάρκειας επίδρασης των core καψιδίων στη φωσφορυλίωση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών. Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με core καψίδια, για μεγάλα χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Ακολούθησε ανασοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων ενάντια στις φωσφορυλιωμένες και μη μορφές των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών (εικονα 85-Α). Όπως παρατηρείται υπάρχει μια άμεση ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών αυτών μετά από 30 λεπτά επώασης με τα core καψίδια, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο. Σε πιο προχωρημένες ώρες επώασης όμως, η ενεργοποίηση δεν επιστρέφει σε μηδενικά επίπεδα αλλά διατηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε υψηλά επίπεδα, υποδηλώνοντας μια παρατεταμένη ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού σηματοδότησης.

Για να επιβεβαιωθεί το φαινόμενο, μελετήθηκε η σταθερότητα της πρωτεΐνης c-Fos. Είναι αποδεδειγμένο ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δρα ως 'δείκτης ευαισθησίας' για το συγκεκριμένο μονοπάτι σηματοδότησης. Παράγεται σχεδόν αμέσως μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού, όμως περίπου 45 λεπτά αργότερα αποικοδομείται. Όταν όμως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ διατηρείται, τότε η πρωτεΐνη c-Fos σταθεροποιείται, αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής της, και παραμένει στον πυρήνα του κυττάρου για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Για να μελετηθεί η σταθερότητα της πρωτεΐνης c-Fos, κύτταρα HepG2 μετά από 24ωρη στέρηση ορού, επωάστηκαν με core καψίδια για 6 ώρες, και στη συνέχεια ακολούθησε διαχωρισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε πυρήνες και κυτταρόπλασμα όπως περιγράφεται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8%, εκτελέστηκε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση τύπου Western με αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη c-Fos. Η ύπαρξη της πρωτεΐνης μετά από 6 ώρες επώασης με τα καψίδια υποδηλώνει πως πράγματι οι πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$ διατηρούν μία παρατεταμένη φωσφορυλίωση, που θα μπορούσε να επηρεάζει την έκφραση και τη σταθερότητα και άλλων κυτταρικών πρωτεϊνών εκτός από την c-Fos πρωτεΐνη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 86 : Κυτταρικές σειρές που περιέχουν την πρωτεΐνη ERK5.

A : Κυτταρικά εκχυλίσματα διαφόρων κυτταρικών σειρών διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση ERK5 αντισώματος (~110kDa).

B : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν για 30 λεπτά με τον αυξητικό παράγοντα EGF (50nM), ινσουλίνη (4.5mM) και ορό 30%. Ακολούθησε διαχωρισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% και ανοσοαποτύπωση τύπου Western με χρήση ERK5 αντισώματος.

4.8. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ERK5

Το συγκεκριμένο μονοπάτι σηματοδότησης αποτελεί ένα νέο μονοπάτι που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα (1995) και πολλές πτυχές του παραμένουν ανεξερεύνητες. Φαίνεται να συμμετέχει σε περιπτώσεις καρκίνου και αγγειογένεσης ενώ μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν πληροφορίες για την εμπλοκή του σε κάποιο στάδιο της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας C (144,149,150).

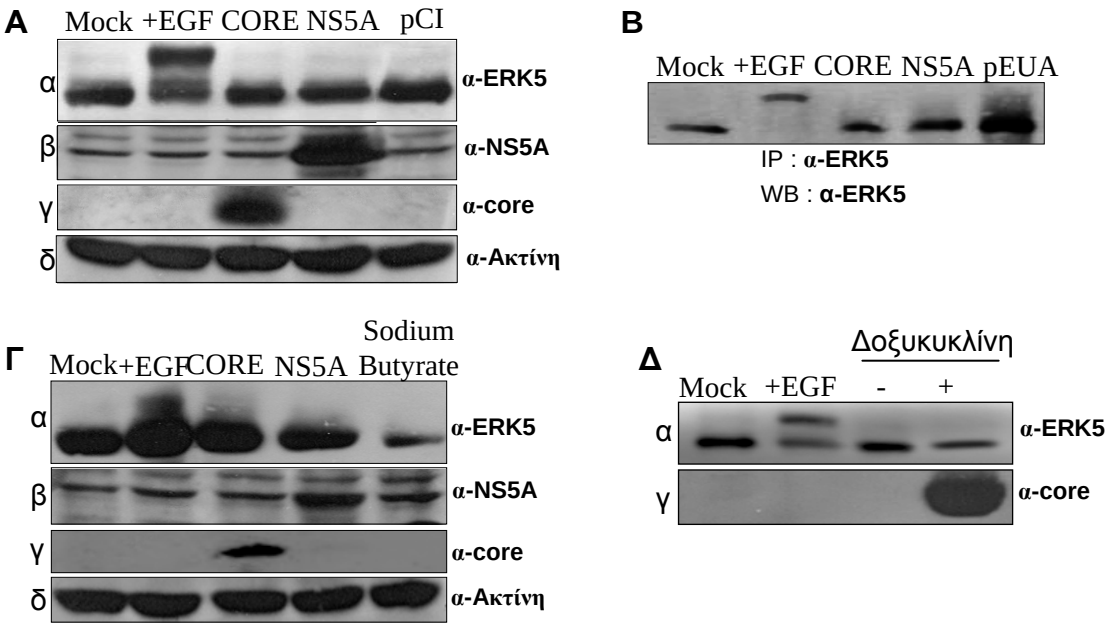
Τα εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα, και κυρίως αυτά που απευθύνονται στην φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, παρουσιάζουν διάφορα προβλήματα και δεν είναι ιδιαίτερα εκμεταλλεύσιμα. Στη παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά αντισώματα που αναγνωρίζουν την φωσφορυλιωμένη μορφή της ERK5 πρωτεΐνης, όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Έτσι, επιλέχτηκε μία άλλη μέθοδος για την ανίχνευση. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της ERK5, ως πιο μεγάλη, παρουσιάζει διαφορετική κινητική σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% από ότι η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της. Μετά από ανοσοαποτύπωση τύπου Western με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει όλες τις μορφές ERK5 πρωτεϊνών, παρουσιάζονται δύο ζώνες. Η πιο μεγάλη μορφή, είναι και αυτή που κινείται πιο αργά κατά τον διαχωρισμό και αντιστοιχεί στην πιο μεγάλη φωσφορυλιωμένη μορφή και η άλλη αποτελεί την μη φωφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης ERK5.

4.9. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ERK5 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Όταν ξεκίνησε η μελέτη του συγκεκριμένου μονοπατιού σηματοδότησης δεν υπήρχαν πολλές πληροφορίες για τα είδη των κυττάρων που ενδεχομένως να περιείχαν την ERK5 πρωτεΐνη. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν διάφορες κυτταρικές σειρές που υπήρχαν στο εργαστήριο και αποδείχτηκε πως σε όλες η πρωτεΐνη ERK5 ήταν υπαρκτή σε διαφορετικές όμως ποσότητες. Αποφασίστηκε να συνεχιστούν τα πειράματα κυρίως με τα κύτταρα ηπατικής προέλευσης HepG2.

Στη συνέχεια χρειάστηκε να βρεθεί ένας θετικός παράγοντας για την ενεργοποίηση του μονοπατιού στα HepG2 κύτταρα. Μέχρι εκείνη τη στιγμή στη βιβλιογραφία ήταν κατανοητό ότι ο θετικός μάρτυρας για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης ERK5 ήταν σε άμεση συνάρτηση με το είδος του κυττάρου που χρησιμοποιούνταν. Έτσι, δοκιμάστηκαν διάφορες ουσίες, όπως μεγάλες συγκεντρώσεις ορού (30%), ινσουλίνη (4.5mM) και ο αυξητικός παράγοντας EGF (50nM) (εικόνα 86-B). Όπως φαίνεται στην εικόνα 86, ο πιο αποτελεσματικός παράγοντας είναι ο EGF και για το λόγο αυτό επιλέχτηκε να χρησιμοποιείται στα πειράματα που ακολούθησαν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 87 : Μη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 από τις ιικές πρωτεΐνες core και NS5A.

Α : Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες core και NS5A, ή ένα μη συναφές πλασμίδιο (pCI).

Γ : Κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν για 48 ώρες με τους βακουλοϊούς Bac1488 (core), Bac8119 (NS5A) παρουσία βουτυρικού νατρίου.

Δ : Κυτταρικά εκχυλίσματα από την κυτταρική σειρά HepG2 που εκφράζει την core πρωτεΐνη, παρουσία (+) ή μη (-) δοξυκυκλίνης.

Τα πειράματα εκτελέστηκαν με ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στην ERK5 (α) (110kDa), NS5A (β) (58kDa), core (γ) (21kDa) και ακτίνη (δ) (40kDa).

Β : Κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων HepG2 επιμολυσμένων με πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες core και NS5A, ή ένα μη συναφές πλασμίδιο (pEUA) υπέστησαν ανοσοκατακρήμνιση (IP) με το αντίσωμα ERK5 και ανοσοστύπωση τύπου Western με το αντίσωμα ERK5.

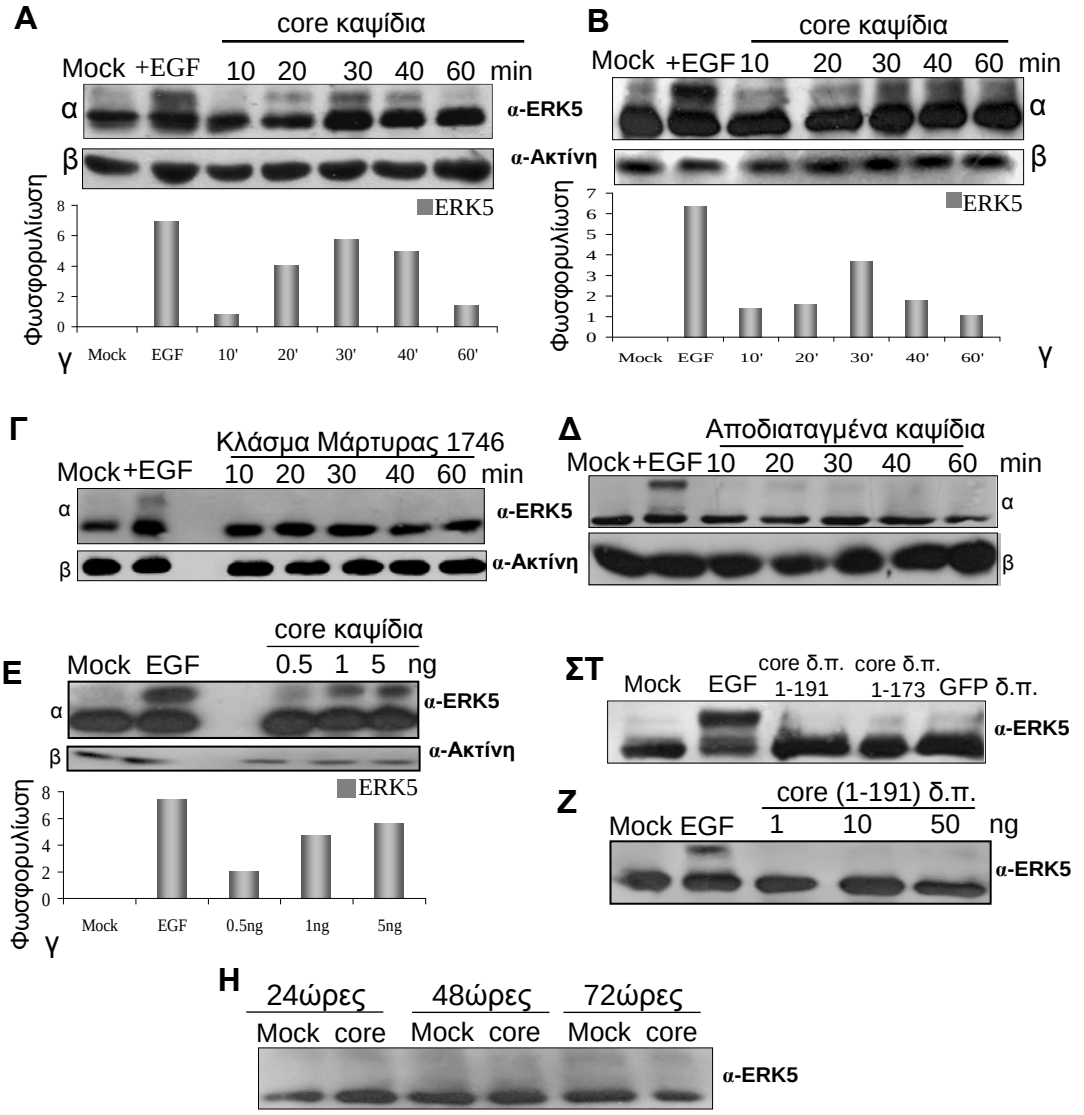
4.10. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ CORE ΚΑΙ NS5A

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω το μονοπάτι σηματοδότησης ERK5 εμφανίζεται ενεργοποιημένο σε αρκετά είδη καρκίνων (144). Επιπλέον, διάφορες πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας C εμπλέκονται στη δημιουργία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (1), μέχρι στιγμής όμως δεν υπάρχει καμία μελέτη πάνω στο συγκεκριμένο μονοπάτι που να αφορά στον ιό της ηπατίτιδας C. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίστηκε να μελετηθεί η πιθανότητα ενεργοποίησης του μονοπατιού από τις δύο πιο μελετημένες πρωτεΐνες, για την επιρροή τους σε διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, τις core και NS5A.

Κύτταρα HepG2 επιμολυσμένα με πλασμίδια που εκφράζουν είτε την πρωτεΐνη core είτε την NS5A, διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6%, και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις πρωτεΐνες ERK5, core, NS5A και ακτίνη. Όπως παρατηρείται στην εικόνα 87, δεν εμφανίζεται η επιπλέον χαρακτηριστική ζώνη που αντιστοιχεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης. Για να επιβεβαιωθεί το φαινόμενο επιμολυσμένα όπως και πριν εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων υπέστησαν ανοσοκατακρήμνιση με το αντίσωμα της πρωτεΐνης ERK5 και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με το ίδιο αντίσωμα. Τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα (εικόνα 87-Β).

Στη συνέχεια, κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με τους βακουλοϊούς Bac1488 (που εκφράζει την πρωτεΐνη core υπό CMV προαγωγέα) και Bac8119 (που εκφράζει την NS5A υπό CMV προαγωγέα), και ελέγχθηκαν για ενεργοποιημένη ERK5 πρωτεΐνη. Για ακόμη μία φορά, δεν παρουσιάστηκε φωσφορυλίωση στην πρωτεΐνη ERK5 (εικόνα 87-Γ). Τέλος, αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και η σταθερά επαγόμενη κυτταρική σειρά HepG2 η οποία εκφράζει την πρωτεΐνη core. Όπως φαίνεται δεν παρουσιάζεται φωσφορυλίωση στην πρωτεΐνη ERK5 (εικόνα 87-Δ). Συνεπώς οι πρωτεΐνες core και NS5A δεν φαίνεται να ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης ERK5.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 88 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 από τα core καψίδια σε HepG2 (A) και Huh7 (B) κύτταρα.

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν το κλάσμα ιδίας πυκνότητας του βακουλοϊού 1746 (Γ) και αποδιαταγμένα καψίδια (Δ). Το φαινόμενο αυτό είναι δοσοεξάρτώμενο (Ε), ενώ διαλυτές πρωτεΐνες core (1-191), core (1-173) και GFP (ΣΤ), ακόμα και σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις (Ζ) δεν ενεργοποιούν το μονοπάτι. Επιπλέον, εκτελέστηκε επώαση κυττάρων με core καψίδια για 24, 48 και 72 ώρες (Η).

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με αντισώματα ERK5 (α) και ακτίνη (β) (110 και 40kDa αντίστοιχα). Ποσοτικοποίηση και κανονικοποίηση έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Quantity One 4.4.1 (γ).

4.11. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ERK5 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΑ CORE ΚΑΨΙΔΙΑ

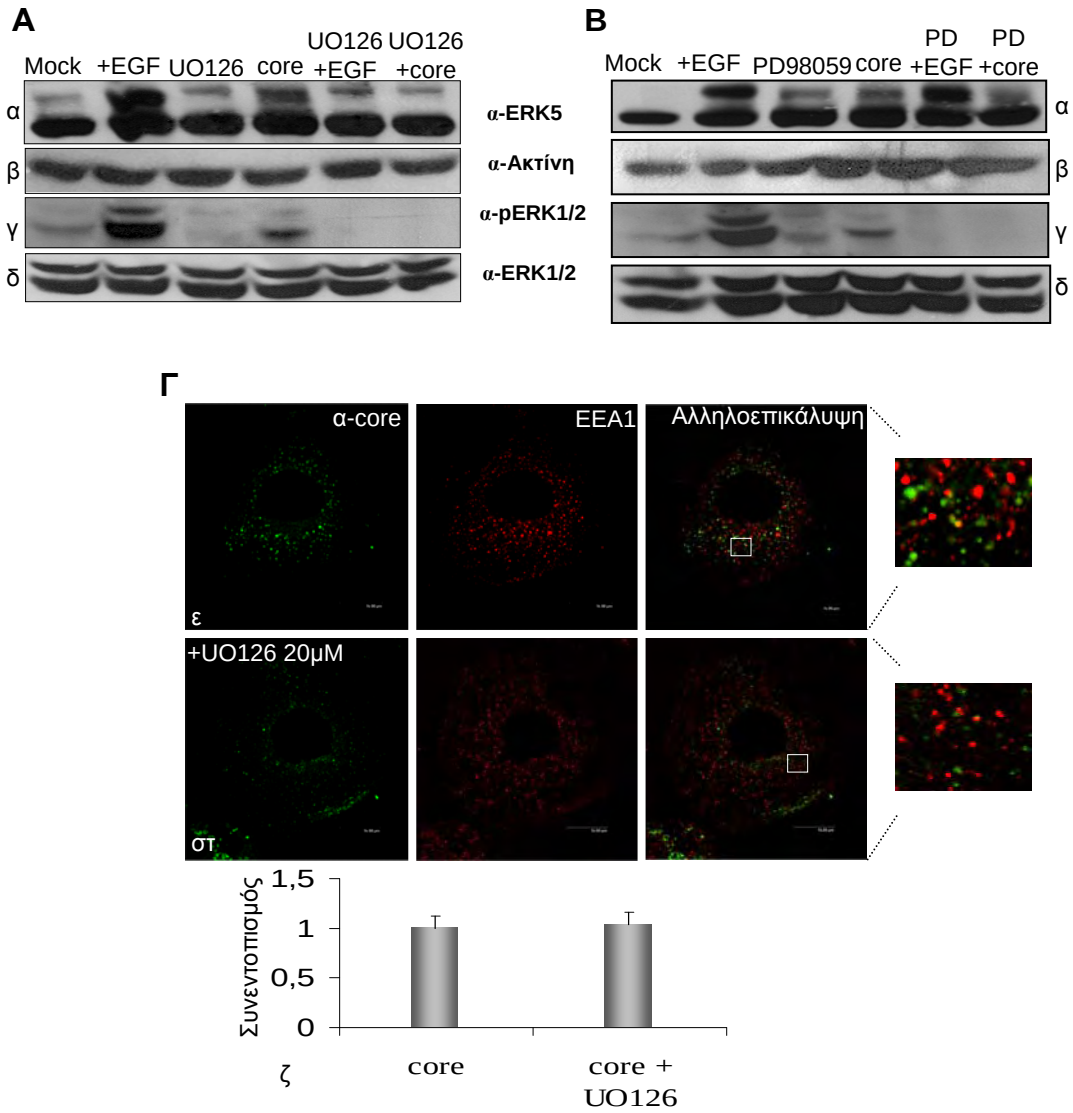
Στη συνέχεια, επιλέχτηκε να ελεγχθεί αν τα core καψίδια επηρεάζουν το μονοπάτι σηματοδότησης ERK5, εφόσον ήταν γνωστό ότι επηρεάζουν το $ERK_{1/2}$ μονοπάτι. Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με core καψίδια και τα κυτταρικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6%. Στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση ERK5 αντισώματος. Η πρωτεΐνη ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας αναφοράς. Όπως φαίνεται στην εικόνα 88-A, τα καψίδια προκαλούν φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK5 μετά από 30 λεπτά επώασης. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την εκτέλεση του ιδίου πειράματος σε κύτταρα Huh7 (εικόνα 88-B), καθώς και στα νευρικά κύτταρα SK-S-NH (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Για να διαπιστωθεί αν είναι πράγματι τα καψίδια που προκαλούν τη συγκεκριμένη ενεργοποίηση, προκλήθηκε αποδιάταξη τους με βρασμό για 1 ώρα. Όπως φαίνεται στην εικόνα δεν παρουσιάζεται καμία ενεργοποίηση του μονοπατιού. Επιπλέον, η χρήση του κλάσματος αντίστοιχης πυκνότητας σακχαρόζης που προέρχεται από τη μόλυνση κυττάρων με το βακουλοϊό Bac1746, δεν έδωσε καμία φωσφορυλίωση της ERK5 πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν το φαινόμενο είναι δοσοεξαρτώμενο. Για αυτό το λόγο αυξανόμενες συγκεντρώσεις καψιδίων προστέθηκαν σε κύτταρα HepG2 για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτελέστηκε το πείραμα ακριβώς όπως και πριν. Όπως φαίνεται στην εικόνα 88-E η φωσφορυλίωση αυξάνει όσο αυξάνει και η συγκέντρωση καψιδίων στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων.

Επίσης, αποφασίστηκε να ελεγχθεί αν είναι η καψιδιακή μορφή που είναι υπεύθυνη για το συγκεκριμένο φαινόμενο ή η πρωτεΐνη core. Για το λόγο αυτό κύτταρα επωάστηκαν με 5ng core (1-191), core (1-173) και GFP διαλυτών πρωτεϊνών βακτηριακής προέλευσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 88-Z και είναι εμφανές ότι δεν υπάρχει ενεργοποίηση του μονοπατιού. Για να επιβεβαιωθεί το φαινόμενο χρησιμοποιήθηκαν ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης core (1-191), και για μία ακόμη φορά δεν παρουσιάστηκε φωσφορυλίωση της ERK5 πρωτεΐνης. Συνεπώς η καψιδιακή δομή και ενδεχομένως η ενδοκύτωση είναι αυτή που ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης ERK5 μετά από 30 λεπτά επώασης και όχι η πρωτεΐνη *per se*.

Έχει ήδη αποδειχτεί σε προηγούμενες παραγράφους ότι τα core καψίδια είναι ικανά να προκαλέσουν παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί πως ο TGFβ αυξητικός παράγοντας προκαλεί παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 σε ηπατικά κύτταρα (151). Για να μελετηθεί αν τα καψίδια μπορούν να επηρεάσουν το συγκεκριμένο μονοπάτι με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 89 : Ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης ERK5 γίνεται μέσω της MEK5 πρωτεΐνης.

Α και Β : Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με το χημικό αναστολέα UO126 (20μM-3 ώρες) (Α) και PD98059 (70μM-3 ώρες) (Β) παρουσία ή όχι EGF και core καψιδίων. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση τύπου Western με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στις ERK5 (α) (110kDa), Ακτίνη (β) (40kDa), και τις φωσφορυλιωμένες (γ) ή μη (δ) μορφές των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (42 και 44 kDa).

Γ : Κύτταρα Huh7 επωάστηκαν για 3 ώρες με 20μM UO126 (στ), και προστέθηκαν core καψίδια για 30 λεπτά. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με core (πράσινο) και EEA1 (κόκκινο) αντισώματα, και ελέγχθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Οπτικές τομές από 2 ανεξάρτητα πειράματα μετρήθηκαν για το συνεντοπισμό core/EEA1 με το λογισμικό Image-Pro Plus (ζ).

παρατεταμένο τρόπο, κύτταρα HepG2 επωάστηκαν για 24, 48 και 72 ώρες με τα core καψίδια και μελετήθηκαν όπως προηγουμένως για φωσφορυλιωμένη ERK5 πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 88-Η και όπως φαίνεται το μονοπάτι δεν είναι παρατεταμένα ενεργοποιημένο.

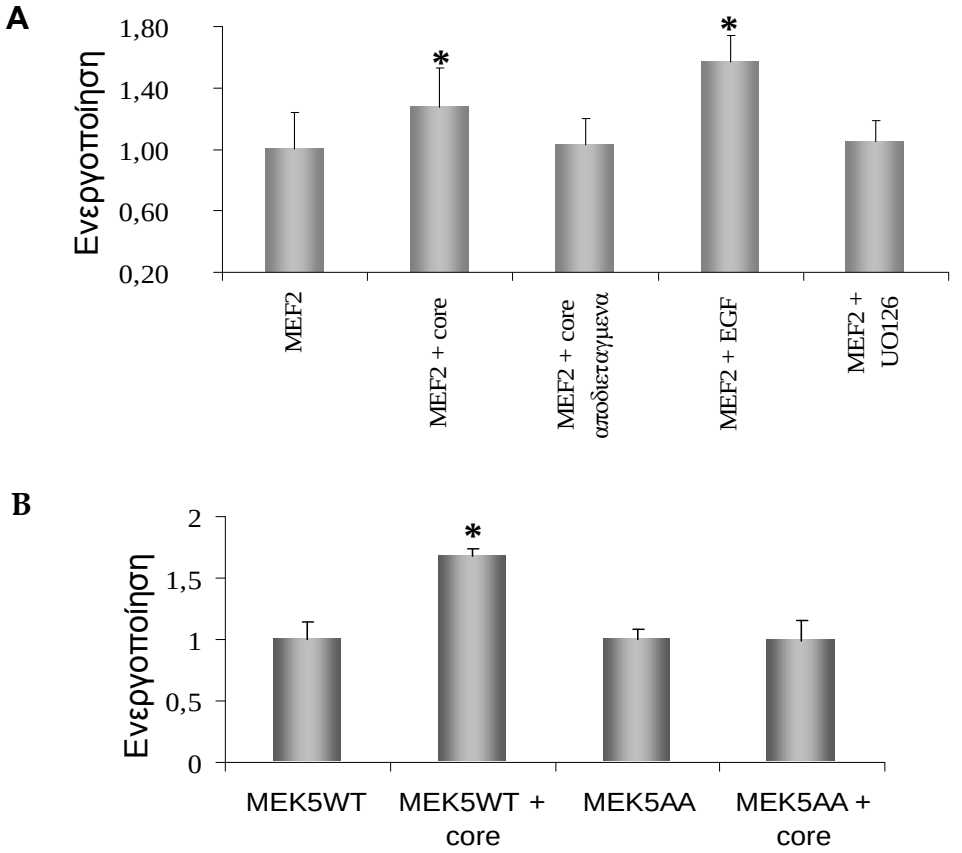
4.12. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ERK5 ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ MEK5

Ο καλύτερος τρόπος για να μελετηθεί ένα μονοπάτι σηματοδότησης είναι να χρησιμοποιηθούν διάφοροι χημικοί αναστολείς που να εμποδίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες του μονοπατιού, όπως άλλωστε έγινε και στην περίπτωση του $ERK_{1/2}$. Δυστυχώς μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποιος ειδικός αναστολέας για το ERK5 μονοπάτι. Κάποιοι χρησιμοποιούν τους χημικούς αναστολείς των πρωτεϊνών $MEK_{1/2}$ στηριζόμενοι στην μεγάλη ομοιότητα των πρωτεϊνών αυτών με την πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνει την ERK5, την πρωτεΐνη MEK5 (240). Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά και φαίνονται να εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δοκιμάστηκαν αρχικά οι συνθήκες των χημικών αναστολέων που χρησιμοποιούνταν για παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ (UO126 : 1μM-1.5 ώρες, PD98059 5μM-1.5 ώρες). Εντούτοις, ποτέ δεν παρατηρήθηκε μείωση της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού από τον αυξητικό παράγοντα EGF (αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται). Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες και τελικά αποδείχτηκε πως ο χημικός αναστολέας UO126 μπορεί να εμποδίσει τη φωσφορυλίωση του ERK5, όταν χρησιμοποιηθεί για 3 ώρες σε συγκέντρωση 20μM πριν την προσθήκη των καψιδίων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 89, εκτός από την μείωση της φωσφορυλίωσης του ERK5 που προκαλείται από τον EGF παράγοντα, παρατηρείται και μείωση στην αντίστοιχη που προκαλείται από τα core καψίδια, υποδηλώνοντας πως η φωσφορυλίωση δημιουργείται από την πρωτεΐνη MEK5 (εικόνα 89).

Σε αντίθεση με τον UO126 χημικό αναστολέα, ο PD98059 παρόλο που χρησιμοποιήθηκε σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις και αυξήθηκε ο χρόνος επώασης του πριν την προσθήκη καψιδίων, δεν κατάφερε να εμποδίσει την φωσφορυλίωση του μονοπατιού σηματοδότησης ακόμα και σε πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης $ERK_{1/2}$ όπως φαίνεται στην εικόνα 89-Β μειώνεται σημαντικά, επισημαίνοντας ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι λειτουργικός. Η διαφορά αυτή ίσως να οφείλεται στον τρόπο λειτουργίας του αναστολέα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε αν η μείωση που παρατηρείται στην ενεργοποίηση του μονοπατιού παρουσία του αναστολέα UO126 οφείλεται στη δράση του, ή στην μειωμένη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 90 : Ενεργοποίηση του γονιδίου *mef2* από τα core καψίδια.

A : Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο MEF2A-luc για 24 ώρες, ακολούθησε 12ωρη στέρηση ορού και προστέθηκαν core καψίδια για 18 ώρες. Μετρήθηκε η φωταύγεια και ομαλοποιήθηκε με την ολική πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (*:P‹0.05).

B : Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο MEF2A-luc και τα πλασμίδια MEK5WT ή MEK5AA για 24 ώρες. Ακολούθησε 12ωρη στέρηση ορού και προστέθηκαν core καψίδια για 18 ώρες. Μετρήθηκε η φωταύγεια και ομαλοποιήθηκε με την ολική πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά (*:P‹0.05).

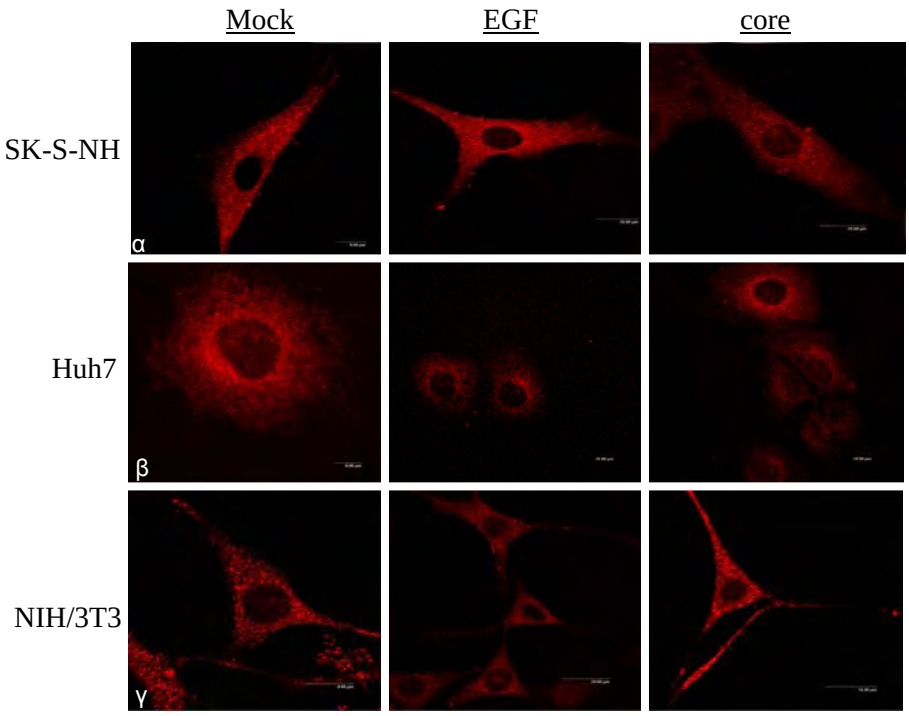
είσοδο των καψιδίων. Έχει ήδη αποδειχτεί πως ο συγκεκριμένος χημικός αναστολέας σε συγκέντρωση 1μΜ δεν επηρεάζει την είσοδο των καψιδίων στα κύτταρα. Επειδή όμως χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις μελετήθηκε αν υπάρχει κάποια μείωση στην είσοδο. Όπως φαίνεται στην εικόνα 89-Γ και Δ, τα καψίδια εισέρχονται στα κύτταρα παρά την ύπαρξη του αναστολέα.

4.13. ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *MEF2*

Υπάρχουν διάφορες μελέτες που περιγράφουν καθοδικούς στόχους για το μονοπάτι σηματοδότησης ERK5 όπως τα *c-fos*, *Fra-1* και *c-jun* (241,242). Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα παραμένουν αντιφατικά και πιθανότατα να εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου (243). Ο μόνος καθοδικός στόχος του συγκεκριμένου μονοπατιού που φαίνεται να επηρεάζεται σταθερά σε διάφορες κυτταρικές σειρές είναι το γονίδιο *mef2* (Myocyte Enhancer Factor-2) (151-153). Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να μελετηθεί η πιθανή ενεργοποίηση του από τα core καψίδια. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο MEF2A-luc, το οποίο περιείχε το προαγωγέα του γονιδίου σε σύζευξη με την πρωτεΐνη λουσιφεράση (luciferase). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα υπέστησαν 12ωρη στέρηση ορού, και προστέθηκαν καψίδια για 18 ώρες. Ακολούθησε λύση των κύτταρων και μετρήθηκε η φωταύγεια, η οποία ομαλοποιήθηκε με τις μετρήσεις των ολικών πρωτεϊνών. Στην εικόνα 90, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα και όπως είναι εμφανές η προσθήκη καψιδίων προκαλεί την αύξηση ενεργότητας της πρωτεΐνης λουσιφεράσης, επομένως ο συγκεκριμένος προαγωγέας χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό.

Η χρήση του αναστολέα UO126 (20μΜ), που όπως αποδείχτηκε πριν παρεμποδίζει τη λειτουργία της πρωτεΐνης MEK5 παρουσία των καψιδίων, φαίνεται να εμποδίζει και τη μεταγραφή του γονιδίου. Επιπλέον, έγιναν πειράματα συνεπιμόλυνσης όπου χρησιμοποιήθηκαν μαζί με το προηγούμενο πλασμίδιο και τα πλασμίδια MEK5, και MEK5AA. Τα συγκεκριμένα πλασμίδια έχουν κατασκευασθεί για να παράγουν είτε την πρωτεΐνη MEK5, είτε μία γνωστή μετάλλαξη της. Το πλασμίδιο MEK5AA παρουσιάζει μεταλλάξεις στα κατάλοιπα σερίνη 311 και θρεονίνη 315 με αποτέλεσμα να εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης και επομένως και της ERK5 πρωτεΐνης. Όπως είναι εμφανές στην εικόνα 90-Β, παρουσιάζεται σημαντική μείωση της ενεργοποίησης του *mef2* γονιδίου παρουσία της πρωτεΐνης MEK5AA και των core καψιδίων, που επιβεβαιώνει ότι η πρωτεΐνη MEK5 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του ERK5.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212



Εικόνα 91 : Έλλειψη πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης ERK5.

Κύτταρα SK-S-NH (α), Huh7 (β) και NIH/3T3 (γ) επωάστηκαν είτε με EGF (10 λεπτά) είτε με core καψίδια (30 λεπτά), μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με αντίσωμα ERK5 και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο.

4.14. ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ERK5

Η πρωτεΐνη ERK5, ως μέλος της οικογένειας των MAPκινασών, πιθανότατα να μετατοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων για να ενεργοποιήσει τους καθοδικούς της στόχους. Άλλωστε, περιέχει στοιχεία NLS (Nuclear Localisation Signal) και NES (Nuclear Export Signal). Παρόλα αυτά υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι η πρωτεΐνη πράγματι παρουσιάζει πυρηνικό εντοπισμό όταν είναι ενεργοποιημένη και άλλες που υποστηρίζουν το ακριβώς αντίθετο (143,145-147). Για να μελετηθεί το φαινόμενο που ισχύει κατά την προσθήκη core καψιδίων χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά είδη κυττάρων τα οποία μετά από στέρηση ορού, επωάστηκαν είτε με τον αυξητικό παράγοντα EGF είτε με core καψίδια, μονιμοποιήθηκαν και ελέγχθηκε με ανοσοφθορισμό ο κυτταρικός εντοπισμός της πρωτεΐνης ERK5. Όπως φαίνεται στην εικόνα 91, σε όλα τα είδη κυττάρων που επωάστηκαν τόσο με το θετικό μάρτυρα όσο και τα core καψίδια δεν κατέστη δυνατός ο πυρηνικός εντοπισμός. Στην αρχή θεωρήθηκε ότι πιθανά το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε να μην είναι κατάλληλο για πειράματα αυτού του τύπου. Όμως τόσο η εταιρία όσο και κάποιες από τις μελέτες χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο αντίσωμα και παρατηρούν πυρηνικό εντοπισμό (146,147). Συνεπώς, πιθανότατα ο πυρηνικός εντοπισμός είναι κυτταροεξαρτώμενος. Στα είδη κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζεται πυρηνικός εντοπισμός της ERK5 πρωτεΐνης και επομένως η ενεργοποίηση του *mef2* γονιδίου, γίνεται έμμεσα, με τη βοήθεια άλλων πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά περαιτέρω ανάλυση με πιο εξειδικευμένα πειράματα είναι αναγκαία για την επιβεβαίωση αυτού του αποτελέσματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ :

Τα core καψίδια μπορούν να ενεργοποιούν τα $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ και MEK5-ERK5 μονοπάτια σηματοδότησης μετά από 30 λεπτά επώασης. Η ενεργοποίηση εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση όσο και από την δομή των καψιδίων. Στην περίπτωση του $ERK_{1/2}$, η ενδοκύτωση φαίνεται να προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού ενώ οι πρωτεΐνες $ERK_{1/2}$ μεταφέρονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν τα γονίδια πρώιμης απόκρισης c-fos και egr-1. Η ERK5 πρωτεΐνη πιθανότατα δεν μεταφέρεται στον πυρήνα αλλά παρόλα αυτά ενεργοποιεί το καθοδικό στόχο mef2 προφανώς μέσω άλλων πρωτεϊνών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΚΑΨΙΔΙΩΝ HCV ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΜΕ Η ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Παρατηρήσεις που έχουν γίνει στο παρελθόν έχουν δείξει ότι στον ορό ασθενών κυκλοφορούν νουκλεοκαψίδια χωρίς τον λιπιδικό φάκελο που κανονικά διαθέτει ο ιός της ηπατίτιδας C (55-58). Παρόλα αυτά, πολύ λίγα είναι γνωστά για την φύση, την προέλευση και τις ιδιότητες αυτών των γυμνών καψιδίων. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά σχετικά με την ιδιότητα των συγκεκριμένων καψιδίων να προσδένονται, να εισέρχονται στα κύτταρα μέσω ενδοκύτωσης και να επηρεάζουν σηματοδοτικά μονοπάτια. Η βιολογική σημασία του φαινομένου αυτού παραμένει ασαφής, καθώς προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν τα καψίδια χωρίς φάκελο που υπάρχουν στον ορό των ασθενών μπορούν να είναι μολυσματικά. Επιπλέον, είναι κοινά αποδεκτό πως σε πολλούς ασθενείς υπάρχουν γονιδιώματα με ελλείψεις στην περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνες του φακέλου (244-246) ικανά να εσωκλείονται σε καψίδια (247).

Στην παρούσα εργασία κατασκευάσθηκαν καψίδια ελλείψει των δομικών πρωτεϊνών E1 και E2, με ή χωρίς την ιδιότητα του φθορισμού. Για την παραγωγή των συγκεκριμένων καψιδίων, χρησιμοποιήθηκε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης βασιζόμενο στον βακουλοϊό. Αυτό το σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή ανασυνδυασμένων ιικών σωματιδίων τόσο για τον ιό της ηπατίτιδας C όσο και για άλλους ιούς (με ή χωρίς φάκελο) (202,248-254), καθώς η έλλειψη μέχρι πρόσφατα, ενός συστήματος κυτταροκαλλιέργειας που να επιτρέπει ικανοποιητική αναπαραγωγή του ιού εμπόδιζε την μελέτη κάποιων σταδίων του κύκλου ζωής του (π.χ. την είσοδο του ιού στα κύτταρα, την συγκρότηση ιικών σωματίδιων, καθώς και την απελευθέρωσή τους). Για τον φθορισμό των καψιδίων χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή φθοριζόντων καψιδίων και άλλων ιών όπως παρβοϊών (parvovirus), ροταϊών (rotavirus), ερπητοϊών (Herpes simplex virus type 1–HSV-1), του ιού της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου (Human immunodeficiency virus-HIV) και του ιού 40 των πιθηκοειδών (SV40) (255-262).

Οι βακουλοϊοί που κατασκευάσθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση κυττάρων εντόμων, και την απομόνωση καψιδίων χωρίς φάκελο από τα κυτταρικά τους εκχυλίσματα που υπερφυγοκεντρήθηκαν και κλασματοποιήθηκαν σε κλίση σακχαρόζης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν υποδεικνύουν πως η σύζευξη της πρωτεΐνης GFP με την πρωτεΐνη core, είτε στο αμινοτελικό είτε στο καρβοξυτελικό της άκρο, δεν επηρεάζει την δημιουργία καψιδίων. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί η παρουσία μικρότερων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

προϊόντων που απομονώθηκαν μετά την κλασματοποίηση. Η ύπαρξη των προϊόντων αυτών πιθανά να οφείλεται σε κάποιο είδος πρωτεόλυσης (εξαιρουμένης της πρωτεόλυσης από κυστεϊκές και ασπαρτικές πρωτεάσες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία), ή από κάποιο εναλλακτικό μηχανισμό έναρξης της μετάφρασης. Άλλωστε, η ύπαρξη τέτοιου μηχανισμού για την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης core προτάθηκε πρόσφατα από τους Eng και συνεργάτες. Η συγκεκριμένη ομάδα προτείνει την έναρξη της μετάφρασης στην συγκεκριμένη περιοχή από διάφορα εσωτερικά κωδικόνια έναρξης και τη δημιουργία μια ομάδας πρωτεϊνών μεγέθους από 8 έως 14 kDa, που ονομάστηκαν mini-core πρωτεΐνες (43). Σε αυτή την εκδοχή συνηγορεί και το γεγονός ότι η πρωτεΐνη core παρουσιάζει μια αμινοτελική περιοχή χωρίς ιδιαίτερη δομή (29). Πρέπει επίσης να σημειωθεί πως η ύπαρξη πρόσθετων μορφών κατά τη διάρκεια απομόνωσης καψιδίων έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιούς όπως ο ιός του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (Severe Acute Respiratory Syndrome-SARS) (263). Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθεί στο άμεσο μέλλον η απομόνωση αυτών των μορφών και η πιθανή καψιδιακή τους μορφή.

Τα καψίδια που κατασκευάσθηκαν μελετήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δοκιμασίες δυναμικής σκέδασης φωτός, μικροσκοπία ατομικής δύναμης καθώς και συνεστιακού μικροσκοπίου και το μέγεθος τους προσδιορίστηκε μεταξύ 30 και 55nm (πυκνότητα σακχαρόζης 1.2g/cm^3 - 1.3g/cm^3). Καψίδια προερχόμενα από ορό ασθενών έχουν απομονωθεί σε πυκνότητες χλωριούχου κεσίου 1.35g/cm^3 και σακχαρόζης 1.23-1.27g/cm^3, πυκνότητες αντίστοιχες με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (56,184,264).

Η δημιουργία φθοριζόντων καψιδίων αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη διαφόρων σταδίων της ιικής μόλυνσης. Για να αποδειχτεί πως τα core καψίδια του ιού της ηπατίτιδας C σε σύζευξη με την GFP πρωτεΐνη (φθορίζοντα καψίδια) που κατασκευάσθηκαν ήταν λειτουργικά, μελετήθηκαν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα core καψίδια. Αρχικά διερευνήθηκε η δυνατότητα προσδεσης και εισόδου τους σε διάφορες κυτταρικές σειρές και αποδείχτηκε ότι τα καψίδια πράγματι προσδένονται και εισέρχονται στα κύτταρα σε θερμοκρασία 37°C, ενώ παρουσιάζουν εντοπισμό πλησίον των μικροϊνιδίων ακτίνης, στην περι-πυρηνική περιοχή. Επιπλέον, το γεγονός ότι έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων (όχι όμως όλων) ίσως να μπορούσε στο μέλλον να επιτρέψει την διερεύνηση πιθανών υποδοχέων. Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα απεικονιστικής μικροσκοπίας σε ζωντανά κύτταρα, τα οποία απέδειξαν για πρώτη φορά την ικανότητα τους όχι μόνο να προσδένονται αλλά και να μετακινούνται στο εσωτερικό των κυττάρων, αποδεικνύοντας έτσι την χρηστικότητα τους στη μελέτη τόσο του μηχανισμού εισόδου τους όσο και πιθανά αρκετών άλλων λειτουργιών. Τέλος, αποδείχτηκε πως τα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

καψίδια που διαθέτουν συζευγμένη την GFP πρωτείνη επηρεάζουν τον εντοπισμό της ERF πρωτεΐνης όπως ακριβώς και τα core καψίδια (200,201).

Αν και έχει αναφερθεί η χρήση και άλλων συστημάτων για τη μελέτη της αυτοσυγκρότησης της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας C (32,222,265-267), το σύστημα που περιγράφηκε στη συγκεκριμένη εργασία επιτρέπει την απομόνωση, σε ικανοποιητικές ποσότητες, λειτουργικών καψιδίων με την ιδιότητα ή όχι του φθορισμού σε ένα εύχρηστο σύστημα έκφρασης. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά το καθιστούν χρήσιμο για πιθανές εφαρμογές που ποικίλουν από βασικές μελέτες ιολογίας έως και εφαρμογές στην βιοϊατρική. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί πως τα γυμνά καψίδια αποτελούν χαρακτηριστικό και άλλων ιών και έχουν συνδυαστεί με την παρατεταμένη ή/και χρόνια μόλυνση (264,268-270) και συνεπώς η διερεύνηση των ιδιοτήτων τους σε συνδυασμό με την *in vivo* ύπαρξή τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΙΣΟΔΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ HCV ΚΑΨΙΔΙΩΝ ΧΩΡΙΣ ΦΑΚΕΛΟ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης αποτελεί τον συνηθισμένο μηχανισμό εισόδου που χρησιμοποιούν τα μέλη της οικογένειας των φλαβιιών για την είσοδο τους στα κύτταρα στόχους. Γνωστά παραδείγματα αποτελούν ο ιός του δυτικού Νείλου (West Nile virus) (104), ο ιός του δάγγειου πυρετού(dengue virus) (102), ο ιός της ιογενούς διάρροιας των βοοειδών (Bovine Viral Diarrhea Virus) (103) και ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) (105-109). Παρόλα αυτά ο συγκεκριμένος μηχανισμός χρησιμοποιείται και από ιούς χωρίς φάκελο, όπως είναι ο πολυομαϊός JC (polyomavirus JC) (231), ο ανθρώπινος ρινοϊός τύπου 2 (human rhinovirus type 2) (229,230) και τέλος από τα core καψίδια του ιού της ηπατίτιδας B (HBV) (92).

Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε ότι τα ανασυνδυασμένα καψίδια χωρίς φάκελο εισέρχονται με ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης (clathrin), γεγονός που επιβεβαιώνεται από τον συνεντοπισμό τους με την τρανσφερρίνη (transferrin), πρωτεΐνη μάρτυρα για το συγκεκριμένο μηχανισμό εισόδου. Επιπλέον, η χρήση σακχαρόζης, γνωστού αναστολέα της ενδοκύτωσης μέσω κλαθρίνης, προκάλεσε τη μείωση της εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα. Πρέπει να παρατηρήσουμε όμως ότι ο συνεντοπισμός δεν ήταν ολοκληρωτικός, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα ύπαρξης εναλλακτικού μηχανισμού εισόδου.

Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η συμμετοχή της καβεολίνης (caveolin), πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (caveolin), έστω και αν τα κύτταρα ηπατικής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν για τα συγκεκριμένα πειράματα (Huh7) παράγουν πολύ μικρές ποσότητες της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (76). Η ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης όμως είναι γνωστό πως προκαλεί το σχηματισμό καβεοσωμάτων (caveosomes) που λειτουργούν ακριβώς όπως και αυτά που υπάρχουν σε άλλες κυτταρικές σειρές (76). Τα καψίδια (φθορίζοντα ή μη) δεν παρουσίασαν κανέναν συνεντοπισμό με την πρωτεΐνη καβεολίνη. Επιπλέον, η χρήση οκαδαϊκού οξέος (okadaic acid), ενός γενικού αναστολέα φωσφατασών τύπου σερίνης/θρεονίνης που επιπροσθέτως έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει την ενδοκύτωση μέσω καβεολίνης (271,272), δεν προκάλεσε αύξηση της εισόδου των καψιδίων στα κύτταρα, υποδηλώνοντας πως η συγκεκριμένη μέθοδος εισόδου δεν χρησιμοποιείται από τα καψίδια τουλάχιστον στα συγκεκριμένα κύτταρα. Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι σε κύτταρα που περιέχουν καβεολίνη και που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (HepG2) δεν παρουσιάστηκαν 'χρονικές διαφορές' κατά την είσοδο των core καψιδίων, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα και ενισχύει την θεωρία πως η ενδοκύτωση πιθανότατα να εκτελείται μέσω κλαθρίνης. Παρόλα αυτά χρειάζεται πρόσθετη πειραματική διερεύνηση για να αποκλειστούν άλλοι μηχανισμοί εισόδου που θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται.

Μετά το πέρασμα των καψιδίων από κυστίδια που περιέχουν κλαθρίνη, καταλήγουν στα πρώιμα ενδοσώματα, όπως υποδηλώνεται από τον συνεντοπισμό τους με τις πρωτεΐνες EEA1 και Rab5. Αυτό συμβαίνει μετά από 9 έως 15 λεπτά επώασης, χρόνου απαραίτητου που έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιούς όπως στον ιό του δάγγειου πυρετού(dengue virus), τον ιό της ποδοστοματικής νόσου (Foot-and-Mouth Disease Virus-FMDV) και τον ιό σεμλίκι (Semliki Forest virus) (102,189,218). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η πρωτεΐνη core, από την οποία έχουν συγκροτηθεί τα core καψίδια, περιέχει το μοτίβο YXXL και δι-λευκινών σε κοντινή απόσταση που αποτελούν χαρακτηριστική αλληλουχία πρωτεϊνών που ενδοκυταρώνονται (273). Θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί μελλοντικά η κατασκευή καψιδίων ελλείψει του συγκεκριμένου μοτίβου και να μελετηθεί η δυνατότητα ενδοκύτωσης τους.

Η ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης συνδυάζεται με χαμηλό pH στο εσωτερικό των πρωίμων ενδοσωμάτων. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις ειδικοί χημικοί αναστολείς (χλωροκίνη (chloroquine), μπαφιλομυσίνη A (bafilomysin A) και χλωριούχο αμμώνιο) ικανοί να εμποδίζουν την όξυνση στο εσωτερικό των πρώιμων ενδοσωμάτων. Η χρήση τους προκάλεσε την παρεμπόδιση των καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα ακόμα και μετά από μία ώρα επώασης, υποδηλώνοντας πως το pH είναι σημαντικό για την μετακίνηση των καψιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και σε έναν συγγενικό ιό της ηπατίτιδας C, τον ιό της ηπατίτιδας B (92), όπως επίσης και σε ιούς χωρίς

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

φάκελο όπου το χαμηλό pH συντελεί είτε στην δομική αλλαγή πρωτεϊνών του καψιδίου, είτε στην διάλυση του συμπλόκου καψιδίου/υποδοχέα (93,112,230).

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκαν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι στην μετακίνηση των core καψιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων εμπλέκονται γνωστές υδρολάσες που βρίσκονται στα πρώιμα ενδοσώματα, και συγκεκριμένα οι καθεψίνες B και L. Πρόκειται για πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από το χαμηλό pH και είναι ιδιαίτερα ενεργές σε περιπτώσεις καρκίνων (89). Η εμπλοκή τους αποδείχτηκε με την χρήση των ειδικών χημικών αναστολέων E64 και πεπστατίνη A (pepstatin A), και επιβεβαιώθηκε με έναν άλλο αναστολέα την χλωροκίνη (chloroquine) που ουσιαστικά διατηρεί υψηλό το pH στα ενδοσώματα εμποδίζοντας έτσι τη σωστή λειτουργία των συγκεκριμένων ενζύμων (90). Οι καθεψίνες B και L, έχουν αποδειχτεί απαραίτητες κατά την διάρκεια της μόλυνσης και άλλων ιών που προκαλούν ηπατίτιδα, όπως ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV), αλλά και ιών χωρίς φάκελο (91-93). Παρόλα αυτά είναι αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση για τον πιθανό ρόλο τους στην μετακίνηση των core καψιδίων.

Τα πρώιμα ενδοσώματα περιέχουν πρωτεΐνες απαραίτητες για η σωστή τους λειτουργία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μία μικρή GTPάση η πρωτεΐνη Rab5 (70,82,83), η οποία παρατηρήθηκε ότι εμπλέκεται στην διαδικασία εισόδου των core καψιδίων, καθώς διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές της συγκεκριμένης πρωτεΐνης επηρεάζουν το ρυθμό εισόδου των καψίδιων. Αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας B (HBV) αλλά και στον αδενοϊό (92,220). Θα πρέπει επίσης να τονιστεί πως η ενεργοποιημένη Rab5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στην αντιγραφή του γονιδιώματος του ιού (274).

Στην είσοδο των core καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα φαίνεται να εμπλέκεται και η πρωτεΐνη p38, μέλος της οικογένειας των MAPκινασών, καθώς η χρήση του χημικού αναστολέα SB202190 προκαλεί μείωση του συνεντοπισμού τους. Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης τύπου Western βρέθηκε να ενεργοποιείται μόλις 20 λεπτά μετά την προσθήκη καψιδίων. Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρήζει περαιτέρω μελέτης. Αντίστοιχη μείωση στην είσοδο των core καψιδίων στα πρώιμα ενδοσώματα των κυττάρων ηπατικής προέλευσης που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκε και με έναν άλλο σημαντικό χημικό αναστολέα, το ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate), αναστολέα των φωσφοπρωτεϊνών τύπου τυροσίνης, ακριβώς όπως και στην περίπτωση του ιού 40 των πιθηκοειδών (SV40) (271). Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι πολλοί υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων αλληλεπιδρούν με τέτοιες πρωτεΐνες (Receptor tyrosine kinase – οικογένεια υποδοχέων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης) (275). Είναι ενδιαφέρον να υποθέσει κανείς ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ενδεχομένως παρόμοιος υποδοχέας εμπλέκεται στην είσοδο των συγκεκριμένων core καψιδίων στο κυτταρόπλασμα.

Μετά την είσοδο μέσω κλαθρίνης και την μετάβαση στα πρώιμα ενδοσώματα, παρατηρήθηκε ότι τα core καψίδια μετακινούνται στα όψιμα ενδοσώματα, περίπου στη μία ώρα επώασης, για να καταλήξουν στα λυσοσώματα μετά από τέσσερις ώρες επώασης. Η μετακίνηση αυτή στηρίζεται στη συμμετοχή στοιχείων του κυτταρικού σκελετού όπως τα μικροϊνίδια ακτίνης και οι μικροσωληνίσκοι. Με την χρήση του χημικού αναστολέα νοκοδαζόλη (nocodazole), που εμποδίζει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης στους μικροσωληνίσκους προκαλώντας την αποδιοργάνωση τους (226), αποδείχτηκε ότι η πλειονότητα των core καψιδίων παραμένει στην περιφέρεια του κυττάρου στο εσωτερικό των πρώιμων ενδοσωμάτων και δεν μετακινούνται στα λυσοσώματα, ενώ το φαινόμενο αποδείχτηκε δοσοεξαρτώμενο. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μετακίνησης από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα, παρατηρήθηκε ότι είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες p38 και $ERK_{1/2}$, μέλη των MAPκινασών, καθώς και διαφόρων ειδών φωσφοπρωτεΐνες όπως σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης.

Η εμπλοκή πρωτεϊνών μελών του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ καθώς και προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα για την κυτταροπλασματική μετατόπιση της πρωτεΐνης ERF (200), οδήγησαν στην εκτενέστερη μελέτη του συγκεκριμένου μονοπατιού. Είναι γνωστό ότι καψίδια άλλων ιών είναι ικανά να ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης. Γνωστό παράδειγμα αποτελεί ο ιός Ebola, του οποίου τα καψίδια ενεργοποιούν τόσο τις MAPκινάσες όσο και μεταγραφικούς παράγοντες (216). Για τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV) υπάρχουν ελάχιστες μελέτες, κυρίως για τις πρωτεΐνες E1 και E2 του φακέλου του ιού, που αποδεικνύουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού $ERK_{1/2}$ (180-182), καμία όμως που να αφορά τα καψίδια ελλειμματικά σε φάκελο. Στην παρούσα εργασία αποδείχτηκε πως τα core καψίδια προκαλούν την φωσφορυλίωση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών μετά από 30 λεπτά επώασης. Η χρήση ειδικών χημικών αναστολέων του μονοπατιού απέδειξε πως η ενεργοποίηση προέρχεται από τις άνωθεν πρωτεΐνες $MEK_{1/2}$. Το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε ως ποσοτικά εξαρτώμενο ενώ η χρήση κλάσματος αντίστοιχης πυκνότητας από κλίση σακχαρόζης με κύτταρα Sf9 που μολύνθηκαν με τον βακουλοϊό 1746 καθώς και του αντίστοιχου κλάσματος, που περιέχει core καψίδια, που έχουν υποστεί βρασμό για 1 ώρα στους $100^{o}C$ με αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, δεν ενεργοποίησε το μονοπάτι. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η χρήση διαλυτής core πρωτεΐνης, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, δεν προκάλεσε την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ γεγονός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

που υποδηλώνει ότι δεν είναι η πρωτεΐνη που προκαλεί την ενεργοποίηση αλλά η καψιδιακή δομή καθώς και πιθανά η διαδικασία εισόδου του καψιδίου.

Όπως έχει αναφερθεί η ενδοκύτωση είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι τα ενδοσώματα αποτελούν το κέντρο διαμερισματοποίησης της κυτταρικής σηματοδότησης επάγοντας μια σχετικά γρήγορη και επιλεκτική ενεργοποίηση και ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχουν. Η σηματοδότηση αυτή επηρεάζει κυτταρικούς παράγοντες και επομένως και την ίδια την ενδοκύτωση (82-84,158-162). Γνωστό παράδειγμα ενδοσωμικής πρωτεΐνης που έχει αποδειχτεί ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού είναι η πρωτεΐνη Rab5 (276,277). Για να μελετηθεί αν αυτό ισχύει στην περίπτωση των core καψίδιων του ιού της ηπατίτιδας C, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η ιδιότητα του χλωριούχου αμμωνίου να αυξάνει το pH στο εσωτερικό των ενδοσωμάτων, αιχμαλωτίζοντας τα καψίδια στο συγκεκριμένο οργανίδιο, η οποία προκάλεσε τη μείωση της φωσφορυλίωσης των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε πως η χρήση νοκοδαζόλης, που έχει την ιδιότητα να παρεμποδίζει τα core καψίδια στο εσωτερικό των πρώιμων ενδοσωμάτων, προκάλεσε την αύξηση της παρατεταμένης παρατηρούμενης ενεργοποίησης του $ERK_{1/2}$ μονοπατιού. Επιπλέον, η χρήση των χημικών αναστολέων του μονοπατιού, UO126 και PD98059, παρατηρήθηκε ότι προκαλεί μείωση στη καψιδιακή μετακίνηση από τα πρώιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι σε θερμοκρασία $4^{o}C$ δεν παρατηρείται φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$ παρόλο που υπάρχει πρόσδεση των καψιδίων στα κύτταρα, υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού οφείλεται στην ενδοκύτωση και πιθανά ένα μέρος της προσδίδεται στα πρώιμα ενδοσώματα.

Η σημαντικότητα του μονοπατιού σηματοδότησης $ERK_{1/2}$ στον ιικό κύκλο θεωρείται πλέον αποδεδειγμένη, καθώς έχουν περιγραφεί περιπτώσεις όπου εμπλέκεται στην παραγωγή ιικών πρωτεϊνών, στην αντιγραφή του γονιδιώματος αλλά και σε πρωτεϊνικές αλλαγές του κυττάρου ξενιστή (38,171,172). Αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στη παρούσα εργασία αποδεικνύουν πως τα core καψίδια όχι μόνο ενεργοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι μετά από 30 λεπτά επώασης με τα κύτταρα, αλλά προκαλούν και την παρατεταμένη φωσφορυλίωση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών η οποία και οδηγεί στην πυρηνική μετατόπιση των πρωτεϊνών αυτών. Το συγκεκριμένο φαινόμενο έχει περιγραφεί και σε άλλες περιπτώσεις (278,279). Επιπλέον, παρατεταμένη φωσφορυλίωση των $ERK_{1/2}$ πρωτεϊνών έχει καταγραφεί και κατά την ενεργοποίηση από τον αυξητικό παράγοντα EGF (epidermal growth factor) κύτταρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη core γεγονός που σε συνδυασμό με τα παρατηρούμενα αυξημένα κατώτερα επίπεδα φωσφορυλίωσης των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

πρωτεϊνών $ERK_{1/2}$, έχει προταθεί ότι πιθανά συνδέεται με τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (280). Θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ενεργοποιημένες $MEK_{1/2}$ και $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα ήδη καρκίνων (281,282).

Οι ενεργοποιημένες $ERK_{1/2}$ πρωτεΐνες έχουν την ιδιότητα να επηρεάσουν τόσο πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι τα core καψίδια προκαλούν την πυρηνική μετατόπιση των $ERK_{1/2}$ και την ενεργοποίηση των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *egr-1* και *c-fos.*Το γονίδιο *c-fos* (Feline osteosarcoma virus-οστεοσαρκωματικός ιός αιλουροειδούς) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που έχει την ιδιότητα να διμερίζεται με μία άλλη σημαντική πρωτεΐνη την c-Jun (Juvana, σαρκωματικός ιός 17 στα ιαπωνικά) για να δημιουργήσουν το μεταγραφικό σύμπλοκο διεγερτικών πρωτεϊνών -1 (AP-1, Activator Protein complex-1) (228,229). Τα core καψίδια όχι μόνο ενεργοποιούν την παραγωγή της συγκεκριμένη πρωτεΐνης ενεργοποιώντας, μέσω των πρωτεϊνών $ERK_{1/2,}$ τον προαγωγέα του γονιδίου αλλά επιπλέον σταθεροποιούν την παραγόμενη πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη c-Fos, παράγεται και παραμένει σταθερή για περίπου 45 λεπτά, όμως η παρατεταμένη $ERK_{1/2}$ ενεργοποίηση προκαλεί την αύξηση του χρόνου ημιζωής της (237,238). Στη συγκεκριμένη περίπτωση η c-Fos πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον πυρήνα των κυττάρων 6 ώρες, μετά από την προσθήκη core καψιδίων στο θρεπτικό υλικό τους. Θα πρέπει να τονιστεί πως το *c-fos* γονίδιο έχει βρεθεί ενεργοποιημένο σε καρκίνους και συγκεκριμένα σε ηπατοκυτταρικούς καρκίνους επιθετικής μορφής (130,131), ενώ αντίστοιχου τύπου ενεργοποίηση έχει παρατηρηθεί και από πρωτεΐνες άλλων ιών με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα την πρωτεΐνη LMP-1 (Latent membrane protein 1) του ιού Epstein-Barr (268).

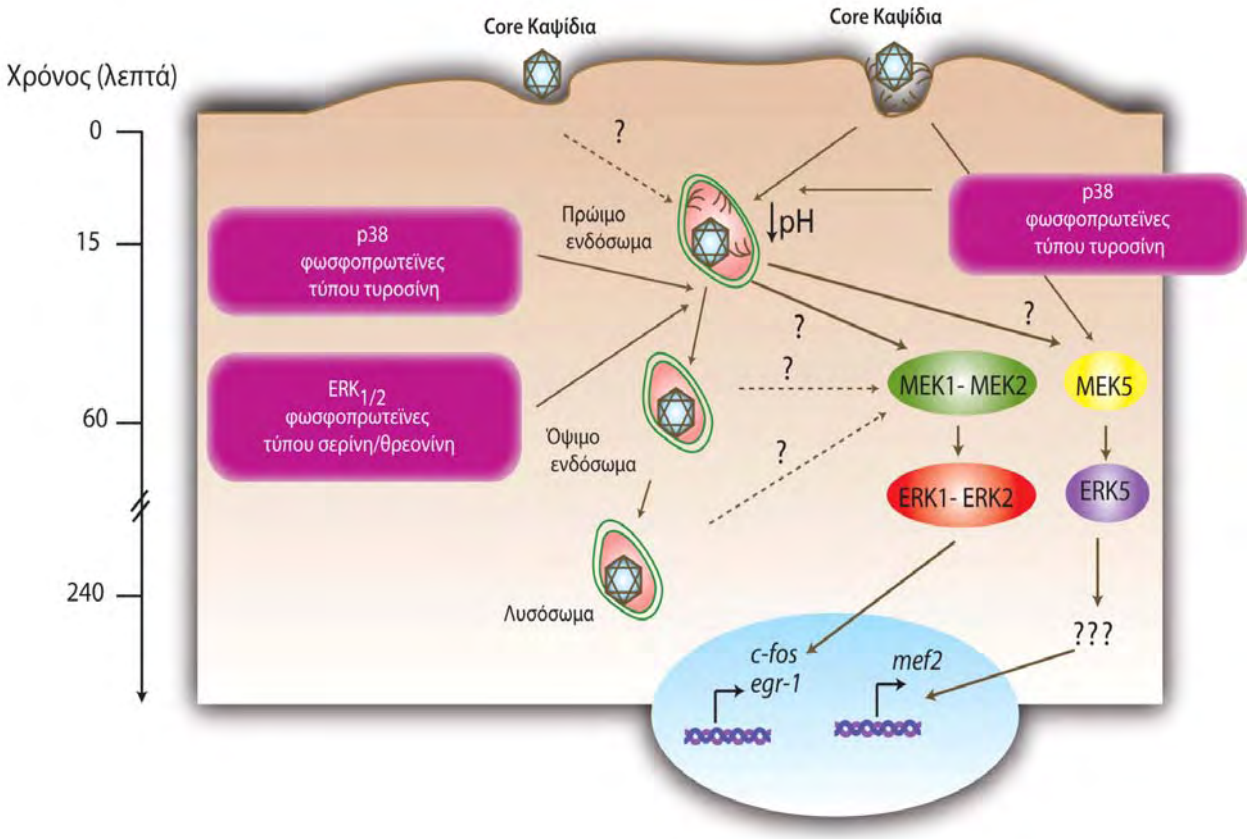
Ένα άλλο γονίδιο πρώιμης απόκρισης που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το *egr-1* (early growth response-1), και όπως παρατηρήθηκε ενεργοποιείται από τα core καψίδια, τόσο μέσω του μονοπατιού ενεργοποίησης $ERK_{1/2}$ όσο και από άλλα μονοπάτια σηματοδότησης. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί ενεργοποιημένο κατά τη διάρκεια μολύνσεων και άλλων ιών όπως του ιού της ηπατίτιδας των ποντικιών (murine hepatitis virus), κατά την οποία η πρωτεΐνη Egr-1 συμμετέχει στη δημιουργία χρόνιας μόλυνσης (284), τον ανθρώπινο πολυομαϊό JC (human polyomavirus JC), τον ιό της λύσσας (Rabbies disease virus) και τον ιό της νόσου Borna (Borna disease virus) (285,286). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας C έχει προταθεί ως ενεργοποιητής του γονιδίου *egr-1*, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί την μεταγραφική ενεργοποίηση του παράγοντα IGF-II (Insulin-like growth factor II) (174,287). Το IGF-II γονίδιο έχει εμπλακεί στην εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως ο καρκίνος του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

μαστού, του προστάτη καθώς και του ήπατος (288), συνήθως σε επιθετικές τους μορφές (289), και επομένως πρόκειται για γονίδιο που θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο αντικής θεραπείας.

Εκτός από το $ERK_{1/2}$ μονοπάτι σηματοδότης, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας καταδεικνύουν ότι τα core καψίδια ενεργοποιούν και ένα άλλο σχετικά καινούριο μονοπάτι σηματοδότησης, το ERK5. Πρόκειται για ένα μονοπάτι που έχει μέχρι σήμερα δειχθεί ότι εμπλέκεται στην επιβίωση νευρικών κύττάρων, την ανάπτυξη καρκίνων, την αγγειογένεση καθώς και την καρδιακή λειτουργία (144,149,150). Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει καμία μελέτη για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού από κάποιον ιό. Η παρούσα διατριβή αποδεικνύει πως οι ικές πρωτεΐνες core και NS5A του ιού της ηπατίτιδας C δεν προκαλούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού σε αντίθεση με τα core καψίδια που προκαλούν την ενεργοποίηση του μετά από 30 λεπτά επώασης. Η ενεργοποίηση αυτή προκαλεί την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *mef2* και την παραγωγή μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (144,156).

Τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα :



Εικόνα 92 : Συνοπτικό σχήμα των παρουσιαζόμενων αποτελεσμάτων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Ανακεφαλαιώνοντας, στην παρούσα διατριβή έγινε η κατασκευή ανασυνδυασμένων καψιδίων του ιού της ηπατίτιδας C, με ή χωρίς την ιδιότητα του φθορισμού, και αποδείχθηκε ότι έχουν την δυνατότητα να προσδένονται και να εισέρχονται σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν την ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης για να εισέλθουν στα κύτταρα στόχους τους, και μέσω των πρώιμων και όψιμων ενδοσωμάτων καταλήγουν στα λυσοσώματα. Στην πορεία αυτή ενεργοποιούνται τα μονοπάτια σηματοδότησης $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ και MEK5-ERK5 που με την σειρά τους ενεργοποιούν καθοδικούς μεταγραφικούς στόχους (c-fos, egr-1 και mef2). Τα συγκεκριμένα μονοπάτια εμπλέκονται στη δημιουργία καρκίνων και είναι ιδιαίτερα δελεαστική η υπόθεση ότι ενδεχομένως τα core καψίδια στη φυσική λοίμωξη από τον ιό HCV να εμπλέκονται στη δημιουργία ηπατοκυτταρικού καρκίνου ή να επηρεάζουν ανοσολογικές αποκρίσεις.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων στο σύνολό τους συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας που είναι πιθανό να διέπουν την λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C. Η ταυτοποίηση και κατανόηση λειτουργιών κυτταρικών στόχων που εμπλέκονται στην φυσική λοίμωξη, στην είσοδο και στην αναπαραγωγή του ιού της ηπατίτιδας C αποτελούν μία ελπιδοφόρα εναλλακτική προσέγγιση στις προσπάθειες καταστολής του ιού με απώτερο στόχο μία θεραπευτική προσέγγιση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

1. **But DYK**, Lai CL, Yuen MF. Natural History of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. World J. Gastroenterol 2008;14,11:1652-1656
2. Feld JJ, Hoonagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nat. 436:962-972
3. Dientag JL, Alter HJ. Non-A non-B hepatitis evolving and clinical perspective. Sem. Liver 1986; 6:67-81
4. Knobell RG, Conrad ME, Dienstag JL, Bell CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. Gastroenterol. 1975; 69:1278-1285
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. Science 1989; 244:359-362
6. Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. Nat. Rev. Microbiol. 2007; 5,6:453-463
7. Timm J, Roggendorf M. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. World Gastroenterol. 2007; 13,36: 4808-4810
8. Myrmel H, Ulvestad E, Asjø B. The hepatitis C enigma. APMIS 2009; 117:427-439
9. Qiu P, Cai XY, Zhang Q, Norris ED, Greene JR. HCV genotyping using statistical classification approach. J. Biom. Sci. 2009; 16,62:1-9
10. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. World J. Gastroenterol. 2007; 7,13:2436-2441
11. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet Infect. Dis. 2005; 5:558-567
12. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, Ujiie N, Endo C, Matsui A, Okamoto H, Mishiro S. Transmission of hepatitis C virus from mother to infants the vertical transmission of hepatitis C virus. N. Eng. J. Med. 1994; 330:744-750
13. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. N. Eng. J. Med. 2001, 345,1:41-52
14. Pham TNQ, Michalak TI. Occult persistance and lymphotropism of hepatitis C virus infection. World J. Gastroenterol. 2008; 14,18:2789-2793
15. Pham TNQ, King D, MacParland SA, McGrath JS, Reddy B, Bursey F, Michalak TI. Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection. Gastroenterol. 2008; 134:812-822
16. McParland SA, Pham TNQ, Gujar SA, Michalak TI. De novo infection and propagation of wild-type hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. J. Gen. Virol. 2006; 87:3577-3586
17. Wilkinson J, Radkowski M, Laskus T. Hepatitis C virus neuroinvasion : identification of infected cells. J. Virol. 2009; 83,3:1312-1319
18. Heckmann JG, Kayser C, Heuss D, Manger B, Blum HE, Neundörfer B. Neurological manifestations of chronic hepatitis C. J. Neurol. 1999; 246:486-491
19. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus : Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. World J. Gastroenterol. 2007; 13,17:2461-2466
20. Di Bisaglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. Hepatol. 2002; 36:121-127
21. Tellinghuisen TL, Evans MJ, von Hahn T, You S, Rice CM. Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus. J. Virol. 2007; 81,17:8853-8867
22. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis Clin. Sci. 2009; 117:49-65
23. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. Wold J. Gastroenterol. 2007; 13,17:2406-241
24. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. J. Virol. 1998; 72,7:6048-6055
25. Majeau N, Gagné V, Bolduc M, Leclerc D. Signal peptide peptidase promotes the formation of hepatitis C virus non-enveloped particles and is captured on the viral membrane during assembly. J. Gen. Virol. 2005; 86:3055-3064
26. McLauchan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. EMBO J. 2002; 21,15:3980-3988
27. McLauchan J. Properties of the hepatitis C vrus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. J. Virol. Hepatol. 2000; 7:2-14
28. Boulant S, Vanbelle C, Ebel C, Penin F, Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein futures. J. Virol. 2005; 79,17:1153-11365

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

29. Duvignand JP, Savard C, Fromentin R, Majeau N, Leclerc D, Gagné SM. Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: An intrinsically unstructured protein. Bioch. Biophys. Res. Com. 2008, 378:27-31
30. Acosta-Ricero N, Poutou J, Alvarez-Lajonchere L, Guerra I, Aquilera Y, Musacchio A, Rodriquez A, Aguilar J, Falcon V, Alvarez-Obregon JC, Soria Y, Torres D, Linares M, Pérez A, Morales-Grillo J, Dueñas-Carrera S. Recombinant in vitro assembled hepatitis C virus core particles induce strong specific immunity enhanced by formulation with an oil-based adjuvant. Biol. Res. 2009; 42:41-56
31. Acosta-Rivero N, Rodriquez A, Mussachio A, Poutu J, Falcon V, Torres D, Aquilar JC, Linares M, Alonso M, Perez A, Menendez I, Morales-Grillo J, Marquez G, Dueñas-Carrera S. A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. Bioch. Bioph. Res. Com. 2005; 334:901-906
32. Majeau N, Gagné V, Boivin A, Bolduc M, Majeau JA, Ouellet D, Leclerc D. The N-terminal half of the core protein of hepatitis C virus is sufficient for nucleocapsid formation. J. Gen. Virol. 2004; 85:971-981
33. Tellinghuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. Curr. Opin. 2002; 5:419-127
34. Lee SK, Park SO, Joe CO, Kim YS. Interaction of HCV core protein with 14-3-3$^{\varepsilon}$ protein releases Bax to activate apoptosis. Bioch. Bioph. Com. 2007; 352:756-762
35. Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Snimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat. Cell Biol. 2007; 9,9:961-969
36. Boulant S, Target-Adams P, McLauchlan J. Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus. J. Gen. Virol. 2007; 88:2204-2213
37. Negro F, Sanyal AJ. Hepatitis C virus, steatosis and lipid abnormalities : clinical and pathogenic data. Liver Intern.2009; 29,2,26-37
38. Panteva M, Korkaya H, Jameel S. Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this survival strategy? Vir. Res. 2003; 23:131-140
39. Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Häussinger D. Hepatitis C virus core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK and p38 MAK kinases together with MAP Kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. Virol. 2002; 292:272-284
40. Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Tanaka K, Shimoike T, Moriishi K, Iwasaki T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Molcular determinant for subcellular localisation of hepatitis C virus core protein. J. Virol. 2005; 79,2:1271-1281
41. Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T. Nuclear localization of th truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic terminus deleted. J. Gen. Virol. 1995; 76:53-61
42. Chang SC, Yen JH, Kang HY, Jang MH, Chang MF. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. Bioch. Bioph. Res. Com. 1994; 205,2:1284-1290
43. Eng FJ, Walewski JL, Klepper AL, Fishman SL, Desai SM, McMullan LK, Evans MJ, Rice CM, Branch AD. Iinternal initiation stimulates production of p8 mini-core, a member of a newly-discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms. J. Virol. 2009; 83-7:3104-3114
44. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. Int. J. Med. Sci. 2006; 3,2:29-34
45. Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. J. Biol. Chem. 2004; 279,47:48576-48587
46. Mcdonald A, Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. J. Gen. Virol. 2004; 85:2485-2502
47. Huang Y, Staschke K, De Francesco R, Tan SL. Phosphorylation of hepatitis C virus NS5A non structural protein: a new paradigm for phosphorylation-dependent viral replication? Virol. 2007; 354:1-9
48. Penin F, Brass V, Appel N, Ramboarina S, Montserret R, Ficheaux D, Blum HE, Bartenschlager R, Moradpour D. Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. J. Biol. Chem. 2004; 279,24:40835-40843

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

49. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamur T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. J. Virol. 2008; 82,16:7964-7976
50. Dalagiorgou G,Vassilaki N, Foka P, Boumlic A, Kakkanas A, Khalili S, Aslanoglou E, Veletza S, Vassilopoulos D, Hatzigiannis SJ, Koskinas J, Mavromara P. Higher Levels of HCV core+1 Antibodies in Patients with HCV-Associated Hepatocellular Carcinoma in Comparison to Chronically Infected Patients (υπό δημοσίευση από το εργαστήριο μοριακής ιολογίας).
51. Varaklioti A., Vassilaki N, Georgopoulou U, Mavromara P. Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. J. Biol. Chem.2002; *277*: 17713-17121
52. Vassilaki N, Mavromara, P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. J. Biol. Chem. 2003; *278*:40503-40513
53. Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternative reading frame (ARF) and its family of novel products the alternative reading frame protein/F-protein, the double frameshift protein, and others. Semin. Liver Dis. 2005; 25,1:105-117
54. Yu X, Qiao M, Atanasov I, Hu Z, Kato T, Liang TJ, Zhou H. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. Virol. 2007; 367:126-134
55. André P, Perlemuter G, Budkowska A, Bréchot C, Loteau V. Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. Sem. Liver Dis. 2005; 25,1:93-103
56. Maillard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Grainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. J. Virol. 2001; 75,17:8240-8250
57. Ishida S, Kaito M, Kohara M, Tsukiyama-kohora K, Fujita N, Ikoma J, Adachi Y, Watanabe S. Hepatitis C core particle detected by immunoelectron microscopy and optical rotation technique. Hepatol. Res. 2001; 20:335-347
58. Masalova OV, Atanadze SN, Samakhovalov EI, Petrakova NV, Kalinina TI, Smirnov VD, Khudyakov YE, Lields HA, Kurshch AA. Detection of hepatitis C virus core protein circulating within different virus particle populations. J. Med. Virol. 1998; 55:1-6
59. Von Hahn T, Rice C. Hepatitis C virus entry. J. Biol. Chem. 2007; 283,7:3689-3693
60. Helle F, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry into host cells. Cell. Mol. Life Sci. 2008; 65:100-11
61. Evans MJ, von Hahn T, Tcherne DM, Syder AJ, Oanis M, Wölk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice C. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nat. 2007; 447: 801-805
62. Lindenbach BD, Rice CM. Unraveling hepatitis C virus replication from genome to function. Nat. 2005, 436:933-938
63. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich HG, Mizokami M, Bartenshlager R, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. Nat. Med. 2005; 11,7:791-796
64. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinhguisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 2005; 309:623-626
65. Sieczkarski SB, Whittaker GB. Dissecting virus entry via endocytosis. J. Gen. Virol. 2002; 83:1535-1545
66. Roth TF, Porter KR. Yolk protein uptake in the oocytes of moscito *Aedes aegypti L.* J. Cell Biol. 1964; 20:313-331
67. Pearse BMF. Coated vesicles form pig brain: Purification and biochemical characterisation. J. Mol. Biol. 1975; 97:93-98
68. Kirchhausen T. Clathrin. Ann. Rev. Bioch. 2000; 69:699-727
69. Perry MM, Gilbert AB. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen *(Gallus domesticus)*: Lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. J. Cell Sci. 1979; 39:252-272
70. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. J Cell Sci. 2008; 120,22:3905-3910
71. Willingham M, Hanover J, Dickson RB, Patsan I. Morphologic characterisation of the pathway of transferring endocytosis and recycling in human KB cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81:175-179

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

72. Grant B.D, Donaldson J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. Nat. 2009; 10:597-608
73. Parat MO. The biology of caveolae : achievements and perspectives. Intern. Rev. Cell Mol. Biol. 2009; 273:117-144
74. Anderson RGW. The caveolae membrane system. Annu. Rev. Biochem. 1998; 67:199-225
75. Schlegel A, Volonté D, Engelman JA, Galbiati F, Mehta P, Zhang XL, Scherer PE, Lisanti MP. Crowded little caves: structure and function of caveolae. Cell Signal. 1998; 10,7:457-463
76. Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A. Clathrin and caveolin-1 indepedent endocytosis : Entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolar. JBC 2005; 268,13:477-488
77. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. Traffic 2009; 10:364-371
78. Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, Florin L. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16- involvement of tetraspanin enriched microdomains (TEMs). PLOS one 2008; 3,10: e23313
79. Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into ditinct populations of early endosomes. Cell 2006; 124,5:997-1009
80. Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signalling by neurotrophin receptors. J. Neurosci. 2005; 25,21:5236-5247
81. Jürgens G. Membrane trafficking in plants. Annu. Rev. Cell Dev. 2004; 20:481-504
82. Teis D, Huber LA. The odd couple: signal transduction and endocytosis. Cell Mol. Life Sci. 2003; 60:2020-2033
83. Sadowski L, Pileska I, Miaczynska M. Signaling from endosomes: Location makes a difference. Exp. Cell Res. 2009; 315:1601-1609
84. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organisezers. Nature 2001; 2:107-119
85. Felberbaum-Corti M, Cavalli V, Gruenberg J. Capture of the small GTPase Rab5 by GDI: regulation by p38 MAP kinase. Meth. Enzymol. 2005; 403:367-381
86. Calaghan J, Simonsen A, Gaullier JM, Toh BH, Stenmark H. The endosome fusion regulator early-endosome autogen 1 (EEA1) is a dimer. Biochem. J. 1999; 338:539-543
87. Macé G, Miaczynska M, Zerial M, Nebreda AR. Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates μ opinoid receptor endocytosis. EMBO J. 2005; 24:3235-3246
88. Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. Endosomal proteolysis of internalised proteins. FEBS Let. 1996; 389:55-60
89. Roshy S, Sloane BF, Moin K. Perinuclear cathepsin B and malignant progression. Cancer Metast. Rev. 2003; 22:271-28
90. Otto HH, Schirmeister T. Cysteine proteases an their inhibitors. Chem. Rev. 1997; 97:133-171
91. Eifart P, Ludwig K, Böttcher C, de Haan CAM, Rottier PJM, Korte T, Herrmann A. Role of endocytosis and low pH in murine hepatitis virus strain A59 cell entry. J. Virol. 2007; 81,19:19758-19768
92. Cooper A. Yosef S. Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. J Biol. Chem. 2006; 281,24:16563-16569
93. Chadran K, Nibert ML. Animal cell invasion by a large nonenveloped virus: reovirus delivers the goods. Trends Microbiol. 2003; 11,8:374-381
94. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: A key to lysosome biogenesis. Mol. Biol. Cell 2000; 11:467-48
95. Luzla JP, Mullock BM, Pryor PR, Lindsay MR, James DE, Piper RC. Relationship between endosomes and lysosomes. Bioch. Soc. Trans. 2001; 29,4:476-480
96. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, Piper RC. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenensis. J. Cell Sci. 2000; 113:1515-1524
97. Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meet function. Nat. Rev. 2009; 10:623-635
98. Taub N, Teis D, Ebner HL, Hess MW, Huber LA. Late endosomal traffic of the epidermal growth factor receptor ensures spatial and temporal fidelity of mitogen-activated protein kinase signalling. Mol. Biol. 2007; 18:4698-4710
99. Van der Groot FG, Gruenberg J. Intra-endosomal membrane traffic. Trends Cell Biol. 2006; 16,10:514-521

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

100. Quirin K, Eschi B, Scheu I, Poort L, Kartenberck J, Helenius A. Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via lte endocytosis. J. Virol. 2008; 378:21-31
101. de Duve C. The lysosome turns fifty. Nat. Cell Biol. 2005; 7,9:847-849
102. Van der Schaar H, Rust MJ, Chen C, van der Ende-matselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. Plos path. 2008; 4,12:e1000244
103. Lecot S, Belouzard S, Dubuisson J, Rouillé Y. Bovine Viral Diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. J. Virol. 2005; 79,16:10826-1082
104. Chu JJH, Ng ML. Infectious entry of West nive virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. J. Virol. 2004; 78,19:10543-10555
105. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillè Y. Hepatitis C Entry depends on clathrin-mediated endocytosis. J. Virol. 2007; 80,40:6964-69
106. Meertens L, Bertaux C, Dragic T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalisation step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. J. Virol. 2006; 80,23:11571-11578
107. Tscherne D, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time-and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. J. Virol. 2006; 80,4:1734-1741
108. Codran A, Royer C, Jaeck D, Bastien-Valle M, Baumert TF, Kieny MP, Pereira A, Martin JP. Entry of hepatitis C virus pseudotypes into primary human hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. J. Gen. Virol. 2006; 87:2583-2593
109. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, Mc Keating J. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. PNAS 2003; 100, 12:7271-7276
110. Smith JL, Campos SK, Wandinger-Ness A, Ozbun MA. Caveolin-1 dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway of pH-dependent uncating. J. Virol. 2008; 81,19:9505-9512
111. Pelkmans L, Helenius A. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. Curr. Opin. Cell Biol. 2003; 15:414-422
112. Tsai B. Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2007; 23:23-43
113. Girao H, Gelik MI, Idrissi FZ. Actin in endocytic pathway: from yeast to mammals. FEBS 2008; 682,14:2112-2119
114. Durrbach A, Louvard D. Courdier E. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. J. Cell Sci. 1996; 109:457-465
115. Sodeik B. Mechanism of viral transport in the cytoplasm. Trends Microbiol. 2000; 8,10:465-472
116. Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. Crit. Rev. Oncol. hepatol. 2008; 67:8-15
117. Ramos J.W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. Intern. J. Biochem. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2008; 40,12:2707-27019
118. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb M. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endoc. Rev. 2001; 22,2:153-183
119. Chong H, Vikis H.G, Guan K.L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. Cell. Signal. 2003; 15:463-369
120. Skarpen E, Flider LI, Rosseland CM, Ørstavik S, Wierød L, Oksvold MP, Skålhegg BS, Huitfeldt S. MEK1 and MEK2 regulate distinct functions by sorting ERK2 to different intracellular compartements. FASEB J. 2008; 22:466-476
121. Zhuang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldmith EJ. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3Å resolution. Nat. 1994; 367:704-711
122. Wang Z, Harkins PC, Ulevitch RJ, Han J, Cobb MH. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Ǻ resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94:2327-2332
123. Shaw D, Wang SM, Villaseñor AG, Tsing S, Walter D, Brwner MF, Barnett J, Kuglsatter A. The crystal structure of JNK2 reveals conformational flexibility in the MAP kinase insert and indicates its involvement in the regulation of catalytic activity. J. Mol. Biol. 2008; 383:885-893
124. Kinoshita T, Yoshida I, Nakae S, Okita K, Gouda M, Matsubara M, Yokota K, Ishiguro H, Tada T. Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr 204. Bioch. Biophy. Res. Com. 2008; 377:1123-1127

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

125. Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. ERK1 and ERK2 mitogen-activated kinases affect Ras-dependent cell signalling differentially. J. Biol. 2006; 5:14
126. Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? J. Biol. 2006; 5:13
127. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing specificity J. Cell Sci. 2005; 118:2997-3002
128. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. J. Biol. Chem. 1995; 271,28:16483-16486
129. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Res. Rev. 1998; 370-490
130. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. Nat. Med. 2006; 12,4:410-416
131. Feo F, Frau M, Tomasi ML, Brozzetti S, Pascale RM. Genetic and epigenetic control of molecular alterations in hepatocellular carcinoma. Exp. Biol. Med. 2009; 234,7:726-736
132. Adamson E, Mercola D. Egr1 transcription factor : Multiple roles in prostate tumour cell growth and survival. Tumor Biol. 2002; 23:93-102
133. Eid MA, Kumar V, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ**.** Expression of early growth response genes in human prostate cancer. Cancer Res. 1998; 58:2461-2468
134. Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serin/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. EMBO J. 1997; 16,8:1909-1920
135. Xi Q, Cuesta R, Schneider RJ. Regulation of translation by ribosomal shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. J. Virol. 2005; 79,9:5676-5683
136. Zhuang Y, Feigenblum D, Schneider RJ. A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. J. Virol. 1994; 68,11:7040-7050
137. Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, Warne PH, Cowling V, Cook SJ, Peters G, Delpuech O, Schulze A, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Ganesan TS, Downward J, Hancock DC. Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in Ras Oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. Mol. Cel. 2005; 20:673-685
138. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human disease. Bioch. Bioph. Acta 2007; 1773:1358-1375
139. Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Groffith JP, Chen W, McCaffey PG, Chambers SP, Su MSS. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 1996; 371,44:27696-27700
140. Raman M, Chen W, Cobb MH**.** Differential regulation and properties of MAPKs. Oncog. 2007; 26:3100-3112
141. Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. Bioch. Bioph. Res. Com. 1995; 213,2:715-724
142. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. J. Biol. Chem. 1995; 270,21:12665-12669
143. Borges J, Pandiella A, Esparís-Ogando A. Erk5 nuclear location is independent on dual phosphorylation and favours resistant to TRAIL-induced apoptosis. Cell Signal. 2007; 19: 1473-1487
144. Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signaling pathway. Cell Signal. 2006; 18:753-760
145. Buschbeck M, Ullrich A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. J. Biol. Chem. 2005; 280,4:2659-2667
146. Barros JC, Marshall CJ. Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAPkinase pathway can lead to disruption of the actin cytoskeleton. J. Cell. Sci. 2005; 118,8:1663-1671
147. Raviv Z, Kalie E, Seger R. MEK5 and ERK5 are located in the nuclei of resting as well as stimulated cells, while MEKK2 translocates from the cytosol to the nucleus upon stimulation. J. Cell. Sci. 2004; 117,9:1773-1784
148. Zheng Q, Guoyong Y, Yan C, Cavet M, Berk BC. 14-3-3β bind to big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1/ERK5) and regulates BMK1 function. J. Biol. Chem. 2004; 279,10:8787-8791
149. English JM, Pearson G, Hockenberry T, Shivakumar L, White MA, Cobb MH. Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. J. Biol. Chem. 1999; 274,44:31588-31592

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

150. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAP kinase regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of VEGF expression. J. Biol. Chem. 2002; 277,45:43344-43351
151. Marchetti A, Colleti M, Cozzolino AM, Steindler C, Lunadei M, Mancone C, Tripodi M. ERK5/MAPK is activated by TGFβ in hepatocytes and required for the GSK-3β-mediated Snail protein stabilisation. Cell Signal. 2008; 20:2113-2118
152. Cavajal-Vergara X, Tabera S, Montero JC, Esparís-Ogando A, López-Pérez R, Mateo G, Gutiérrez N, Parmo-Cabañas M, Teixidó J, San Miquel JF, Pandiella A. Multifuctional role of ERK5 in multiple myeloma. Blood 2005; 105,11:4492-4499
153. Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. EMBO J. 1997; 16,23:7054-7066
154. Ramachandran B, Yu G, Li S, Zhu B, Guilick T. Myocyte enhancer factor 2A is trancritpionally autoregulated. J. Biol. Chem. 2008; 283,16:10318-10329
155. Lemercier C, Verdel A, Galoo B, Curtel S, Brocard MP, Kchochbin S. mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. J. Biol. Chem. 2000; 275,20:15594-15599
156. Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, Li D, Xie H, Yin S, Yu J, Lin Q, Zheng S. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. J. Canc. Res. Clin. Oncol. 2008; 134:83-9
157. Coulombe P, Meloche S. Atyical mitogen-activated protein kinases: Structure, regulation and functions. Bioch. Biophy. Acta 2007; 1773:1376-1387
158. Disanza A, Frittoli E, Palamidessi A, Scita G. Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. Mol. Oncol. 2009; 3,4:280-296
159. Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. Nat. Rev. 2009; 10:609-622
160. Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and cavaeolae/raft-mediate endocytosis. Nat. 2005; 436,7047:78-86,
161. Miaczynka M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. Curr. Opin. Cell Biol. 2004; 16:400-406
162. McPherson PS, Kay BK, Hussain NK. Signaling on the endocytic pathway. Traffic 2001; 2:375-384
163. Lefkowitz RJ, Whalen EJ. β-arrestins: traffic cops of cell signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 2004; 16:162-168
164. Luttrel L.M, Roudabush F.L, Choy E.W, Miller W.E, Field M.E, Pierce K.L, Lefkowitz R.J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated by β-arrestin scaffolds. PNAS 2001; 98,5:2449-2454
165. Teis D, Wunderlich W, Huber L. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. Dev. Cell. 2002; 3:803-814
166. Murphy C. Endo-fin-ally a SARA for BMP receptors. J. Cell Sci. 2007; 120:1153-1155
167. Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, Zerial M, Stenmark H, Murphy C, Fotsis T. Early endosomal regulation of smad-dependendent signalong in endothelial cells. J. Biol. Chem. 2002; 277,20:18046-18052
168. Hu Y, Chuang JZ, Xu K, McGraw TG, Sung CH. SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. J. Cell Sci. 2002; 115:4755-4763
169. Ceresa BP, Schmid SL. Regulation of signal transduction by endocytosis. Curr. Opin. Cell Biol. 2000; 12:204-210
170. Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signalling by neurotrophin receptors. J. Neurosci. 2005; 25,21:5236-5247
171. Sharma-Walia N, Krishnan HH, Naranatt PP, Zeng L, Smith MS, Chadran B. ERK1/2 and MEK1/2 induced by kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. J Virol. 2005; 79,16:10308-10329
172. Zheng Y, Li J, Johnson DL, Ou J. Regulation of hepatitis B virus replication by Ras-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. J. Virol. 2003; 77,14:7707-7712

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

173. Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR, Ludwig S. Influenza viruw propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signaling cascade. Nat. Cell Biol. 2001; 3:301-305
174. Anders M, Christian C, McMahon M, McCornick F, Korn M. Inhibition of the Raf/MEK/ERK pathway up-regulates expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cancer cells. Cancer Res. 2003; 63:2088-2095
175. Lee S, Park U, Lee YI. Hepatitis C virus protein transactivates insulin-like growth factor II gene transcription through acting concurrently on egr1 and sp1 sites. Virol. 2001; 283:167-177
176. Mankouri J, Griffin S, Harris M. The hepatitis C virus non-structural protein NS5A alters the trafficking profile of the epidermal growth factor receptor. Traffic 2008; 9:1497-1509
177. Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signalling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. Arch Virol. 2003; 148:237-251
178. Tan SL, Nakao H, He Y, Vijaysri S, Neddermann P, Jacobs BL, Mayer BJ, Katze MG. NS5A, a non structural protein of hepatitis C virus, binds growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 96:5533-5538
179. He Y, Tan SL, Tareen SU, Vijaysri S, Langland JO, Jacobs BL, Katze MG. Regulation of mRNA translation and cellular signaling by hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. J. Virol. 2001; 75,11:5090-5098
180. Hassan M, Chozlan H, Abdel-Kader O. Activation of c-Jun NH_2-terminal kinase (JNK) signaling pathway is essential for the stimulation o of hepatitis C virus (HCV) non-structural protein 3 (NS3)-mediated cell growth. Virol. 2005; 333:324-336
181. Zhao L.J., Zhao P., Chen Q.L., Ren H., Pan W., Qi Z.T., Mitogen-activated protein kinase signaling pathways triggered by the hepatitis C virus envelope protein E2: implication for the prevention of infection. Cell Prol.2007; 40: 508-521
182. Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, Li L, Ke JS, Qi ZT. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. Exp. Cell Res. 2005; 305:23-32
183. Zhao LJ, Zhang XL, Zhao P, Cao J, Cao MM, Zhu SY, Liu HQ, Qi ZT. Up-regulation of ERK and p38 MAPK signaling pathways by hepatits C virus E2 envelope protein in human T lymphoma cell lina. J. Leuk. Biol. 2006; 80:1-9
184. Kim SO, Kwon JI, Jeong YK, Kim GY, Kim ND, Choi YH. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of beta-lapachone in human hepatocarcinoma cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2007; 71,9:2169-76
185. Li YQ, Tao KS, Ren N, Wang YH. Effect of c-fos antisense probe on prostaglandin E2-induced upregulation of vascular endothelial growth factor mRNA in human liver cancer cells. World J. Gastroenterol. 2005; 28,11:4427-30
186. Kong SE, Hall JC, McCauley RD. Estimation of gene expression within the intestinal mucosa using semiquantitative reverse transciptase polymerase chain reaction. Analyt. Biochem. 1999; 277:111-114
187. Le Gallic L, Virgilio L, Cohen P, Biteau B, Mavrothalassitis G. ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of ERK activity that links it to cell cycle progression. Mol. Cell. Biol. 2004; 24,3:1206-1218
188. Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. J. Cell Biol. 2005; 170,5:769-779
189. Vonderheit A, Hellenius A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. PLOS Biol. 2005; 3,7:e233
190. Mattera R, Bonifacino JS. Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitement of Rabex-5 to early endosomes. The EMBO J. 2000; 27:2484-2494
191. Diner D, Jordan BWM, Neufeld B, Lee JD, Lindemann D, Rapp UR, Ludwig S. Extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is required for the differentiation of muscle cells. EMBO rep. 2001; 2,9:829-834
192. Tsitoura E, Georgopoulou U, Mavromara P. HSV-1 based amplicon vectors as an alternative system for the expression of functional HCV proteins. Curr. Gene Ther. 2006; 6,3:393-398

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

193. Cen B, Selvaraz A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, Prywes R. Megakaryoblastic leukemia 1, potent transcriptional coactivator for serum responce factor (SRF), is required for serum induction of SRF target gene. Mol. Cell Biol. 2003; 23,18:6597-608
194. Groot M, Boxer L, Thiel G. Nerve growth factor –and epidermal growth- regulated gene transcription in PC12 pheochromocytoma and INS-1 insulinoma cells. Eur. J. Cell Biol. 2000; 79:924-935
195. Harlow E, Lane D. Immunizations, A.A.l. manual, Editor, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; 53-137.
196. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes/SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins in Molecular cloning: a laboratory manual. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 18.1-18.88
197. Kockar FT, Foka P, Hughes TR, Kousteni S, Ramji DP. Analysis of the Xenopus leavis CCAAT-enhanced binding protein alpha gene promoter demonstrates species-specific differences in the mechanisms for both auto-activation and regulation by Sp1. Nucl. Ac. Res. 2001; 15,29,2:362-372
198. Pharmingen, Baculovirus expression vector system manual 1999.
199. Lynn DE. Improved efficiency in determining the titter of *Autotropha Californica* baculovirus non occluded virus. BioTechniques 1992; 13:282-285
200. Tsitoura P, Georgopoulou U, Pêtres S, Varaklioti A, Karafoulidou A, Vagena D, Politis C, Mavromara P. Evidence for cellular uptake of recombinant hepatitis C virus non-envelopped capsid-like particles. FEBS lett. 2007; 581:4049-4057
201. Katsarou K, Serti E, Tsitoura P, Lavdas A, Varaklioti A, Pickl-Herk A, Blaas D, Oz-Arslan D, Zhu R, Hinterdorfer P, Mavromara P, Georgopoulou U. Green Fluorescent Protein-tagged HCV non-enveloped capsid like particles: Development of a new tool for tracking HCV core uptake. Biochimie 2009; 91,7: 903-915
202. Baumert, TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. J. Virol. 1998; 72,5:3827-36.
203. Rawie A. Basic principles of particle size analysis. Malvern instruments protocols .
204. Bootz A, Vogel V, Schubert D, Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoarylate) nanoparticles. Eur. J. Pharm. 2004; 57: 369-375
205. Hu YC, Bentley WE. Enhancing yield of infectious bursal disease virus structural proteins in baculovirus expression systems: Focus on media, protease inhibitors and dissolved oxygen. Biotech. Prog. 1999; 15:1065-1071
206. Hom LG, Volkman LE. Preventing proteolytic artifacts in the baculo-virus expression system. Biotechniques 1998; 25,1:18-20
207. Grosch HW, Haslik A. Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus xpression systems. 1998; 24,6:930-932
208. Kanto, T, Hayashi N, Takehara T, Hagiwara H, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Density analysis of hepatitis C virus particle population in the circulation of infected hosts: implications for virus neutralization or persistence. J. Hepatol. 1995; 22,4: 440-448
209. Misinzo G, Meerts P, Bublot M, Mast J, Weingartl HM, Nauwynck HJ. Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. J. Gen. Virol. 2005; 86:2057-2068
210. Pizzato M, Marlow SA, Blair ED, Takeuchi Y. Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific env-receptor interaction. J. Virol. 1999; 73,10: 8599-8611
211. Campbell JN, Epand RM, Russo PS. Structural cahnges and aggregation of human influenza virus. Biomacromol. 2004; 5:1728-1735
212. Ehrlich LS, Liu T, Scarlata S, Chu B, Carter CA. HIV-1 capsid protein forms spherical (immature-like) and tubular (mature-like) particles in vitro: Structure switching by pH-induced conformational changes. Biophys. J. 2001; 81:586-594
213. Artelsmair H, Kienberger F, Tinazli A, Schlapak R, Zhu R, Preiner J, Wruss J, Kastner M, Saucedo-Zeni N, Hoelzl M, Rankl C, Baumgartner W, Howorka S, Blaas D, Cruber HJ, Tampé R, Hinterdorfer P. Atomic force microscopy-derived nanoscale chip for the detection of human pathogenic viruses. Small. 2008; 4,6:847-854
214. Kienberger F, Zhu R, Moser R, Rankl C, Blass D, Hinterdorfer P. Dynamic force microscopy for imaging of viruses under physiological conditions. Biol. Proced. 2004; 6,1:120-128

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

215. Liebl D, Difato F, Horníková L, Mannová P, Štokrová J, Forstová J. Mouse polyomavirus enters early endosomes, requires their acidic pH for productive infection and meets transferring cargo in Rab11-positive endosomes. J. Virol. 2006; 80,6:4610-4622
216. Martinez O, Valmas C, Nasler CF. Ebola virus-like particle-induced activation of NF-κB and ERK signaling in human dendritic cells requires the glycoprotein mucin domain. Virol. 2007; 364:342-354
217. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. Cell Microbiol. 2009; doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01345.x
218. O'Donnel V, LaRocco M, Duque H, Baxt E. Analysis of foot-and-mouth disease internalisation events in cultured cells. J. Virol. 2005; 79,13:8506-8518
219. Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütche A, Gruenberg J, Zerial M. Inhibition of Rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. EMBO J 1994; 13,6:1267-1296
220. Rauma T, Tuukkanen J, Bergelson J.M, Denning G, Hautala T. Rab5 GTPase regulates adenovirus endocytosis. J Virol 1999;37,11:9664-9668
221. Kim M, Ha Y, Park HJ. Structural requirements for assembly and homotypic interactions of the hepatitis C virus core protein. Virus Res. 2006; 122:137-143
222. Klein KC, Polyak SJ, Lingappa JR. Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly. J. Virol. 2004; 78,17:9257-9296
223. Nolandt O, Kern V, Müller H, Pfaff E, Theilmann L, Welker R, Kräusslich HG. Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. J. Gen. Virol. 1997; 78:1331-1340
224. McLauchan J. Properties of the hepatitis C vrus core protein : a structural protein that modulates cellular processes. J. Vir. Hepatol. 2000; 7:2-14
225. Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying YS, Zhu M, Serrero G, Anderson RGW. Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. Bioch. Bioph. Acta 2007; 1773:784-793
226. Vasquez RJ, Howell B. Yvon AMC. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. Mol Biol 1997;8:973-985
227. Rouhrard F, Maillard P, Lavergne JP, Boulant S, Walic M, Andréo U, Goueslain L, Helle F, McLauchlan J, Budkowska A. Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network : role of the viral nucleocapsid protein. J. Biol. Chem. 2009; 15,284,20:13778-13791
228. Gruenberg J, van der Groot FG. Mechanisms of pathogens entry through the endosomal compartments. Nat. Rev. 2006; 7:495-504
229. Snyers L, Zwickl H, Blaas D. Human Rhinovirus Type 2 Is Internalized by clathrin-mediated endocytosis. J.Virol. 2003: 77:5360- 5369
230. Bayer N, Schober D, Hüttinger M, Blaas D, Fushs R. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. J. Biol. Chem. 2001; 276, 6: 3959-3962
231. Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. J. Virol. 2000; 74,5:2288-2292
232. Pérez L, Carrasco L. Involvement of the vacuolar H+-ATPase in animal virus entry. J. Gen. Virol. 1994; 75:2595-2606
233. Ohkuma S, Poole B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978; 75,7:3327-3331
234. Greber UF. Signalling in the viral entry. Cell Mol. Life Sci. 2002; 59:608-629
235. English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. Trends Pharm. Sci. 2002; 23,1:40-45
236. Birakova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JGN, Verin A. MAP kinase in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2005; 289:L75-L84
237. Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. Oncog. 2007; 26:3240-3253
238. Murphy LO, MacKeigan J, Blenis J. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. Mol. Cell Biol. 2004; 24, 1:144-153
239. Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration of immediate early genes products. Nat. Cell Biol. 2002; 4:556-564

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

240. Mody N, Leitch J, Armstrong C, Dixon J, Cohen P. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. FEBS lett. 2001; 502:21-24
241. Terasawa K, Okazaki K, Nishida E. Regulation of c-fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. Genes to Cells 2003; 8:263-273
242. Ren X, Ma X, Li Y. All-trans retinoic acid regulates *c-jun* expression via ERK5 in cardiac myoblasts. J. Nutrit. Biochem. 2007; 18:832-838
243. Gilley R, March HN, Cook SJ. ERK1/2 but not ERK5 is necessary and sufficient for phosphorylation and activation and c-fos. Cell Signal. 2009; 21:969-977
244. Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobila R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K. Genetic Analysis of hepatitis C virus defective genome and its infectivity in vitro. J Virol. 2009; 83,13:6922-6928
245. Yagi S, Mori K, Shiota K. Implication of the HCV subgenome discovery for viral pathogenesis, persistence and proliferation. Fut. Virol. 2006; 1,4: 425-433
246. Yagi S, Mori K, Tanaka E, Matsumoto A, Sunaga F, Kiyosawa K, Yamagushi K. Identification of novel HCV subgenome replicating persistently in chronic active hepatitis C patients. J. Med. Virol. 2005; 77:399-413
247. Pacini L, Graziani R, Bartholomew L, De Francesco R, Paonessa G. Naturally occurring Hepatitis C virus subgenomic deletions replicate efficiently in Huh-7 cells and are trans-packaged in vitro to generate infectious defective particles. J. Virol. 2009; 83,18:9079-9093
248. Clark K.B, Lin S.C, Humphrey C, Foytich K, Esona M, Wang Y, Liu M, Jiang B. Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. Virol. 2009;387:267-272
249. Cao Y,Lu Z, Sun J, Bai X, Sun P, Bao H, Chen Y, Guo J, Li D, Liu X, Liu Z. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. Veter. Microbiol. 2009; 137:10-17
250. Prel A, Le Gall-Reculé G, Jestin V. Achievement of avian influenza virus-like particles that could be used as a subunit vaccine against low pathogenic avian influenza strains in ducks. Avian Pathol. 2008; 37,5:513-520
251. Clayton, R.F, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Bhella D, Patel H. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. J. Virol. 2002; 76,15: 7672-7682
252. Xiang J, Wünschmann S, George S.L, Klinzman D, Schmidt W.N, LeBrecque D.R, Stapleton J.T. Recombinant hepatitis C virus-like particles expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. J. Med. Virol. 2002; 68,4: 537-543
253. Triyatni M, Saunier B, Maruvada P, Davis A.R, Ulianich L, Heller T, Patel A, Kohn L.D, Liang T.L. Interaction of hepatitis C virus-like particles and cells: a model system for studying viral binding and entry. J. Virol. 2002; 76,18: 9335-9344
254. Zhao W, Liao G.Y, Jiang Y.J, Jiang S,D. No requirement of HCV 5'NCR for HCV-like particles assembly in insect cells. World J. Gastroenterol. 2003; 9,10: 2226-2231
255. Charpilienne A, Nejmeddine M, Berois M, Parez N, Neumann E, Hewat E, Trugnan G, Cohen J. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. J. Biol. Chem. 2001; 276:29361-29367
256. Finke S, Brzozka K, Conzelmann K.K. Tracking fluorescence-labeled rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles. J. Virol. 2004; 78:12333-12343
257. Gilbert L, Toivola J, Lehtomaki E, Donaldson L, Kapyla P, Vuento M, Oker-Blom C. Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells. Biochem. Biophys. Res. Com. 2004; 313:878-887
258. Gilbert L, Toivola J, Valilehto O, Saloniemi T, Cunningham C, White D, Makela A.R, Korhonen E, Vuento M, Oker-Blom C. Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles. J. Nanobiotech. 2006; 4:13
259. Desai P, Person S. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. J. Virol. 1998; 72:7563-7568
260. McDonald D, Vodicka M.A, Lucero G, Svitkina T.M, Borisy G.G, Emerman M, Hope T.G. Visualization of the intracellular behaviour of HIV in living cells. J. Cell Biol. 2002; 159:441-452
261. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. Nat. Cell Biol. 2001; 3:473- 484

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

262. Dundr M, McNally J, Cohen J, Misteli T. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. J. Struct. Biol. 2002; 140:92-99
263. Mark J, Li X, Cyr T, Fournier S, Jaentschke B, Hefford M.A. SARS coronavirus: Unusual lability of the nucleocapsid protein. Bioch. Res. Com. 2008; 377,2:429-433
264. Kaito M, Watanabe M.S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. J. Gen. Virol. 1994; 75:1755-1760
265. Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Musacchio A, Falcón V, Suarez V.M, Martinez G, Guerra I, Paz-Lago D, Morera Y, de la Rosa M.C, MoralesGrillo J, Dueñas-Carrera S. In vitro assembly into virus-like particles is an intrinsic quality of Pichia pastoris derived HCV core protein. Biochem. Biophys. Res. Com. 2004; 325,1:68-74
266. Blanchard E, Hourioux C, Brand D, Ait-Goughoulte M, Moreau A, Trassard S, Sizaret P.Y, Dubois F. Hepatitis C virus-like particle budding: role of the core protein and importance of its Asp111. J. Virol. 2003; 77,18:10131-10138
267. Lorenzo L.J, Dueñas-Carrera S, Falcón V, Acosta-Rivero N, González E, de la Rosa M, Menéndez I, Morales J. Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Com. 2001; 281,4: 962-965
268. Yoon S.W, Lee S.Y, Won S.Y, Park S.H, Park S.Y, Jeong Y.S. Characterization of homologous defective interfering RNA during persistent infection of Vero cells with Japanese encephalitis virus. Mol. Cells 2006; 21:112-120
269. Lancaster M.U, Hodgetts S.I, Mackenzie J.S, Urosevic N. Characterization of defective viral RNA produced during persistent infection of Vero cells with Murray Valley encephalitis virus. J. Virol. 1998; 72:2474-2482
270. Huang A.S, Baltimore D. Defective viral particles and viral disease processes, Nat. 1970; 226:325-327
271. Pelkmans L, Püntener D, Hellenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalisation of caveolae. Science 2002;296:19,535-539
272. Parton RG, Joggerst B, Simons K. Regulated internalisation of caveolae. J. Cell Biol. 1994; 127,5:1199-1215
273. Li Y, Paz Marzolo M, van Kerkhof P, Strous G.J, Bu G. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. J. Biol. Chem. 2000; 275,22:17187-17194
274. Stone M, Jia S, Do Heo W, Meyer T, Konan K. Participation of Rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. J. Virol. 2007;81,9:4551-4563
275. Hubbard S.R, Miller W.T,. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. Curr. Opin. Cell. Biol. 2007; 19,2:117-123
276. Hunker CM, Hall KJ, Giambini ML, Veisaga ML, Barbieri MA. Role of Rab5 in insulin receptor-mediated endocytosis and signaling. Arch. Bioch. Bioph. 2006, 449:130-142
277. Barbieri AM, Fernandez-Pol S, Hunker C, Horazdovsky BH. Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction. Eur. J. Cell. Biol. 2004; 83:305-314
278. Kermorgant S, Parker P.J. c-Met signalling: spatio-temporal decisions. Cell Cycle 2005; 4,3:352-355
279. Kermorgant S, Parker P.J. Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. J. Cell. Biol. 2008; 182,5:855-863
280. Giambartolomei S, Covone F, Levrero M, Balsano C. Sustained activation of the Raf/MEK/ERK pathway in response to EGF in stable cell lines expressing the hepatitis C virus (HCV) core protein. Oncog. 2001; 20:2606-2610
281. Voisin L, Julien C, Duhamel S, Gopalbhai K, Claveau I, Saba-El-Leil MK, Rodrique-Gervais IG, Gaboury L, Basik M, Meloche S. Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. BMC Cancer 2008; 8:331-352
282. Sebolt-Leopold JS. MEK inhibitors: a therapeutic approach to targeting the Ras-MAP kinase pathway in tumors. Curr. Pharm. Des. 2004; 10,16:1907-1914
283. Vaysberg M, Hatton O, Lambert SL, Snow AL, Wong B, Krams SM, Martinez OM. Tumor-derived variants of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induce sustained ERK activation and c-fos. J. Biol. Chem. 2008; 283,52:36573-36585

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

284. Cai Y, Liu Y, Zhang X. Induction of transcription factor Egr-1 gene expression in astrocytoma cells by murine coronavirus infection. Virol. 2006;25,355,2:152-163
285. Romagnoli L, Sariyer IL, Tung J, Feliciano M, Sawaya BE, Del Valle L, Ferrante P, Khalili K, Safak M, White MK. Early growth responce-1 protein is induced by JC virus infection and binds and regulates the JC virus promoter. Virol. 2008;375,2:331-341
286. Fu ZF, Weihe E, Zheng YM, Schäfer MKH, Sheng H, Corisdeo S, Rauscher III F, Koprowski H, Dietzschold B. Differential effects of rabies and borna disease viruses on immediate early and lat response gene expression in brain tissues. J. Virol. 1993;67,11:6674-6681
287. Eto K, Kaur V, Thomas M. Regulation of insulin gene transcription by the immediate-early growth response gene Egr-1. Endocrinol. 2006; 147,6:2923-2935
288. Adamson E, Mercola D. Egr1 transcription factor: Multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. Tumor Biol. 2002; 23:93-10
289. Eid MA, Kumar V, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ. Expression of early growth response genes in human prostate cancer. Cancer Res. 1998; 58:2461-2468

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

SYMMARY

An estimated 3% of the world population is infected by hepatitis C (HCV). HCV is an enveloped positive-strand RNA virus, with a genome of approximately 9.600 nucleotides, encoding for structural (Core, E1, E2, p7) and non-structural (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) proteins. In most infected individuals, this virus evades the immune system and establishes a chronic infection that can progress to cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. HCV proteins are involved in the development of hepatocellular carcinoma as they modulate MAPK signalling pathway. It has been proposed that capsids from a number of viruses like the Ebola virus, can produce signalling events. The HCV nucleocapsid is surrounded by a lipid layer containing glycoproteins E1 and E2. However, different forms of HCV particles may exist in the circulation of infected individuals and among them naked capsids have also been reported. Furthermore, novel HCV subgenomes with in-frame deletions of both envelope proteins (E1 and E2), were identified in the liver, as well as in the serum of HCV infected individuals.

Recently Tsitoura *et al.* reported the generation of recombinant non-enveloped HCV core particles in the absence of other HCV proteins. More importantly, this report demonstrated that these naked capsids can be taken up by cells and induce cell-signalling phenomena. Based on the previous, we aimed in developing a strategy for the labelling of the HCV non-enveloped capsids by using the enhanced green fluorescent protein (GFP). GFP has been fused to a great number of proteins in order to study their intracellular trafficking and localization. We used the baculovirus expression system to generate recombinant fluorescent non-enveloped capsid-like particles (fluorescent HCVne) that possess identical properties to the one already described. The chimeric proteins core$_{173}$-GFP, GFP-core$_{191}$ and GFP-core$_{173}$ produced can be efficiently expressed and self assembled to form fluorescent non-enveloped capsid-like particles that can efficiently be taken up by human cells. In addition, we observed the trafficking of these fluorescent HCVne particles in live-microscopy, providing evidence of an attractive tool for viral tracking.

To understand the biological significance of naked HCVne particles, we investigated the mechanism of entry of these particles. Recent studies have revealed a surprising variety of endocytic routes for enveloped as well as non-enveloped viral capsids including clathrin-mediated and caveolin-mediated encodytosis. Hepatitis C enveloped particles use the clathrin-mediated endocytosis, but to our knowledge no information about the entry

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

mechanism of HCV non-enveloped particles exist. Data presented here, suggest that HCVne particles penetrate into hepatic cells via pH dependent clathrin-mediated endocytosis. During this process different MAPK pathways become activated.

Entry process starts with the attachment of HCVne particles at the cell surface which is followed by a clathrin-mediated internalization, and localization of particles to early endosomes. Internalization occurs relatively fast, with the majority of entering viral particles internalized in early endosomes between 9 to 15 minutes During the endocytosis of the particles from the cellular surface to early endosome the pH changes in endosomes seem to be implicated. In addition, phosphorylated proteins and particularly tyrosine phospho-proteins, as well as MAPK-p38 protein are shown to be important during this trafficking.

After entering early endosomes, HCVne particles moved along from endosomal to lysosomal compartments, through involvement of microtubules network. Data presented here shows a colocalization of HCVne particles with late endosomes at 1 hour post incubation reaching maximum colocalization with lysosomes at 4 hours. During early endosome-lysosome transport, different phosphorylated proteins are showed to be essential, such proteins are the serine/threonine and tyrosine phosphoproteins, as well as phospho-$ERK_{1/2}$ and possibly phospho-p38.

Previously described data showed specific ERF translocation from the nucleus to the cytoplasm after HCVne particles uptake, suggesting a possible activation of $ERK_{1/2}$ pathway. In this report we described that $ERK_{1/2}$ present a maximum activation 30 min after internalization that disappears when cells are treated with specific $MEK_{1/2}$ inhibitors and is shown to be endocytosis-dependent. In addition, HCVne particles endocytosis produce a sustained $ERK_{1/2}$ activation and a nuclear $ERK_{1/2}$ accumulation. Magnitude and duration of $ERK_{1/2}$ phosphorylation is important for the immediate early genes (IEG) promoter activation as well as for the stability of the produced proteins. In this study we show an increased activation of IEG *c-fos* and *egr-1,* totally or partially attributed to the $ERK_{1/2}$ pathway. This constitutes an interesting observation as *c-fos* and *egr-1* has been found to be overexpressed with high frequency in aggressive and invasive hepatocarcinomas making these genes an important target for putative therapy.

We have also investigated another important signalling molecule of the MAPK pathway, the ERK5. ERK5, also known as BMK1, is a MAPK that presents approximately 80% of similarities with $ERK_{1/2}$. This kinase contains the typical ERK phosphoylation motif (TEY) and a unique C-terminal region that is believed to be responsible for its distinct biological activities. ERK5 activity is increased in response to growth factors, oxidative

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

stress and hyperosmolarity, via a direct phosphorylation by MEK5. It is important to note that ERK5 has been implicated in different types of cancers and angiogenesis. We were able to show that ERK5 can be activated by HCVne particles, via MEK5 protein, but not from endogenously expressed core or NS5A proteins. In addition, a well known downstream target of this pathway, *mef2* also seems to be affected.

Although our knowledge about HCV mechanism of entry,replication and infectivity are progressing a great number of aspects are still left unanswered. The evaluation of the impact of cellular environmental modifications produced by signalling events similar to those produced by the endocytotic properties of naturally occurring HCVne could potentially be of major importance for HCV life cycle and severity of the disease.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

Αποσπάσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάστηκαν στα ακόλουθα συνέδρια :

- K. Katsarou, A. Lavdas, E. Serti, P. Tsitoura, P. Mavromara , U. Georgopoulou

'Endocytosis of recombinant HCV non-enveloped capsid-like particles produce $ERK_{1/2}$ - $MAPK_s$ signaling events'

16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses (Nice, October 2009)

(Αναρτημένη ανακοίνωση)

- Κ. Κατσαρού, Ε. Σέρτη, Ρ. Τσίτουρα, Π. Μαυρομαρά, Ο. Γεωργοπούλου

'Διέγερση των $MAPK_s$ που οφείλεται σε ανασυνδυασμένα γυμνά νουκλεοκαψίδια του ιού της ηπατίτιδας c'

11ο πανελλήνιο ηπατολογικό συνέδριο (Κέρκυρα, 7-11 Μαΐου 2009)

(Αναρτημένη ανακοίνωση)

- Κ. Κατσαρού, Ε. Σέρτη, Π. Τσίτουρα, Ο. Γεωργοπούλου

'Μελέτη της κυτταρικής σηματοδοτήσεως των μιτογονο – ενεργοποιούμενων κινασών ERKs (MAPKs-ERKs) οφειλομένης σε ανασυνδιασμένα γυμνά νουκλεοκαψίδια του ιού της ηπατίτιδας C'

9th Greek virology congress (Athens, November 2008)

(Αναρτημένη ανακοίνωση)

- K. Katsarou, E. Serti, P, Tsitora, P. Mavromara, U. Georgopoulou

'Signaling events following cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsids-like particles'

FEBS- course: New developments in quantitative molecular bioscience (Spetses, September 2008)

(Αναρτημένη ανακοίνωση και επιλεγμένη προφορική παρουσίαση)

- U. Georgopoulou, P, Tsitoura, E. Serti, K. Katsarou, M. Kalamvoki, P. Mavromara

'The hepatitis C NS5A protein activates PP2A and impairs T cell proliferation'

14th International symposium on hepatitis C virus and related viruses (Glasgow, September 2007)

(Αναρτημένη ανακοίνωση)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΝΔΡΙΩΝ

- E. Serti, K. Katsarou, P. Foka, G. Thyphronitis, P. Tsitoura, P. Mavromara, U. Georgopoulou

'Modulation of p38 signaling pathway by HCV non-enveloped capsid like particles' 34th FEBS Congress, Life's Molecular Interactions (Prague, 4-9 July 2009)
FEBS J. 276: 251-251 Suppl 1 jul 2009

- K. Katsarou, E. Serti, P. Tsitoura, P. Mavromara and U. Georgopoulou

'Signaling events upon cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsid like particles'
33th FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, biochemistry of cell regulation (Athens, June 2008)
FEBS J. 275: 271-271 Suppl 1 Jul 2008

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

- K. Katsarou, A.A. Lavdas, P. Tsitoyra, E. Serti, P. Markoulatos, P. Mavromara, U. Georgopoulou

'Η ενδοκύτωση των νουκλεοκαψιδίων χωρίς φάκελο του ιού της ηπατίτιδας C προκαλούν διέγερση της σηματοδότησης MAPKs-$ERK_{1/2}$'
60th National conference of biochemistry and molecular biology (Αθήνα, Νοέμβριος 2009)

- K. Katsarou, E. Serti, P, Tsitora, P. Mavromara and U. Georgopoulou

'Signaling events following cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsids-like particles'
FEBS- Summer School: New developments in quantitative molecular bioscience (Spetses, September 2008)
(Επιλεγμένη προφορική παρουσίαση)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 137.114.118.212

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΡΑΒΕΙΟ ΠΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ
60ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ

Απονέμεται στην

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

για την εργασία "Η ενδοκύτωση των νουκλεοκαψιδίων χωρίς φάκελο του ιού της Ηπατίτιδας C προκαλούν διέγερση της σηματοδότησης MAPKs-ERK1/2", Κατσαρού Κ., Λάβδας Α.Α., Τσίτουρα Π., Σέρτη, Ε. Μαρκουλάτος Π., Μαυρομαρά Π. & Γεωργοπούλου Ο.

Αθήνα, 22 Νοεμβρίου 2009

ΚΩΝ/ΟΣ ΔΡΑΪΝΑΣ
ΠΡΟΕΔΡΟΣ

EEBMB

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ
ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Biochimie 91 (2009) 903–915

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Green fluorescent protein – Tagged HCV non-enveloped capsid like particles: Development of a new tool for tracking HCV core uptake

Konstantina Katsarou [a,1], Elisavet Serti [a,1], Panagiota Tsitoura [a], Alexandros A. Lavdas [b], Agoritsa Varaklioti [c], Angela-Maria Pickl-Herk [d], Dieter Blaas [d], Devrim Oz-Arslan [a], Rong Zhu [e], Peter Hinterdorfer [e], Penelope Mavromara [a], Urania Georgopoulou [a,*]

[a] Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute, 11521 Athens, Greece
[b] Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Hellenic Pasteur Institute, Greece
[c] 2nd Regional Blood Transfusion and Haemophilia Centre, Laikon General Hospital, Greece
[d] Max F. Perutz Laboratories, Medical University of Vienna, Austria
[e] Institute for Biophysics, J. Kepler University, A-4040 Linz, Austria

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2009
Accepted 15 April 2009
Available online 4 May 2009

Keywords:
Hepatitis C virus
Fluorescent non-enveloped capsid-like particle
Cellular uptake

ABSTRACT

Circulating 'free' non-enveloped Hepatitis C virus (HCV) core protein has been demonstrated in HCV-infected patients, and HCV subgenomes with deletions of the envelope proteins have been previously identified. Initial studies from our laboratory, previously published, indicated that expression of HCV core in insect cells can direct the formation of capsid-like particles lacking the envelope glycoproteins. These protein nanospheres, morphologically similar to natural capsids, were shown to be taken up by human hepatic cells and to produce cell-signalling events. To follow the intracellular fate of these particles we fused the core protein to eGFP. We demonstrate that the chimeric proteins core$_{173}$-eGFP, eGFP-core$_{191}$ and eGFP-core$_{173}$ can be efficiently expressed, self-assembled, and form fluorescent non-enveloped capsid-like particles. By using confocal microscopy and FACS analysis, we provide evidence that the fluorescent nanospheres can not only enter human hepatic cells – the main target of HCV – but also human immune cells such as T and B lymphocytes, as well as human myeloid leukaemia cells differentiated along the monocyte/macrophage-like pathway. The fluorescent particles might thus be used to trace the intracellular trafficking of naked HCV capsids as showed by live microscopy and to further understand their biological significance.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is an enveloped virus belonging to the Flaviviridae family [1]. Its nucleocapsid is surrounded by a lipid bilayer containing the glycoproteins E1 and E2. However, different forms of HCV particles have been found in the circulation of infected individuals, among them naked capsids [2,3]. A plausible explanation for the presence of non-enveloped particles in the blood is their release into the circulation by the lysis of infected hepatocytes that accompanies liver inflammation. Non-enveloped particles have also been detected as viral inclusions in the cytoplasm of liver cells of infected patients [40]. Furthermore, HCV subgenomes with in-frame deletions of both envelope proteins were identified with relatively high abundance in the liver as well as in the serum of HCV infected individuals. The biological significance of these findings remains unclear although recently it was suggested that defective HCV clones might be associated with poor response to combination therapy [4–6]. Defective RNA viral genomes lacking the envelope coding sequence or possessing a natural stop codon have also been recently reported for other flaviviruses with important implications for their evolutionary dynamics and viral persistence [35].

Recently, Tsitoura et al. [7] reported the generation of recombinant non-enveloped HCV core particles in the absence of other HCV proteins and, more importantly, demonstrated that these naked capsids can be taken up by cells and induce cell-signalling phenomena. These intriguing properties of HCV core protein can be of great interest as a recent report highlights the possibility that subgenomic RNA resembling natural occurring deletion mutants are efficiently trans-packaged into virus-like particles by helper virus or helper cell lines [36].

For these reasons we aimed at developing a strategy for the labelling of the HCV non-enveloped capsid by using enhanced

* Corresponding author. Tel.: +30 210 6478876; fax: +30 210 6426323.
E-mail address: uraniag@pasteur.gr (U. Georgopoulou).
[1] Authors contributed equally.

0300-9084/$ – see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biochi.2009.04.016

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

green fluorescent protein (eGFP). GFP and derivatives from it such as eGFP have been fused to a great number of proteins in order to study their intracellular trafficking and localization; this technique provides an attractive tool for viral tracking [8–13].

We here demonstrate that chimeric proteins core$_{173}$-eGFP, eGFP-core$_{191}$ and eGFP-core$_{173}$ can be efficiently expressed and self assembled in the baculovirus system. The three fusion proteins all form fluorescent non-enveloped capsid-like particles that can efficiently be taken up by human cells, allowing for the study of their intracellular trafficking to further understand the biological significance of naked HCV capsids.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

The HCV genotype 1a (H) cDNA [14] was used to generate the plasmid constructs used in this study. Core sequences encoding the full-length C_{191} and the truncated form C_{173} (this form is generated after cleavage by signal peptide peptidase [15]) were amplified by PCR using pHPI 1327 [7] as a template with the following primers: C_{191} forward 5′ ggaagatct**atg**acgaatcctaaacct 3′, C_{191} reverse 5′ ggaagatct**tta**gcctgaagcgggcacggtcaggca 3′, C_{173} reverse 5′ ggaagatct**tta**agagcaaccaggaaggttccctgt 3′ (BglII sites underlined, start and stop codons in bold). The PCR fragments were digested with BglII and ligated with BamHI-digested pEGFP/C1 to generate plasmid pHPI 1739 with the eGFP sequence fused in frame with C_{173} and pHPI 1738 with the C_{191} fused to the C-terminus of eGFP. Core$_{173}$ was fused to the N-terminus of eGFP via PCR by using pHPI 1327 as template with the following primers: $C_{173\text{-}c}$ forward 5′ cgcggatcc**atg**acgaatcctaaacctcaa 3′ and $C_{173\text{-}c}$ reverse 5′ gcgggatccagagcaaccaggaaggttccctgt 3′ (BamHI underlined and start codon in bold). The PCR fragments were digested with BamHI and ligated with BamHI-digested pEGFP/N3 to generate plasmid pHPI 1735 with C_{173} fused in frame to the amino terminus of eGFP.

To generate the recombinant baculoviruses (Bac 1736, Bac1740 and Bac 1741) expressing the HCV core-eGFP fusions under the polyhedrin promoter, the BacPAK8 (Clonetech) vector was used. The NotI-EcoRI C_{173}-eGFP cassette obtained from pHPI 1735 was cloned into the NotI – EcoRI site of BacPaK8 yielding pHPI 1736. Similarly, NheI – EcoRI fragments released from pHPI 1738 and pHPI 1739 (eGFP-C_{191} and eGFP-C_{173} respectively) were cloned into the XbaI – EcoRI sites of BacPAK8 yielding pHPI1740 and pHPI1741, respectively. For generation of the recombinant pHPI 1746 control baculovirus, the eGFP coding region was isolated from pEGFP/N3 as EcoRI–NotI fragment and subcloned into the EcoRI–NotI sites of the BacPAK8 plasmid.

The GFP-ERF plasmid [44] was used for transient expression of ERF, and transfection in Huh7 cells was performed as previously described [7].

2.2. Cells and construction of recombinant baculoviruses

The *Spodoptera frugiperda* Sf9 cell line was used for the generation and propagation of recombinant baculoviruses Bac1736, Bac1740, Bac 1741 and Bac 1746. Cells were maintained in Sf900II SFM medium (Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum at 27 °C. Recombinant baculoviruses were obtained following standard protocols using Baculogold linearized DNA (BD Biosciences), and viruses were propagated in Sf900II SFM medium supplemented with 5% fetal bovine serum and 50 μg/ml gentamicin (Gibco). The titers of the viral stocks were determined by limited dilution on Sf9 cells. Bac 1432 was previously described [7].

2.3. SDS-PAGE and immunoblotting analysis

The time-course of expression of the different forms of the HCV core protein fused to GFP in Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus Bac1736, Bac 1741 and Bac 1740 (or Bac1746 as a negative control) was determined by immunoblotting with polyclonal [7] or monoclonal (Alexis Biochemicals) anti-core and anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology Inc.) antibodies. Cells grown in 6-well plates were infected at a multiplicity of infection (MOI) of ~7 and harvested at different times post infection (p.i.). An aliquot of the lysates was subjected to 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by electroblotting to nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). Membranes were stained with Ponceau S (Sigma) and blocked with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS), 0.01% Tween 20 (Sigma) for 1 h, before the addition of the primary antibodies. The blots were then probed with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulins (Chemicon) and were finally visualized with the ChemiLucent detection system (Chemicon).

2.4. Sucrose density gradient analysis

Sf9 cells (approximately 4×10^7) were infected with the Bac1736, Bac 1740 and Bac 1741, respectively, at MOI = 5 and harvested at 2 day p.i. The capsid-like particles were isolated from cell lysates, according to the procedure described before [7,16]. Briefly, the cleared cell lysate, after treatment with RNAse (Sigma) and DNAse (Promega Corp.) for 30 min, was pelleted through a 30% w/v sucrose cushion for 3h at 30,000 rpm. The pellet was resuspended in 50 mM Tris, 100 mM NaCl and layered onto a discontinuous 20–60% w/w sucrose gradient and ultracentrifuged at 35,000 rpm for 22 h (SW41 Beckman rotor).

Fractions (600 μl each) were collected from the top of the gradient, the density was determined by refractometry, and HCV antigen was analyzed both with the Ortho HCV core antigen ELISA test system (dilution 1:1000 in PBS), and by SDS-PAGE followed by immunoblotting. Total protein concentrations were measured with the Bio-Rad protein assay. The fractions were stored at −80 °C. Lysates from cells infected with the Bac 1746 control virus were fractionated by the same procedure.

2.5. Visualization of chimeric recombinant capsids

2.5.1. Immunofluorescence

Immunofluorescence microscopy was used to visualize putative HCV capsids, to estimate their diameter, and to confirm their antigenic nature. As standard for calibration, we used red fluorescent microspheres (Molecular Probes), 0.1 μm in diameter at 1:10,000 dilution.

A mixture of the different GFP positive fractions (1 μl) and of properly diluted microspheres (5 μl) was spread and air-dried on a glass slide. After mounting with mowiol, the slides were examined by confocal microscopy.

For colocalization of the GFP-tagged particles with core antigen a small quantity of the GFP positive gradient fraction from the various baculovirus extracts was spread and air-dried on a glass slide and processed for immunostaining as described before [7]. After fixation, the sample was incubated with polyclonal anti-core IgG followed by incubation with the anti-rabbit Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody (Molecular Probes). After mounting, the slides were examined with a Leica TCS-SP5 confocal microscope equipped with a 63× objective. Quantification was proceed with Image-Pro plus (Media Cybernetics).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

2.5.2. Electron microscopy

Sucrose gradient fractions positive for HCV core were pooled, dialyzed against PBS to remove sucrose and further concentrated by centrifugation with a Vivaspin 4 ml concentrator filter (Sartorius). A drop of the sample was applied to the grid for 1–2 min, and negatively stained with phosphotungstic acid or uranyl acetate.

2.5.3. Atomic force microscopy (AFM)

Bac 1741 GFP/core positive fraction (5 μl) was applied to clean silicon chip with 5 μl Tris-Ni buffer (50 mM Tris, 1 mM $NiCl_2$, pH7.4). After 30 min incubation, the sample was rinsed with 250 μl Tris-Ni buffer for 10 times. A Mac-mode PicoSPM magnetically driven dynamic-force microscope (Molecular Imaging, Phoenix, AZ) was used. The topography images were recorded in the Magnetic AC (Mac) mode with MacLevers (Molecular Imaging) of about 0.03 N/m nominal spring constant in Tris-Ni buffer at room temperature. Measurements were performed with about 10 nm oscillation amplitude at 5 kHz driving frequency. Images were measured at 1.3 Hz lateral scan rate.

2.6. Analysis of cellular uptake

2.6.1. Huh7 cells

Huh7 cells were maintained in Dulbecco's MEM (Biochrom AG) containing 10% fetal calf serum. To study uptake, cells grown on coverslips in 24-well plates were incubated with 5 μl (approximately 10 ng core protein) of purified HCV capsid-like particles (peak fractions). Incubation was performed at 37 °C, in 300 μl of DMEM for 60 min. Where indicated, cells were incubated at 4 °C. Heat-denatured (1 h at 95 °C) core-fraction, soluble GFP protein and control preparation (the corresponding fraction of control virus-infected cells) were used as negative controls. Uptake was analyzed by immunofluorescence. Briefly, after washing to remove non-bound material, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at RT and remaining reactive groups were blocked with 100 mM glycine. In some slides nuclei and actin were counterstained for 15 min with To-Pro3 (1:1000 dilution in PBS) and phalloidin Alexa 546 (1:1000 dilution in PBS) (Molecular Probes), respectively. Cells were permeabilized with 0.02–0.1% TX100, and incubated with the anti-core antibody [7] at a dilution of 1:100 for 45 min, followed by anti-rabbit Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody (Molecular Probes) diluted 1:1000 for 45 min. Slides were examined with a Leica TCS-SP5 confocal microscope. Internalisation of the capsids by the host cells and cytoplasmic transport were monitored at the indicated times by time lapse live imaging microscope.

For live cell imaging we used an inverted time-lapse Olympus X181 Cell-R microscope equipped with a Hamamatsu CCD ORCA/AG camera and a 100× objective. Cells were maintained in 37°c and 70% humidity. Procession of the pictures was made with the Cell-R software.

2.6.2. Jurkat, BJAB and U937 cells

Jurkat (human T cells), BJAB (human B cells) and U937 (human myeloid –monocytes) were maintained in RPMI (Gibco) containing 10% fetal calf serum. 5×10^5 cells per assay were incubated in 400 μl RPMI without fetal calf serum with increasing volumes of dialyzed fractions from Bac1736, Bac1740 and Bac 1741 in PBS (approximately 80 and 160 ng/ml core protein) for 40 min at 4 °C and 60 min at 37 °C. Non-bound material was removed by three washes in PBS. The cell pellet was then resuspended in 500 μl of PBS containing 2% FCS. Cell-bound fluorescence was analyzed with a FACS-calibur flow cytometer (Becton Dickinson) by using Cellquest 3.11 software. This program produces histograms of each sample and calculates the mean fluorescence intensity of the gated population. Using gating in each cell line, we were able to subtract dead cells and cells that were non-specifically fluorescent. The mean fluorescence intensity directly relates to the bound/internalized GFP tagged non-enveloped particles. Values of each sample were compared with the autofluorescence of mock treated cells and with values from negative controls. All mean fluorescence intensity values were obtained using histogram statistic tools via this software. Autofluorescence, as determined from mock-treated cells, was subtracted. Non-specific fluorescence was determined by incubating the cells with increasing volumes of the corresponding fractions of the control Bac1746. As negative controls we performed incubation of 5×10^5 cells with the same fraction from baculoviruses but heat denatured. As an alternative control incubation of 5×10^5cells with 20 ng of soluble GFP protein was done. Furthermore cells permeabilized with 0.1% saponin (Fluka), incubated with anti-GFP antibody at a dilution of 1:500 for 60 min followed by incubation with anti-rabbit Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody diluted 1:2000 for 45 min, were used as an alternative negative control for non-specific uptake. The mean fluorescence intensity of bound particles was determined after subtraction of non-specific fluorescence.

2.7. Proteinase K assay

To remove particles that were bound but not internalized, the cells were treated for 35 min at 4 °C with 50 μg/ml of proteinase K (Sigma), washed once with PBS containing 1 mM PMSF and 0.2% (w/v) BSA, and three times with PBS/PMSF [42]. Cells were analyzed directly by FACS or lysates subjected to electrophoresis followed by electroblotting and probed with the appropriate antibodies.

3. Results

3.1. Expression of the chimeric HCV core proteins in insect cells infected with recombinant baculoviruses

A schematic representation of the plasmid constructs and the chimeric HCV core protein expressed in Sf9 cells upon infection with Bac 1736 ($core_{173}$-eGFP), Bac 1740 (eGFP-$core_{191}$), Bac 1741 (eGFP-$core_{173}$) are given in Fig. 1A. Bac 1746 lacking core sequences but expressing GFP protein was used as control. Cell lysates were collected at various times p.i. and subjected to immunoblot analysis using monoclonal and polyclonal antibodies directed against HCV core and eGFP proteins.

At 24 h p.i. the fusion proteins were probed with the anti-GFP antibody (Fig. 1, panel B). They migrated with an apparent molecular mass of 46 kDa (Bac 1736 and Bac 1741) corresponding to $core_{173}$ – eGFP (Ia) and eGFP-$core_{173}$ (IIIa), and at 48 kDa for Bac 1740 corresponding to eGFP-$core_{191}$ (IIa). As expected, Bac 1746 showed a strong band at 26 kDa corresponding to eGFP (IVa). The same proteins were also recognized by the core-specific monoclonal antiserum (Ib, IIb, IIIb). HCV core antibody and in some cases GFP antibody recognized additional polypeptides (asterisks) migrating faster than the fusion proteins; these might represent proteins produced by alternative translational mechanisms [17,32,38,43]. As they did not disappear after addition of E64 (inhibitor of cysteine proteases) and pepstatin A (inhibitor of acid proteases) immediately following expression in insect cells it is unlikely that they originate from proteolysis (data not shown) but rather produced by an unknown mechanism. The fragments of core in Bac 1740 and 1741 (eGFP amino terminal to core) revealed mostly by core antibody might stem from translational start at the natural HCV core AUG codon (double asterisks in Fig. 1, panel B: II, III).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

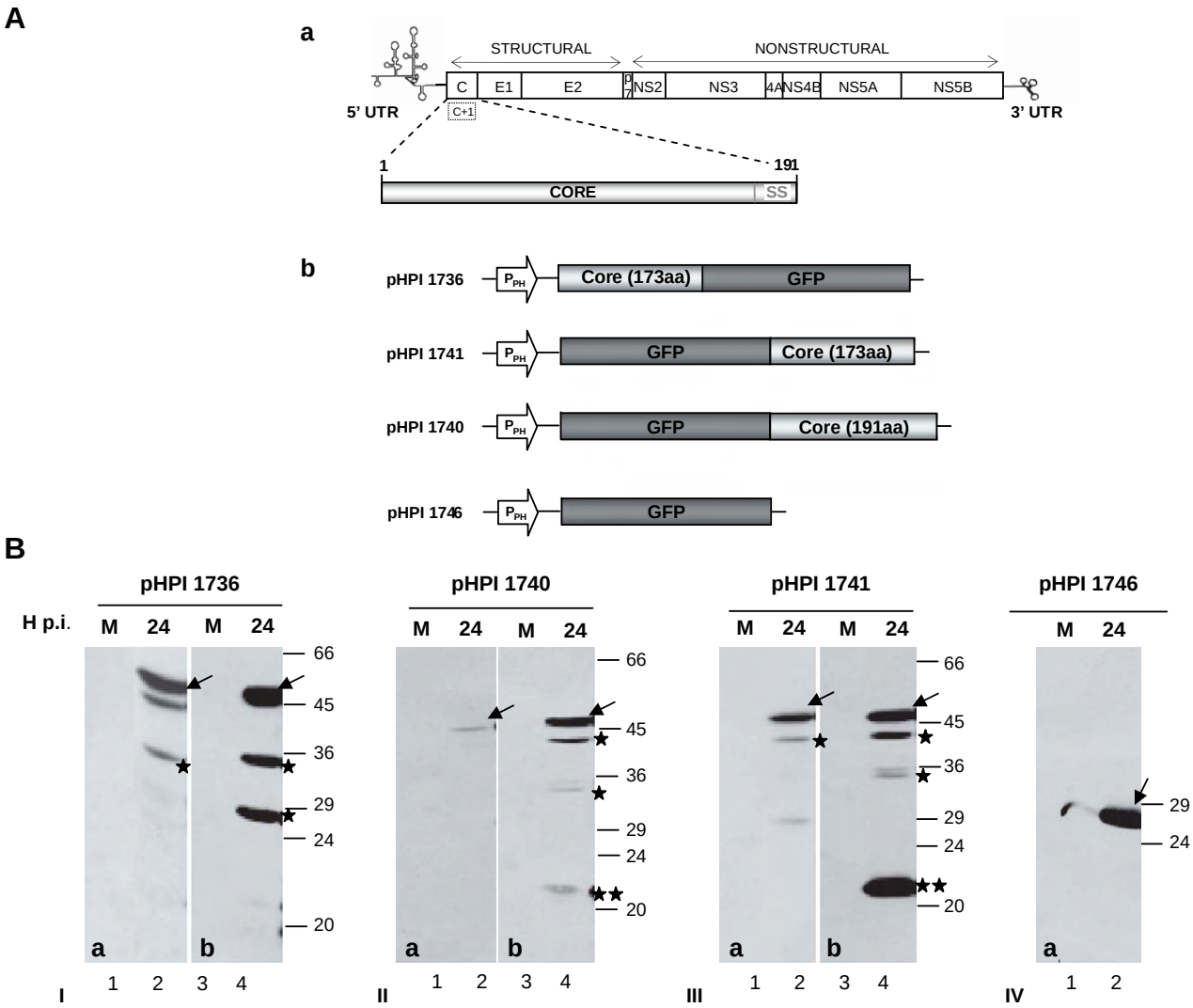


Fig. 1. Schematic representation of the HCV genome and the plasmid constructs used in this study. Panel A: a) Structure of the viral genome b) Plasmid constructs used for the generation of baculoviruses expressing either HCV core fused to eGFP protein (pHPI 1736, pHPI 1740 and pHPI 1741) or eGFP (pHPI 1746). UTR, untranslated region; c+1, alternative reading frame; SS, signal sequence; pPH, polyhedrin promoter. Panel B: Expression of the different HCV core proteins fused to eGFP and eGFP in Sf9 cells infected with the Bac 1736 (I), Bac 1740 (II), Bac 1741 (III) and Bac 1746 (IV) recombinant baculoviruses. Baculovirus-infected Sf9 cells were harvested at the indicated time point p.i. and lysates were analyzed by immunoblotting with the polyclonal anti-GFP antibody (Ia, IIa, IIIa, IV) or the monoclonal anti-core antibody (Ib, IIb, IIIb), lane 1 and lane 3: mock; lanes 2 and 4: 24 h p.i. Long arrows indicate the expected product, asterisks indicate faster migrating protein fragments/forms (see results), double asterisks indicate the presence of core protein.

3.2. Assembly of the chimeric HCV core proteins

We next examined whether these chimeric proteins expressed in insect cells by Bac1736, Bac1740, Bac1741 can be self-assembled. Again Bac1746 expressing only eGFP was used as control. Cell lysates from Sf9 cells infected with the recombinant baculoviruses were subjected to sucrose gradient centrifugation. As shown in Fig. 2 bands corresponding to eGFP-core or core-eGFP were visible in the gradients when illuminated with white light and under UV light (Fig. 2 Panels A, B, C: b arrows). The purity of the preparation was addressed by Coomassie blue staining (data not shown). Addition of 0.1% NP-40, DNase and RNase to the homogenate prior to ultracentrifugation improved the purity of the particles suggesting association with host derived proteins and nucleic acids. Faster migrating bands were repetitively present in some fractions after sucrose gradient purification of the lysates. A possible explanation recently supported by other laboratories is that these bands may correspond to polypeptides produced by alternative translational mechanisms [38,43]. Work is in progress to define the origin of these products. The total protein profile of the gradients followed the core antigen profile as determined by HCV core antigen ELISA. The density of the fractions demonstrating significant immunoreactivity for core antigen was between 1.2 and 1.3 g/cm^3 (Fig. 2, panels A, B, C: a). This is in good agreement with the previously described density for recombinant non-enveloped capsids produced in baculovirus and other systems as well as for serum-derived nucleocapsids [3,7,18,19]. Sedimentation analysis showed a pattern similar to HCV core [7] non-enveloped particles (data not shown).

Fractions were further analyzed by immunoblotting using anti-GFP and anti-core antibodies (Fig. 2, panels A, B, C: c). Again, the total protein concentration correlated well with the peak values for core antigen indicating that the fractions were specifically enriched in core protein. Fractions of the same sucrose density (1.2–1.3 g/cm^3) from the control virus Bac 1746 – expressing only GFP protein - showed no signal in western blot probed with GFP antibody.

As an alternative method to visualize and further analyze these particulate structures we performed confocal and electron microscopy studies. Fluorescence microscopy of a suspension of the

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

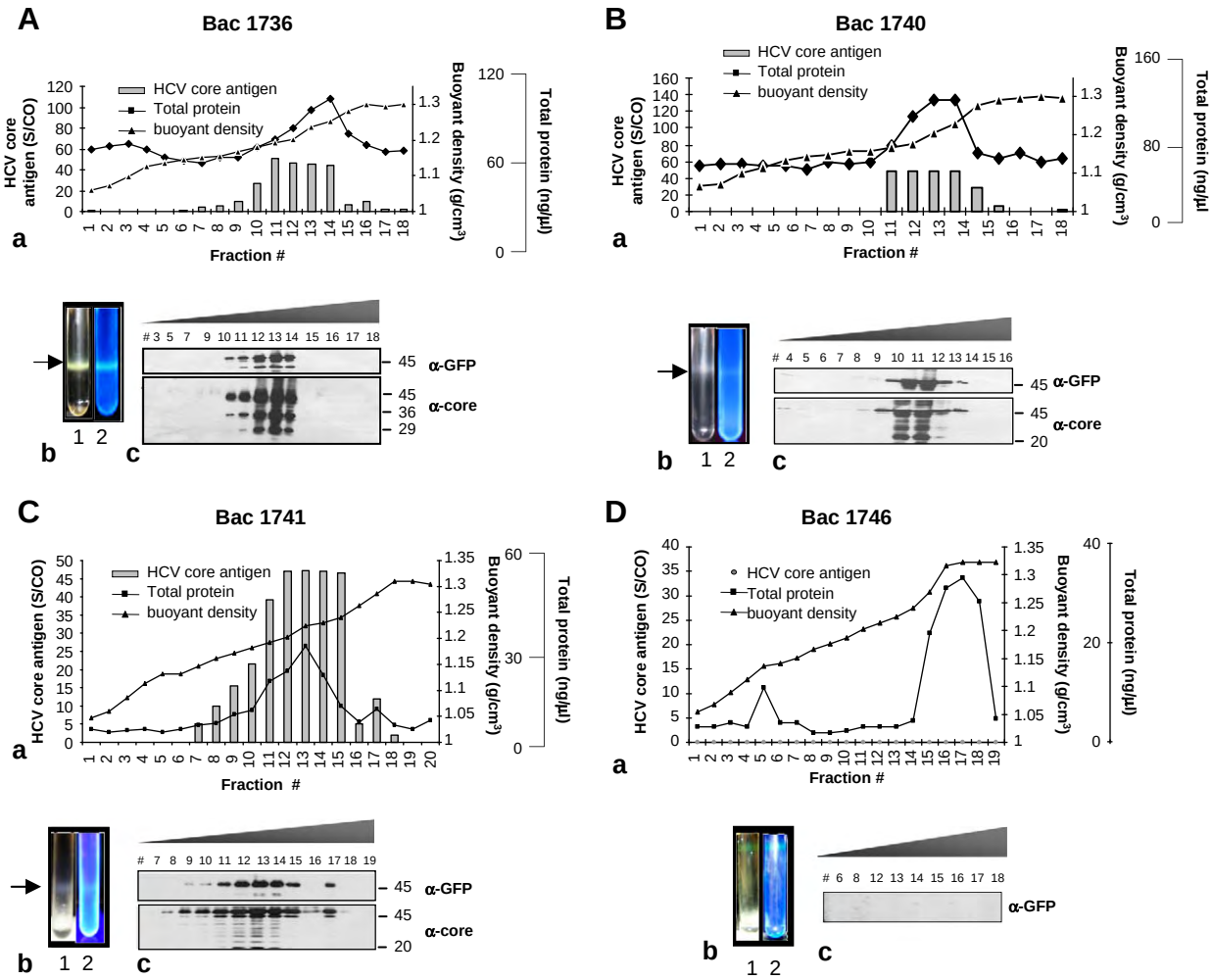


Fig. 2. Sucrose density gradient analysis of Sf9 cell lysates infected with Bac 1736 (Panel A), Bac 1740 (Panel B), Bac 1741 (Panel C) and the control virus Bac1746 (Panel D). a: Gradient fractions were analyzed by HCV core antigen ELISA (grey bars: signal/cutoff – S/CO). Triangles indicate the buoyant density of each fraction; rectangles, total protein concentration. b: After the second ultracentrifugation – for 22 h at 35,000 rpm – the tubes were illuminated with white light (lane 1) or a UV-lamp (lane 2) and photographed. c: Immunoblot analysis of the fractions by using antisera against GFP and core protein respectively.

particulate fractions corresponding to the different eGFP-tagged particles revealed green spots whose number varied with the dilution (data not shown). When compared with added red fluorescence latex beads, the intensities of most of these spots, were fairly similar except from few, which probably corresponded to small aggregates. The heterogeneity in the fluorescence signals was due to particles partially located outside of the focal plane (Fig. 3A). The corresponding fraction at the same sucrose density (g/ml) obtained from the Bac 1746 control baculovirus, as expected, did not show any green spot (Fig. 3, panel A, d). As immunofluorescence staining of single particles was previously shown to be possible [20] we performed this technique in order to visualize colocalization of eGFP tagged capsids with core antigenic structures. As presented in (Fig. 3B) the fluorescent particles mostly colocalized with core antigen, although the presence of larger spots again points to the putative presence of some aggregates.

Fractions, positive for both core and GFP, were dialyzed and subjected to negative staining. Electron microscopy revealed the presence of spherical structures varying from 30 to 55 nm (Fig. 3, Panel C: a, b). Finally, with atomic force microscopy several particles with a height of about 50 nm were seen in the sample from Bac1741 (Fig. 3, Panel C: c). Size exclusion chromatography on Sepharose CL-6B columns and dynamic light scattering (DLS) of the same fractions also revealed the presence of particles with a similar diameter (data not shown). It is of note that in addition many small (15–25 nm) structures were detected in some preparations; these might represent incompletely assembled eGFP-cores or eGFP tagged core isoforms recently described [38,43].

3.3. Uptake of the fluorescent non-enveloped HCV capsids by various cell lines

It has been shown previously that HCV cores can enter permissive cells [7]. To examine whether fluorescent capsids were also competent for uptake, we incubated the different forms of eGFP tagged core (from sucrose gradient peak fractions from Bac 1736, Bac 1740, Bac 1741, and Bac 1746 as a control) with cells. We first investigated uptake into human hepatic cells, the main target for HCV. As recent data point to HCV lymphotropism [21–23,41] we then further extended our study to cells of the immune system.

3.3.1. Human hepatic cells

As shown in Fig. 4, fluorescent spots appeared in Huh7 cells upon incubation with all three recombinant eGFP tagged capsids. When uptake occurred at 37 °C the green fluorescent spots were in close proximity to the nucleus (Fig. 4, panel A: a, b, c). In contrast,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

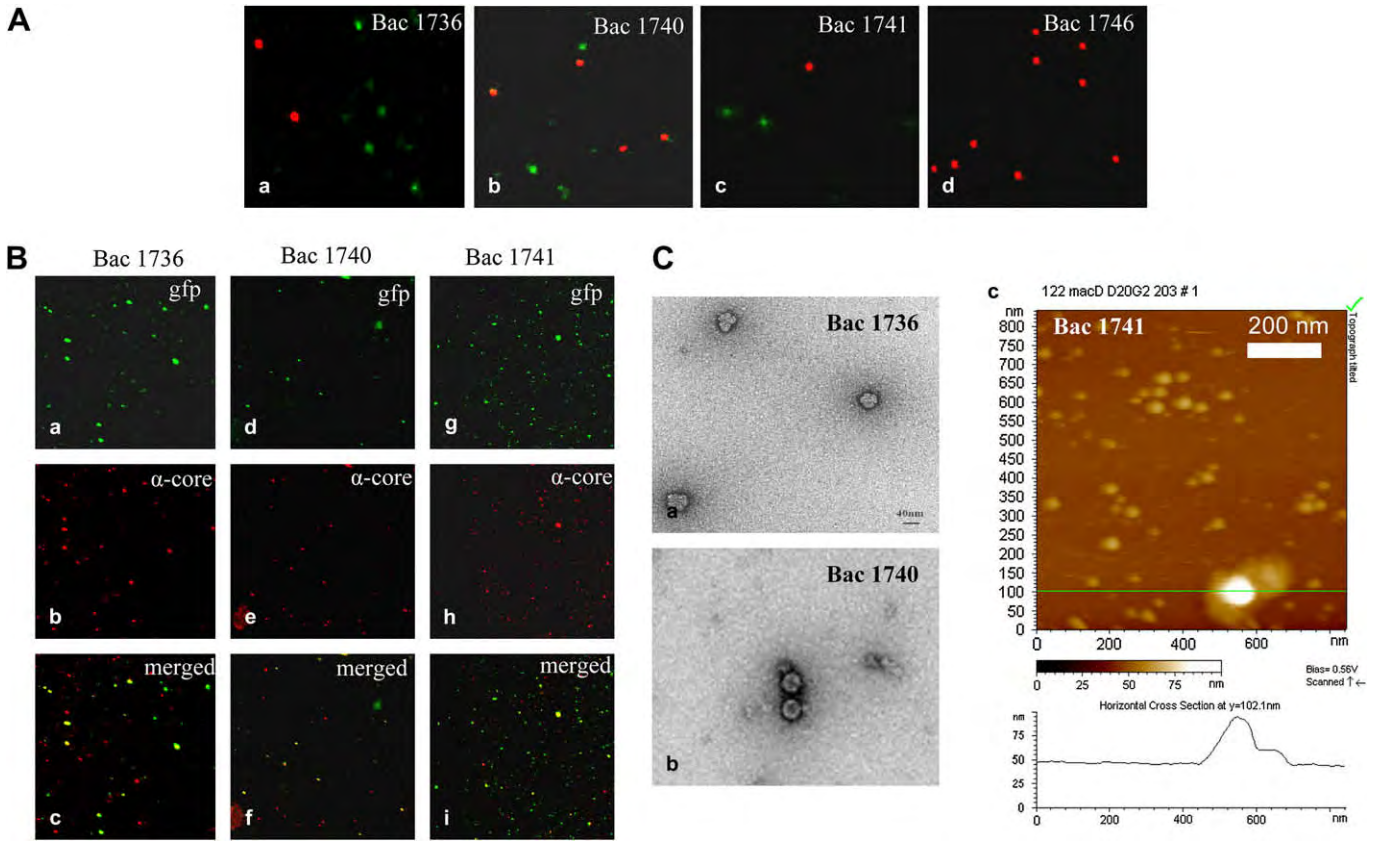


Fig. 3. Visualization of fluorescent chimeric HCV capsid-like particles. Panel A: A mixture of purified chimeric particles from Bac 1736 (a), Bac 1740 (b), Bac 1741 (c) and the control virus Bac 1746 (d) and 100 nm red fluorescent latex beads used for calibration. Panel B: Colocalization of eGFP with core antigen in particles from Bac 1736, Bac 1740 and Bac1741. GFP fluorescence of chimeric particles (a, d, g); Immunolabeling of chimeric particles with polyclonal core antibody (b, e, h); merged images (c, f, i). Arrows indicate colocalization of eGFP with core antigen. Panel C: Electron microscopy of single particles from Bac 1736 (a) and Bac 1740 (b) and observation of Bac 1741 GFP/core positive fraction by atomic force microscopy. The material was purified via equilibrium sucrose density gradient centrifugation, dialyzed against PBS, and concentrated with a Vivaspin 4 ml concentrator filter (Sartorius). Particles were applied to a silicon chip (c).

when the same experiment was done at 4 °C, the spots were not inside the cells but rather at the cell surface and distant from the nucleus (Fig. 4, panel A: d, e, f; particularly well distinguishable in the corresponding yz and xz orthogonal resections). This was further verified by proteinase K assay (see Supplementary Fig. S1 (Panels A and B) indicating that internalization has occurred after incubation of human hepatic cells with the tagged capsids at 37 °C and was almost completely abolished at 4 °C. The pattern of staining was very similar for all three forms, and examination of individual images of the confocal stack suggested that uptake had occurred. Confocal sections are shown in Fig. 4 (panel B: a, b, c). As expected, no signal was present with the control fraction from Bac 1746 (Fig. 4, panel C: a/d) or the same fraction of the fluorescent non-enveloped capsids after heat denaturation (Fig. 4, panel B: d, e, f) indicating that the signal was specific to the GFP tagged non-enveloped capsid-like particles. As an additional negative control we also used soluble GFP protein at a similar concentration or very high concentration; no GFP fluorescence was observed in the sections (Fig. 4, panel C: b/e, c/f). Furthermore, use of GFP antibody in the same controls revealed no signal (data not shown).

The great majority of the fluorescent particles completely colocalized with core antigen as demonstrated in Fig. 5 (panel A: a–k), suggesting that they were internalized without suffering significant degradation similar to the non-tagged capsids (see also Supplementary Fig. S2) previously described [7]. A slight decrease in the colocalization of particulate fractions from Bac 1736 compared to Bac 1740 and Bac 1741 (Fig. 5, panel A: j) can be due to the carboxy-terminal eGFP tagging resulting in different conformation that is not recognized by the HCV core antibody used.

Internalization was also demonstrated in individual confocal sections by counterstaining Huh7 cells, after incubation with particulate fractions from Bac 1736, Bac 1740 and Bac 1741, with phalloidin (Fig. 5, panel B); fluorescent spots were present in close proximity to actin filaments suggesting that GFP-tagged non-enveloped capsids are distributed along the actin network.

Furthermore, preliminary observations suggest that internalization of GFP tagged capsids can be tracked by live imaging. Selected images after adding the Bac 1736 and Bac 1740 particulate fractions in Huh7 cells, are shown in Fig. 6 (panels A and B). As indicated a single fluorescent spot is moving from the cell periphery to the nucleus proximity. This result is of important value as for the first time intracellular trafficking of recombinant fluorescent HCV non-enveloped capsids is monitored.

In order to examine if fluorescent capsids shared the same properties of the previously described non-enveloped capsids to produce cell-signaling effects [7] we followed ERF protein relocalization from the nucleus to the cytoplasm of serum starved Huh7 cells. As showed in Fig. 7 (A and B), the addition of the particulate fraction from Bac 1736 exogenously added to the starved cells relocalize ERF protein in a dose-dependent way similarly to the non-enveloped capsids without tag from Bac1432 [7]. Fraction from the control Bac1746 or soluble recombinant GFP protein failed to produce the same effect. Similar results were obtained with fractions from Bac 1736 and Bac1 741 (data not shown).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

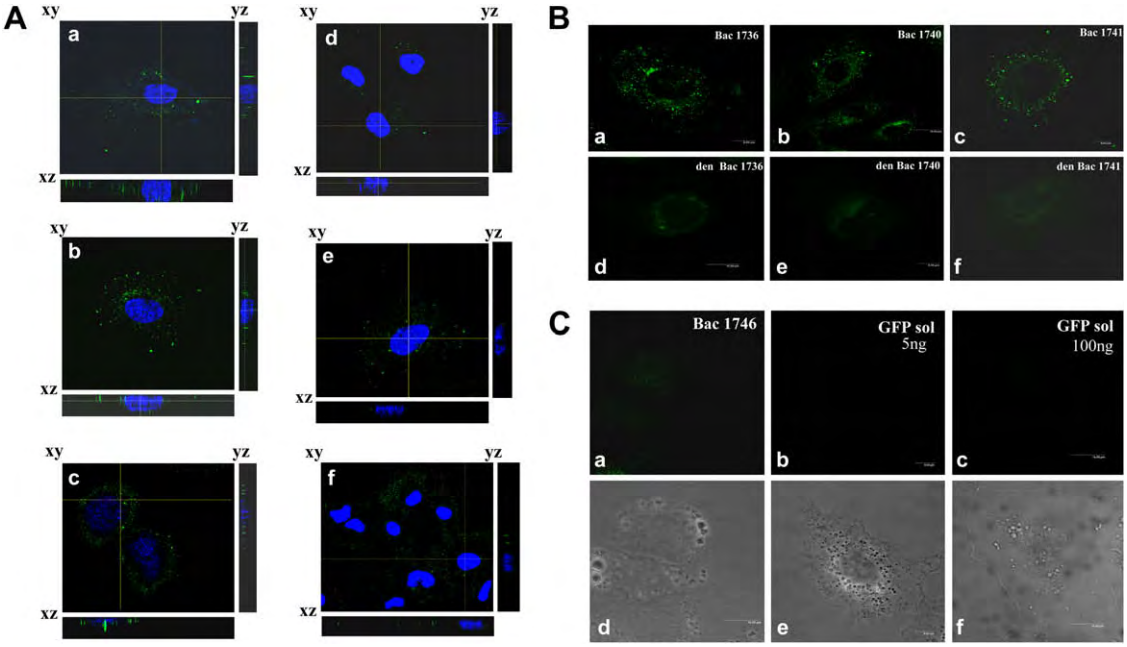


Fig. 4. Fluorescent capsid-like particles are internalized in human hepatic cells. Panel A: Huh7 cells were incubated with the fluorescent core particles (green spots) from Bac 1736 (a), Bac 1740 (b) and Bac 1741(c) at 37 °C (incubation for 1 h) and at 4 °C (incubation for 30 min) (d, e, f). Nuclei were labelled with ToPro3. Single sections were captured with a Leica TCS-SP5 microscope recording 25 images at 0.02 μm intervals. Sections through the centre of the cells are shown. Large panels, xy sections; small panels, xz and yz sections (orthogonal resectioning). Panel B: Huh7 cells were incubated with the fluorescent core fraction from Bac 1736 (a), Bac 1740 (b) and Bac 1741 (c). The same fractions from Bac 1736 (d), Bac 1740 (e) and Bac 1741 (f) were heat denatured at 95 °C before incubation with the cells. Panel C: The corresponding sucrose density fraction from Bac 1746 (a) was used as a control. Equal and very high protein concentration of soluble GFP protein purified from *E. coli* was used as additional controls (b, c). Shown are individual confocal sections. Phase contrast (d, e, f).

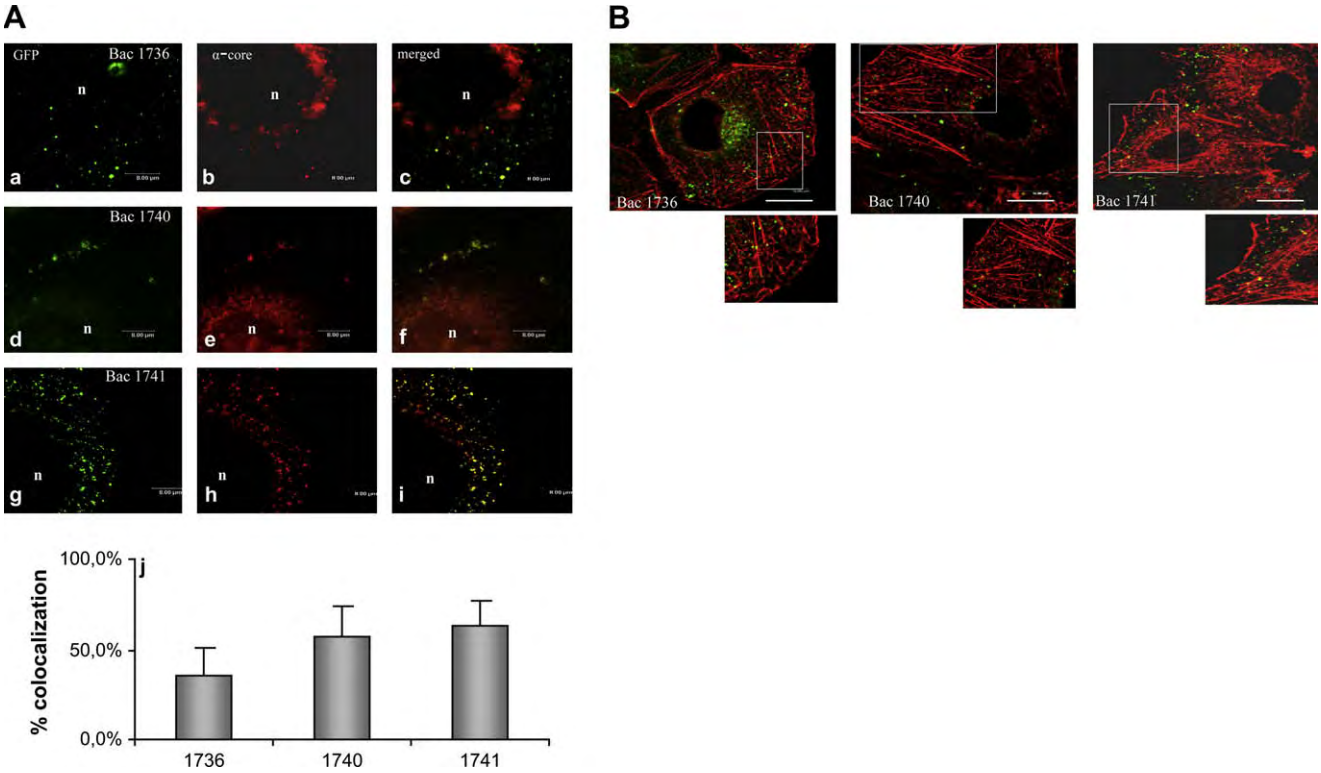


Fig. 5. Panel A: Colocalization of core and eGFP in Huh7 cells. Cells were incubated for 1 h with the fluorescent core particles [a, b, c:Bac 1736;d, e, f:Bac 1740; g, h, i:Bac 1741, fixed, stained with polyclonal anti-core and fluorescent secondary antibody, and examined by immunofluorescence. GFP-fluorescence [a, d, g]; anti-core immunofluorescence [b, e, h]; merged images [e, f, i]. Shown are individual confocal sections. n: nucleus. Scale bar, 8 μm. Percent of colocalization from different experiments analyzed by Image-Pro (j). Panel B: Single sections of Huh7 cells incubated with the fluorescent core particles (green spots) from Bac 1736, Bac 1740 and Bac 1741 at 37 °C for 1 h counterstained with Alexa-phalloidin 546 to visualize actin filaments. Scale bar; 16 μm.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

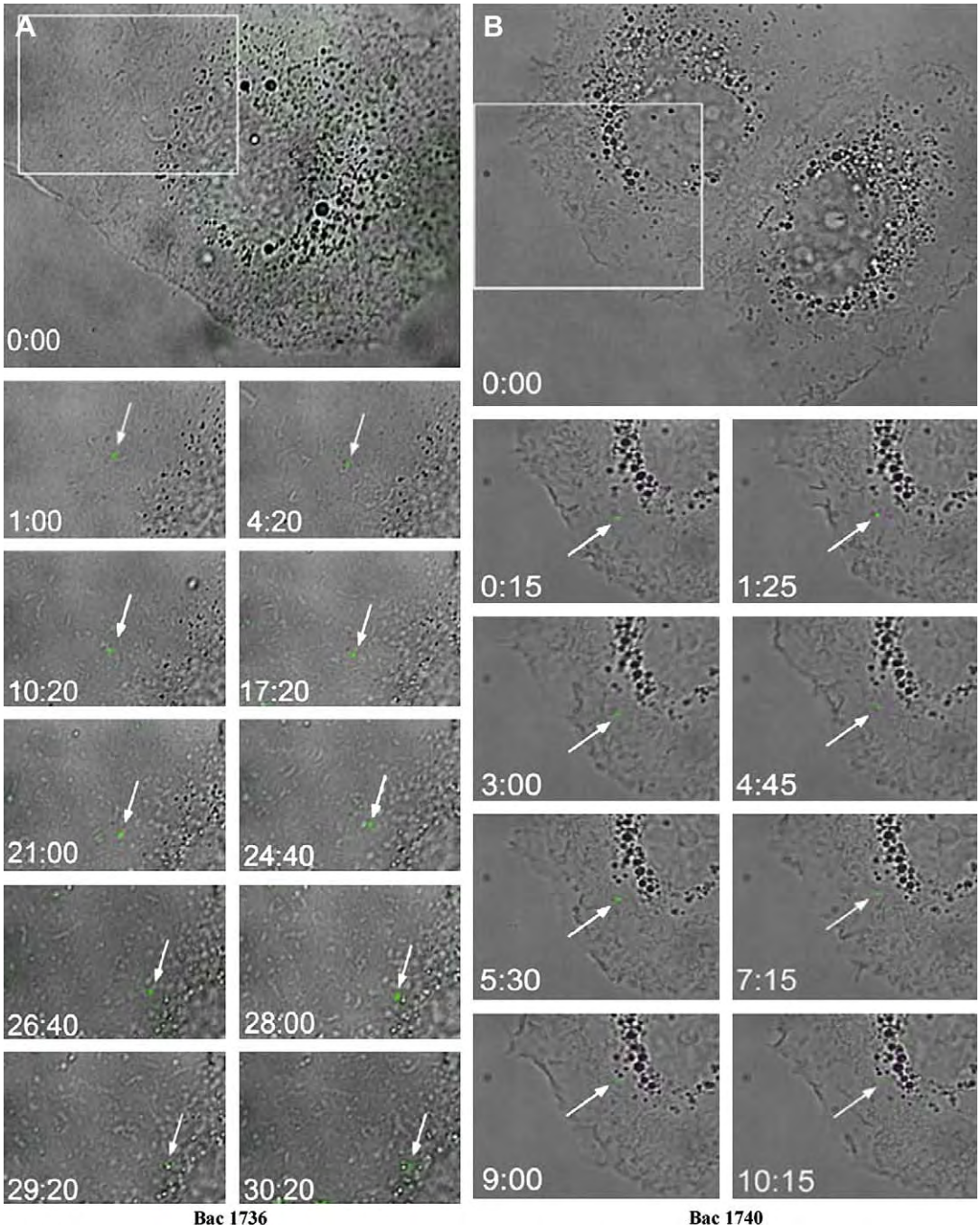


Fig. 6. Live imaging of fluorescent non-enveloped capsid uptake. Selected frames show the traffic of fluorescent spot from Bac 1736 (A) and Bac 1740 (B) over time (min. sec). eGFP fluorescence (green) is shown superimposed on the corresponding bright field image.

Taken together, we conclude that the fluorescent non-enveloped capsids can enter human hepatic cells at 37 °C as the previously described non-tagged HCV non-enveloped capsids [7] and produce similar signalling effects. Furthermore we were able to follow their uptake in real time.

3.3.2. Immune cells

In order to test whether immune cell lines, known to be targets of HCV virus infection [22,23,41], are permissive for uptake of eGFP-tagged non-enveloped capsids, we used T (Jurkat; Fig. 8, panel A), B (BJAB; Fig. 8, panel B) lymphocytes and the human myeloid cell line U937 (Fig. 8, panel C and D) that can be differentiated along the monocyte/macrophage pathway. As shown in Fig. 8, binding and/or uptake were dose dependent for all three forms of the eGFP-tagged non-enveloped capsids. The levels of binding and/or uptake varied with the different forms of the capsids and among the different cell lines. Particles from Bac 1741 and Bac 1740 showed higher values of binding/uptake in Jurkat cells when compared to particles from Bac 1736 (Fig. 8, panels A and B: a1–2). In BJAb cells all three constructs showed comparable results (Fig. 8, panel B: 1–3). Similar was the behaviour concerning binding/uptake of GFP-tagged non-enveloped capsids by non-differentiated and PMA-treated U937 cells

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

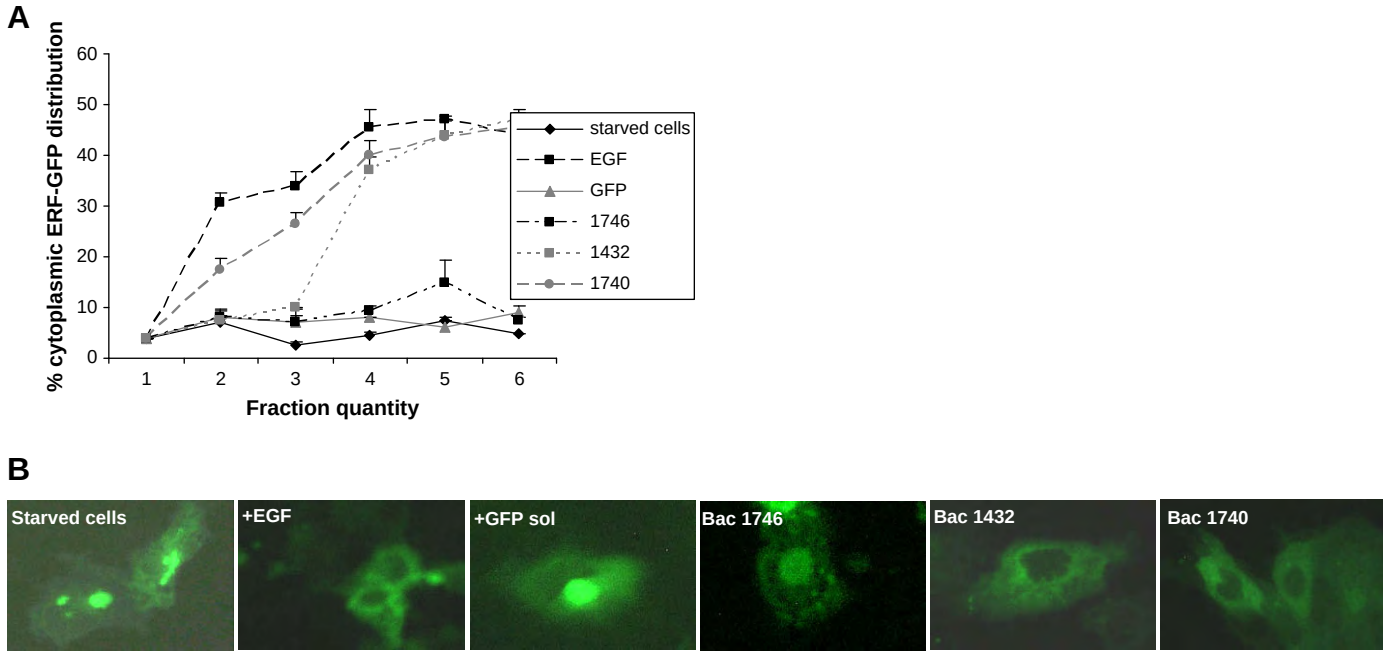


Fig. 7. ERF translocation from the nucleus to the cytoplasm. Huh7 cells expressing GFP-ERF, were incubated, after starvation, for 20 min at 4 °C and 40 min at RT with the appropriate fraction. Panel A: Dose-dependent effect on GFP-ERF translocation. Numbers of particulate fraction quantity correspond to 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng of core protein from Bac 1740 (tagged capsids) and Bac 1432 (non-tagged capsids). The corresponding fraction from Bac 1746, soluble GFP protein of the same quantity and EGF was used as used as controls. Panel B: Distribution of fluorescence under each condition is shown in representative cell images.

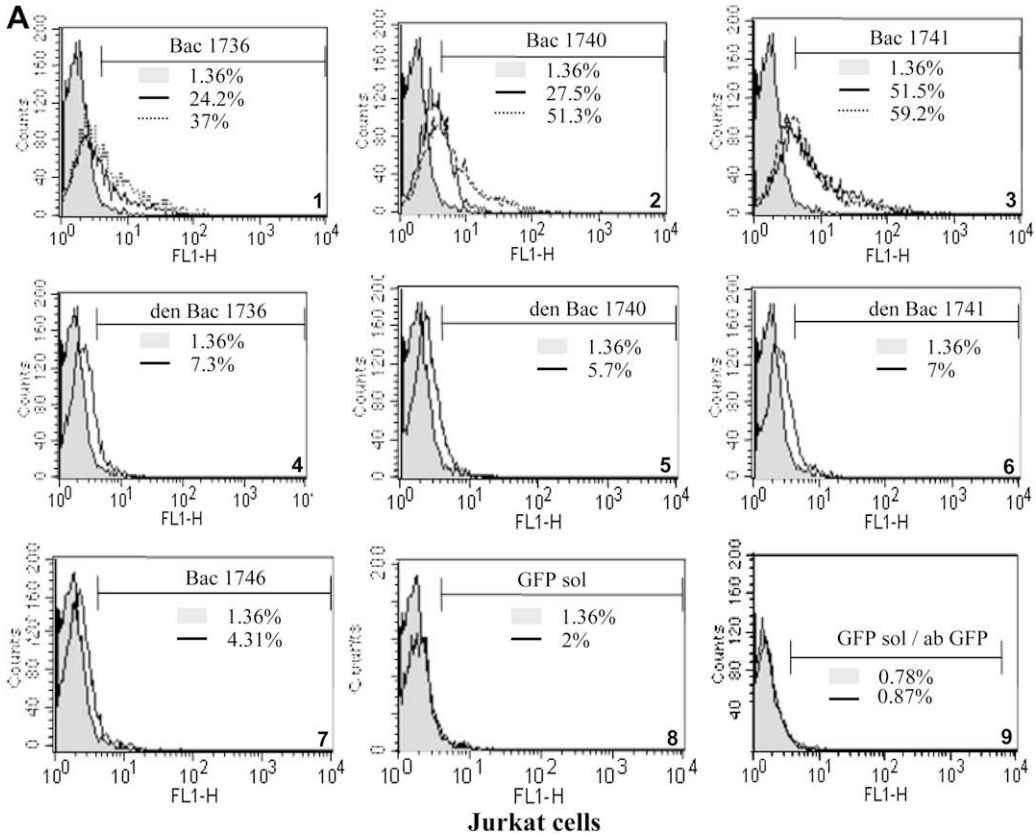


Fig. 8. Analysis of cellular binding and/or uptake of fluorescent capsid-like particles in immune cells by using FACS. Black curves [-] represent histograms of cell-associated fluorescent capsids for approximatively 80 ng/ml and punctuated curves […] for 160 ng/ml core protein. Background fluorescence (light grey shaded curves) was measured and subtracted by using mock-incubated cells. Panel A: Jurkat cells were challenged with fluorescent non-enveloped capsids from Bac 1736 (1), Bac 1740 (2), Bac 1741 (3). As controls the same fractions from Bac 1736 (4), Bac 1740 (5), Bac 1741 (6) but after heat denaturation. The corresponding fraction from control virus Bac 1746 (7) was used as negative control. As an additional control soluble GFP was used at the same concentration detected either by simple fluorescence (8) or by use of a specific GFP antibody (9). Panel B: Same as panel A but BJAB cells were challenged with fluorescent capsids. Panel C: Same as panel B but U937 cells, non-differentiated or PMA-treated (1 mM for 24 h) in order to differentiate into macrophages, were challenged with fluorescent capsids.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

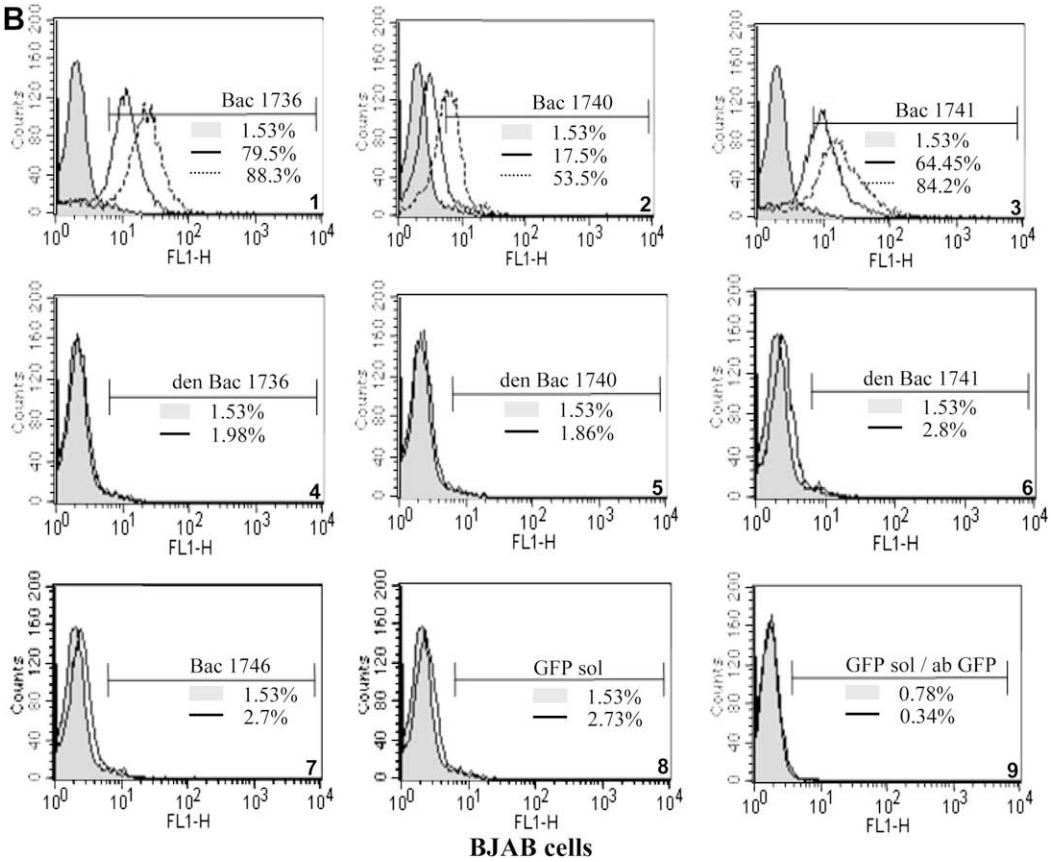


Fig. 8. (*continued*).

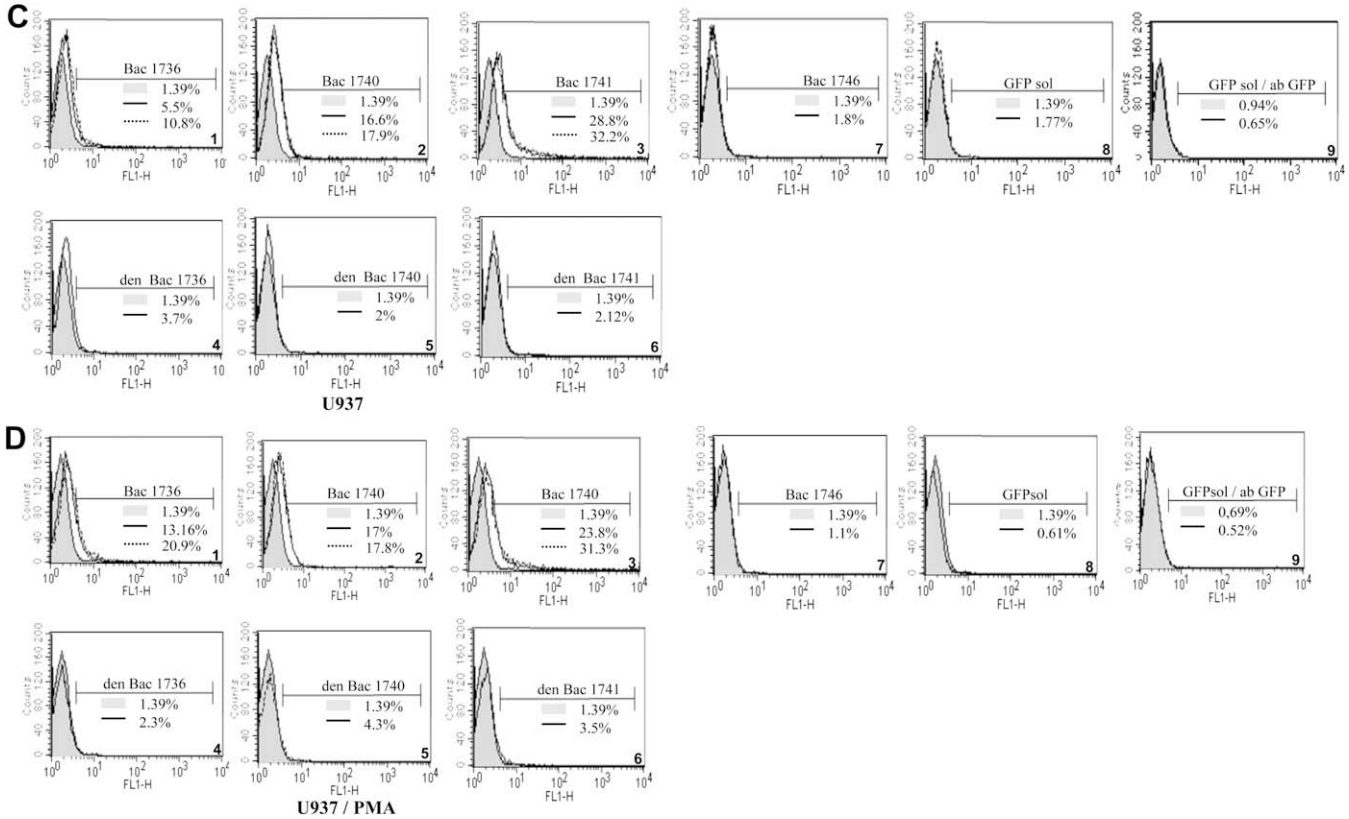


Fig. 8. (*continued*).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

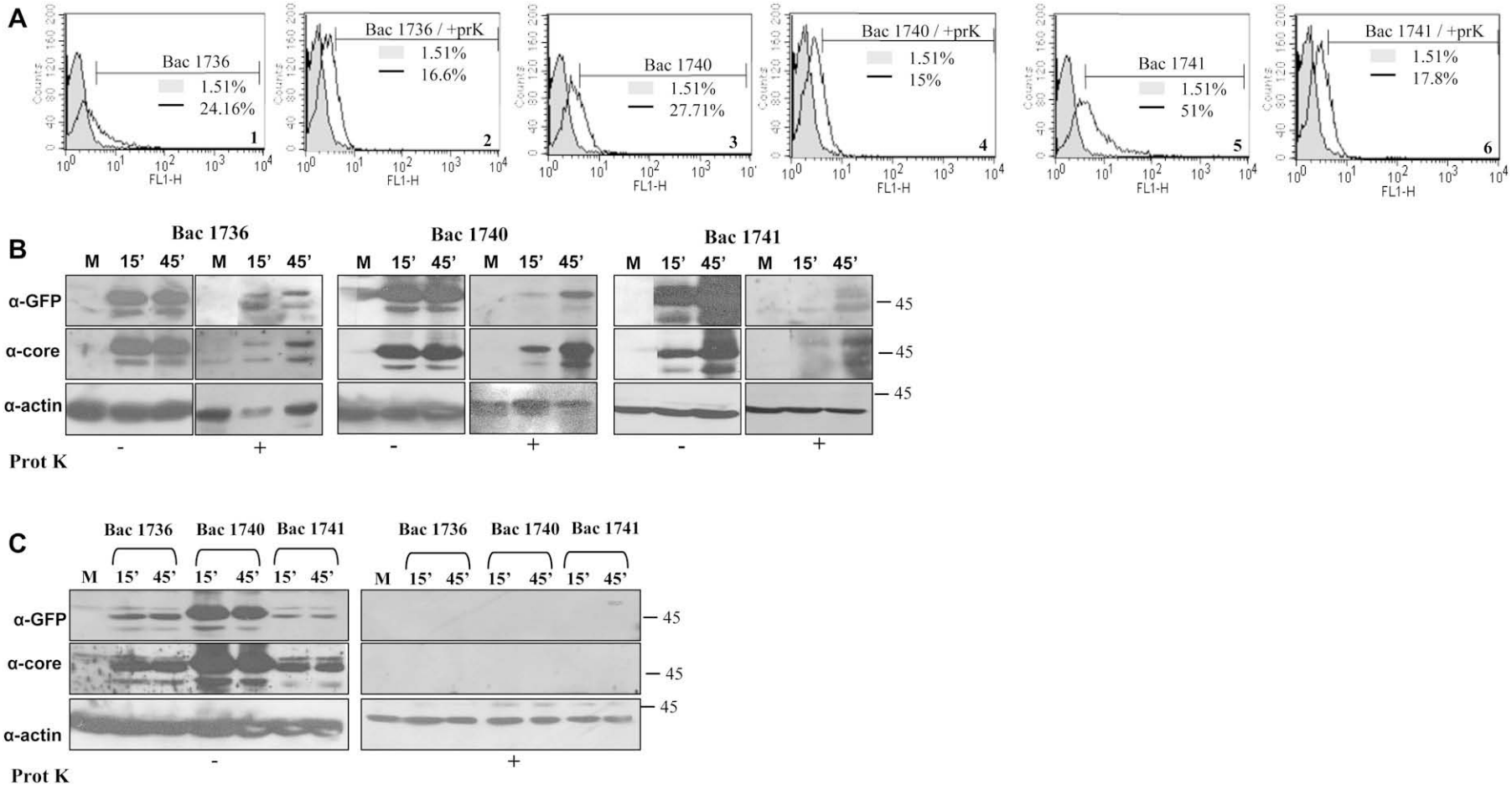


Fig. 9. Proteinase K assay. Panel A: Cells were incubated, at 4 °C then shifted for 1 h at 37 °C, with capsids from Bac 1736, Bac 1740 and Bac 1741, extensively washed and treated with proteinase K (50 μg/ml at 4 °C for 20 min), then analyzed by FACS. Black curves [-] represent histograms of cell-associated fluorescent capsids for 80 ng/ml. Background fluorescence (light grey shaded curves) was measured and subtracted by using mock-incubated cells. Panel B: Incubation of Jurkat cells with fluorescent particles for the indicated time points, then treated with proteinase K as previously described. Immunoblotting of cell lysates with antiserum against GFP (a) and against core antigen (b). Actin was used as an internal control (c). Incubation of cells with fluorescent-capsid particles was done for the indicated time points at 37 °C. Panel C: Cells treated as Panel B but incubation of cells with fluorescent-capsid particles was done for the indicated time points at 4 °C.

although signal was less strong (Fig. 8, panel C: 1, 2, 3). As controls identical samples were used that had been heat denatured before incubation with all the immune cell lines used (Fig. 8, panels A, B, C, D:4, 5, 6). These samples were totally negative. In addition the corresponding fraction from the control virus Bac 1746 (Fig. 8, panels A, B, C, D:7), and soluble GFP with the same protein concentration showed no binding/uptake (Fig. 8, panels A, B, C, D:8). This last control was also analyzed by using a GFP antibody (Fig. 8, panels A, B, C, D:9). No signal was observed in these controls, indicating that only the eGFP tagged cores can bind and/or enter the cells. These data showed that uptake of fluorescent non-enveloped capsids was similar to the cellular uptake of core non-enveloped capsids under the same experimental conditions (Supplementary Fig. S3). Furthermore, cells that had been incubated with the GFP tagged non-enveloped capsids were subjected to proteinase K treatment, as exemplified for Jurkat T cells. FACS analysis showed that an efficient internalization has occurred (Fig. 9, panel A:1–6). After digestion of surface-attached particles with proteinase K, immunoreactive core and the GFP signal were clearly detectable in the cells as evidenced by western blotting (Fig. 9, panel B). Again, most efficient internalization at late time points was observed with fractions from Bac 1740 and Bac 1741. Conversely, when incubation was at 4 °C, binding of tagged non-enveloped capsids was evident but no intracellular signal was recorded (Fig. 9, panel C) suggesting that at this temperature internalization had not occurred.

4. Discussion

Our data demonstrate that fusion of GFP to the amino- or carboxy terminus of the HCV protein $core_{173}$ and to the amino terminus of $core_{191}$, does not alter the autoassembly properties of the protein. The particles obtained were very similar to the previously described recombinant HCV non-enveloped capsid-like particles [7] and are internalized into human hepatic cells and cells of immune origin. The fluorescent particles are particularly attractive for monitoring non-enveloped particle uptake in real time. Successful labelling of viruses and VLPs via fusion with eGFP by using similar approaches has been reported for human immunodeficiency virus, herpes simplex virus, rotavirus, rabies virus, simian virus and parvovirus [8–11,24,25, 31, 34].

The eGFP fusion proteins were abundantly expressed from all constructs and had the expected relative molecular mass. However, smaller immunoreactive products were also observed even after sucrose density gradient purification. This raises the question of whether these forms of the core protein produced via cleavage, or alternative translational mechanisms are still able to assemble into particulate cores and to what extent the GFP moiety is inhibitory to the assembly process. It is also not clear whether forms of the core protein are incorporated into core particles giving rise to the non-uniform particle size observed in EM. Supporting this hypothesis is the recently reported evidence that the N-terminal half of HCV core is an intrinsically unstructured protein [37] as well as the production of four N-terminally truncated isoforms of the nucleocapsid (core) protein ranging from 8 to 14 kDa recently described by Eng J. et al. [38,43]. In addition unusual lability of the nucleocapsid protein was observed in SARS virus during the purification process where the appearance of two other protein/protein fragment bands on SDS-PAGE was detected [39].

Expression of all constructs gave rise to small spherical capsids with a diameter range of 30–55 nm found in the fractions from sucrose density gradient centrifugation with densities between 1.2 and 1.3 g/cm^3. Nevertheless, a more detailed structural analysis is required in order to study the conformation of these particles. Nucleocapsids, isolated by detergent treatment of virions present in patient serum, have been reported to have a density of 1.35 g/ml in caesium chloride and of 1.23–1.27 g/ml in sucrose [3,29,30]. The different densities might be due to association of the highly lipophilic HCV core protein with lipids [33]. While the issue of HCV capsid density requires further investigation, density value obtained for the fluorescent recombinant non-enveloped capsids corresponds closely to the 1.25 g/ml density seen for at least one population of natural HCV capsids produced in cells and with the 1.17–1.24 g/ml previously described [3]. In some cases the capsids were irregular in size and often imperfectly assembled, most probably because of steric problems caused by the presence of the eGFP. Despite their heterogeneous size, they were efficiently internalized by the cell lines investigated.

The presented data demonstrate for the first time that non-enveloped capsids, rendered fluorescent via fusion with eGFP are internalized into cells of hepatic and immune origin. Although the recent development of an infectious HCV system was of great impact for the study of viral uptake, a number of limitations still exist. Fastidious host cell requirements, limitation to a single replicating strain, and no evidence for the production of the different forms of particles present in the sera of infected patients, mean that the *in vitro* produced HCV capsids will remain an important tool for studies of virus uptake. Furthermore, recent reports provided evidence that not only B cells but also *in vitro* infected T-cells support HCV replication and predominantly non-enveloped core particles are detected in the supernatants [21]. In this context it is of interest that defective viruses may play a significant role in the establishment and maintenance of chronic infection *in vivo* [5,26–28].

Our data on the uptake of fluorescent non-enveloped particles by human hepatic cells, T cells, B cells as well as monocytes progressing to macrophages pave the way for a better understanding of the biological importance of naked capsids in HCV infection.

Results of binding and internalization assays also suggest that we have produced fluorescent particles with morphological and physical properties as well as producing cell-signalling effects similar to those of the untagged non-enveloped capsids. The fluorescent non-enveloped capsid-like particles are safe to handle and of great utility as a visualization tool in studies related to naked HCV capsid trafficking mechanisms. They also enable real time imaging, providing new answers on the potential role of naked capsids in HCV pathogenesis. Taken together, our results demonstrate that fusions between eGFP and HCV core protein assemble into core-like particles, with the most efficient tagging being at the carboxyterminus of $core_{173}$. These fluorescent capsid-like particles are internalized into human hepatic cells and cells of immune origin by a so far unknown mechanism and pathway. Experiments aimed at unravelling these are currently underway.

Acknowledgements

We thank Pr. G. Mavrothalassitis (University of Crete) for provision of the GFP-ERF plasmid. We also thank our colleagues M. Zouridakis (Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute) for dynamic light scattering (DLS), P. Foka and E. Tsitoura for useful discussions. R.Z. and P.H. were partially supported by Austria Nano-Initiative (NABIOS).

This work was supported by PENED 03EΔ297, co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biochi.2009.04.016

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

References

[1] M. Houghton, Hepatitis C Viruses, in: D.M. Knipe, B.N. Fields, P.M. Howley (Eds.), third ed., Fields Virology, vol. 1 Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, pp. 1035–1058.

[2] P. Andre, G. Perlemuter, A. Budkowska, C. Brechot, V. Lotteau, Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism, Semin. Liver Dis. 25 (2005) 93–104.

[3] P. Maillard, K. Krawczynski, J. Nitkiewicz, C. Bronnert, M. Sidorkiewicz, P. Gounon, J. Dubuisson, G. Faure, R. Crainic, A. Budkowska, Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients, J. Virol. 75 (2001) 8240–8250.

[4] A. Iwai, H. Marusawa, Y. Takada, H. Egawa, K. Ikeda, M. Nabeshima, S. Uemoto, T. Chiba, Identification of novel defective HCV clones in liver transplant recipients with recurrent HCV infection, J. Viral Hepat. 13 (2006) 523–531.

[5] S. Noppornpanth, S.L. Smits, T.X. Lien, Y. Poovorawan, A.D. Osterhaus, B.L. Haagmans, Characterization of hepatitis C virus deletion mutants circulating in chronically infected patients, J. Virol. 81 (2007) 12496–12503.

[6] S. Yagi, K. Mori, E. Tanaka, A. Matsumoto, F. Sunaga, K. Kiyosawa, K. Yamaguchi, Identification of novel HCV subgenome replicating persistently in chronic active hepatitis C patients, J. Med. Virol. 77 (2005) 399–413.

[7] P. Tsitoura, U. Georgopoulou, S. Petres, A. Varaklioti, A. Karafoulidou, D. Vagena, C. Politis, P. Mavromara, Evidence for cellular uptake of recombinant hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles, FEBS Lett. 581 (2007) 4049–4057.

[8] A. Charpilienne, M. Nejmeddine, M. Berois, N. Parez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, J. Cohen, Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells, J. Biol. Chem. 276 (2001) 29361–29367.

[9] S. Finke, K. Brzozka, K.K. Conzelmann, Tracking fluorescence-labeled rabies virus: enhanced green fluorescent protein-tagged phosphoprotein P supports virus gene expression and formation of infectious particles, J. Virol. 78 (2004) 12333–12343.

[10] L. Gilbert, J. Toivola, E. Lehtomaki, L. Donaldson, P. Kapyla, M. Vuento, C. Oker-Blom, Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells, Biochem. Biophys. Res. Commun 313 (2004) 878–887.

[11] L. Gilbert, J. Toivola, O. Valilehto, T. Saloniemi, C. Cunningham, D. White, A.R. Makela, E. Korhonen, M. Vuento, C. Oker-Blom, Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles, J. Nanobiotechnology 4 (2006) 13.

[12] C. Lambert, N. Thome, C.J. Kluck, R. Prange, Functional incorporation of green fluorescent protein into hepatitis B virus envelope particles, Virology 330 (2004) 158–167.

[13] K. Lux, N. Goerlitz, S. Schlemminger, L. Perabo, D. Goldnau, J. Endell, K. Leike, D.M. Kofler, S. Finke, M. Hallek, H. Buning, Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking, J. Virol. 79 (2005) 11776–11787.

[14] G. Inchauspe, S. Zebedee, D.H. Lee, M. Sugitani, M. Nasoff, A.M. Prince, Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus: comparison with American and Japanese isolates, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (1991) 10292–10296.

[15] J. McLauchlan, M.K. Lemberg, G. Hope, B. Martoglio, Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets, EMBO J. 21 (2002) 3980–3988.

[16] T.F. Baumert, S. Ito, D.T. Wong, T.J. Liang, Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells, J. Virol. 72 (1998) 3827–3836.

[17] A.D. Branch, D.D. Stump, J.A. Gutierrez, F. Eng, J.L. Walewski, The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others, Semin. Liver Dis. 25 (1) (2005) 105–117.

[18] K.C. Klein, S.J. Polyak, J.R. Lingappa, Unique features of hepatitis C virus capsid formation revealed by de novo cell-free assembly, J. Virol. 78 (2004) 9257–9269.

[19] C. Vauloup-Fellous, V. Pene, J. Garaud-Aunis, F. Harper, S. Bardin, Y. Suire, E. Pichard, A. Schmitt, P. Sogni, G. Pierron, P. Briand, A.R. Rosenberg, Signal peptide peptidase-catalyzed cleavage of hepatitis C virus core protein is dispensable for virus budding but destabilizes the viral capsid, J. Biol. Chem. 281 (2006) 27679–27692.

[20] M. Pizzato, S.A. Marlow, E.D. Blair, Y. Takeuchi, Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction, J. Virol. 73 (1999) 8599–8611.

[21] S.A. MacParland, T.N. Pham, S.A. Gujar, T.I. Michalak, De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro, J. Gen. Virol. 87 (2006) 3577–3586.

[22] T.N. Pham, T.I. Michalak, Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus infection, World J. Gastroenterol. 14 (2008) 2789–2793.

[23] T.N. Pham, D. King, S.A. Macparland, J.S. McGrath, S.B. Reddy, F.R. Bursey, T.I. Michalak, Hepatitis C virus replicates in the same immune cell subsets in chronic hepatitis C and occult infection, Gastroenterology 134 (2008) 812–822.

[24] P. Desai, S. Person, Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid, J. Virol. 72 (1998) 7563–7568.

[25] D. McDonald, M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, T.J. Hope, Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells, J. Cell Biol. 159 (2002) 441–452.

[26] A.S. Huang, D. Baltimore, Defective viral particles and viral disease processes, Nature 226 (1970) 325–327.

[27] M.U. Lancaster, S.I. Hodgetts, J.S. Mackenzie, N. Urosevic, Characterization of defective viral RNA produced during persistent infection of Vero cells with Murray Valley encephalitis virus, J. Virol. 72 (1998) 2474–2482.

[28] S.W. Yoon, S.Y. Lee, S.Y. Won, S.H. Park, S.Y. Park, Y.S. Jeong, Characterization of homologous defective interfering RNA during persistent infection of Vero cells with Japanese encephalitis virus, Mol. Cells 21 (2006) 112–120.

[29] M. Kaito, M.S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki, M. Kohara, Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study, J. Gen. Virol. 75 (1994) 1755–1760.

[30] T. Kanto, T.N. Hayashi, T. Takehara, H. Hagiwara, E. Mita, M. Naito, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada, Buoyant density of hepatitis C virus recovered from infected hosts: two different features in sucrose equilibrium density-gradient centrifugation related to degree of liver inflammation, Hepatology 19 (1994) 296–302.

[31] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER, Nat. Cell Biol. 3 (2001) 473–484.

[32] M. Ratinier, S. Boulant, C. Combet, P. Targett-Adams, J. McLauchlan, J.P. Lavergne, Transcriptional slippage prompts recoding in alternate reading frames in the hepatitis C virus (HCV) core sequence from strain HCV-1, J. Gen. Virol. 89 (2008) 1569–1578.

[33] A. Shavinskaya, S. Boulant, F. Penin, J. McLauchlan, R. Bartenschlager, The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly, J. Biol. Chem. 282 (51) (2007) 37158–37169.

[34] M. Dundr, J. McNally, J. Cohen, T. Misteli, Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells, J. Struct. Biol. 140 (2002) 92–99.

[35] J. Aaskov, K. Buzacott, H.M. Thu, K. Lowry, E.C. Holmes, Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and *Aedes* mosquitoes, Science 311 (2006) 236–238.

[36] L. Pacini, R. Graziani, L. Bartholomeu, R. De Francesco, G. Paonessa, Hepatitis C virus sub-genomic RNA resembling natural occurring deletion mutants are efficiently trans-packaged into virus-like particles by helper virus or helper cell lines. In: Abstract presented in 15th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses, (2008) San Antonio Texas.

[37] J.B. Duvignaud, C. Davard, R. Fromentin, N. Majeau, D. Leclerc, S. Gagne, Structure and dynamics of the N-terminal half of hepatitis C virus core protein: an intrinsically unstructured protein, Biochem. Res. Commun. 378 (1) (2009) 27–31.

[38] F. Eng, A.L. Klepper, J. Walewski, S.L. Fishman, L. McMullan, M.J. Evans, C.M. Rice, S. Desai, A.D. Branch, The hepatitis C virus core gene expresses a family of N-terminally truncated isoforms of the nucleocapsid (core) protein. In: Abstract presented in 15th International Symposium on Hepatitis C virus & Related Viruses, (2008) San Antonio Texas.

[39] J. Mark, X. Li, T. Cyr, S. Fournier, B. Jaentschke, M.A. Hefford, SARS coronavirus: unusual lability of the nucleocapsid protein, Biochem. Res. Commun. 377 (2) (2008) 429–433.

[40] V. Falcón, N. Acosta-Rivero, G. Chinea, 12 other authors, Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients, Biochem. Biophys. Res. Commun. 305 (2003) 1085–1090.

[41] Y. Kondo, V.M.H. Sung, K. Machida, M. Liu, M.M.C. Lai, Hepatitis C infects T cells and affects interferon $-\gamma$ signaling in T cell lines, Virology 361 (2007) 161–173.

[42] A. Helenius, J. Kartenbeck, K. Simons, E. Fries, On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells, J. Cell Biol. 84 (1980) 404–420.

[43] F. Eng, A.L. Klepper, J. Walewski, S.L. Fishman, S. Desai, L. McMullan, M.J. Evans, C.M. Rice, A.D. Branch, Internal initiation stimulates production of p8 mini-core, a member of a newly discovered family of hepatitis C virus core protein isoforms, J. Virol. 83 (2009) 3104–3114.

[44] L. Le Gallic, L. Virgilio, P. Cohen, B. Biteau, G. Mavrothalassitis, ERF nuclear shuttling, a continuous monitor of ERK activity that links it to cell cycle progression, Mol. Cell Biol. 24 (2004) 1206–1218.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

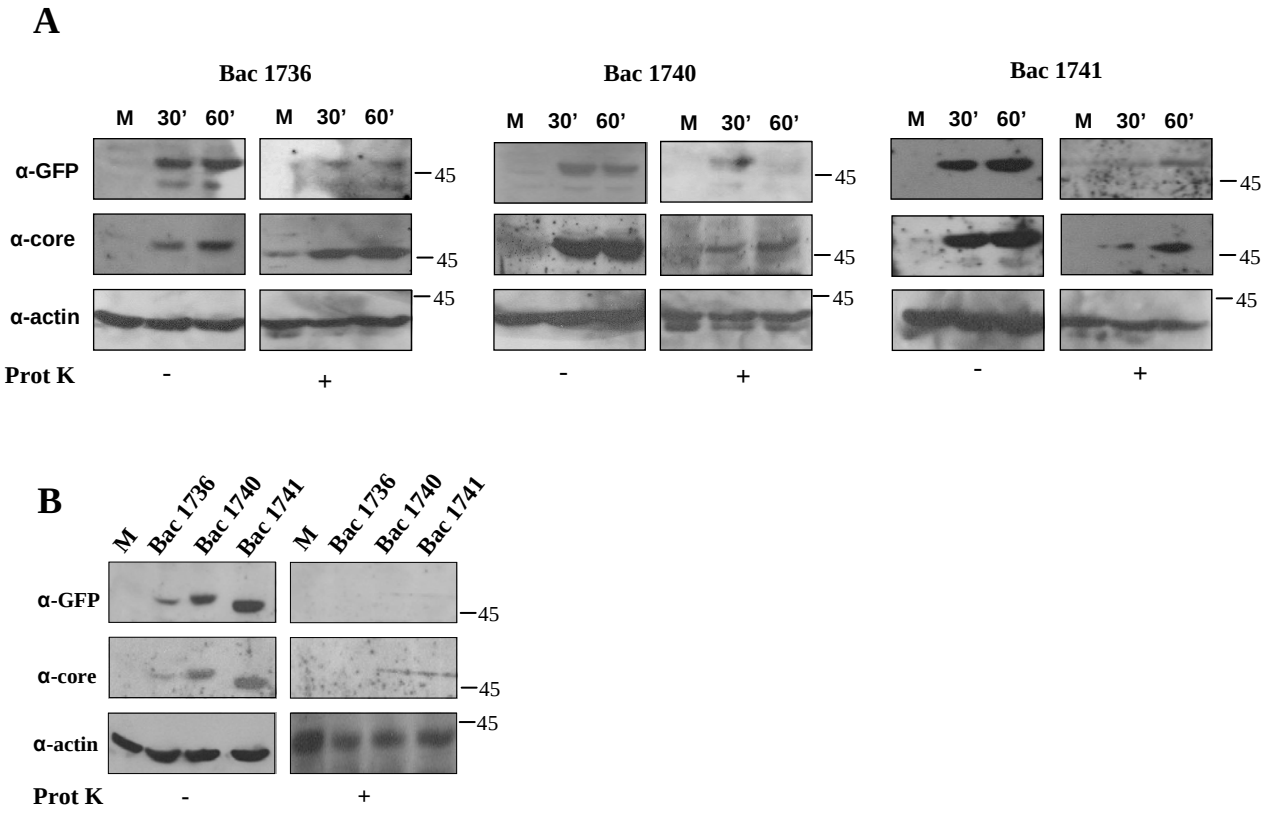


Figure S1: HepG2 cells were incubated:

Panel A: at 37°C for the indicated time points, with capsids from Bac 1736, Bac 1740 and Bac 1741, extensively washed and treated with proteinase K (50 μg/ml at 4°C for 20min), then analyzed by western blotting with antiserum against GFP and against core antigen . Actin was used as an internal control.

Panel B: Cells were treated as Panel A at the indicated time points at 4°C

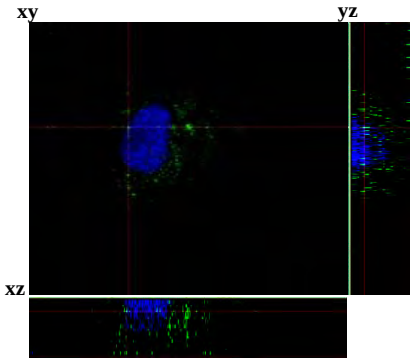


Figure S2: Internalization of HCV core nonenveloped capsid-like particles produced from Bac 1432 (virus expessing core without any tag), in Huh7 cells. Huh7 cells were incubated for one hour at 37ºC with the core-fraction. Cells were fixed, stained with anti-core and examined by immunofluorescence microscopy. Single sections were captured with a Leica TCS-SP5 microscope recording 25 images at 0.02 µm intervals. Sections through the centre of a cell are shown. Large panel, xy section; small panel, xz and yz section (orthogonal resectioning). Nuclei wer labeled with ToPro3.

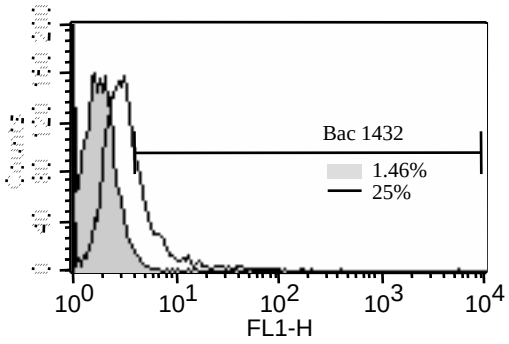


Figure S3: Analysis of cellular binding and/or uptake of HCV core non-enveloped capsid-like particles in immune cells by using FACS. Jurkat cells were challenged with nonenveloped capsids from Bac 1432 [7], analyzed by monoclonal HCV core antibody (Alexis Biochemicals) . Black curves [-] represent histograms of cell-associated fluorescent capsids for approximately 80ng/ml core protein. Background fluorescence (light grey shaded curves) was measured and subtracted by using mock-incubated cells.

ENDOCYTOSIS OF HCV NON-ENVELOPED CAPSID-LIKE PARTICLES INDUCES MAPK-ERK$_{1/2}$ SIGNALLING EVENTS

Konstantina Katsarou[1], Alexandros A. Lavdas[2], Panagiota Tsitoura[3], Elisavet Serti[1], Panagiotis Markoulatos[4], Penelope Mavromara[1] and Urania Georgopoulou[1#]

Molecular Virology Laboratory, Hellenic Pasteur Institute[1], Laboratory of Cellular and Molecular Neurobiology, Hellenic Pasteur Institute[2], current address: Insect Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Biology, NCSR Demokritos[3], Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly[4], Greece

Running Title: Endocytosis of HCV non-enveloped capsids induces MAPKs-ERK

#To whom correspondence should be addressed, telephone:30-2106478876, fax: 30-2106426323, e-mail: uraniag@pasteur.gr

The Hepatitis C virus, member of the *Flaviviridae* family, is an RNA positive strand virus of 9.6kb genome. Although HCV is an enveloped virus, naked nucleocapsids have been reported in the serum of infected patients. The hepatitis C virus (HCV) core particle serves as a protective capsid shell for the viral genome and recombinant *in vitro* assembled hepatitis C virus core particles induce strong specific immunity. Here we investigated the post binding mechanism of recombinant core particle uptake and its intracellular fate. In hepatic cells, non-enveloped capsid-like particles are internalized, most likely in a clathrin-dependent pathway, reaching early to late endosomes and finally lysosomes in a microtubule-dependent mode as demonstrated by confocal microscopy and live-imaging. The endocytic acidic milieu as well as p38 kinase, tyrosine - and serine/threonine phosphatases are implicated in trafficking process. Using specific phosphoantibodies, signalling pathway inhibitors and chemical agents, ERK$_{1/2}$ was found to be activated in a sustained way after endocytosis, followed by downstream immediate early genes (*c-fos* and *egr-1*) modulation. We propose that the intriguing properties of cellular internalization of non-enveloped HCV capsid–like particles can induce specific ERK$_{1/2}$-MAPKs events which might give clues for the elucidation of clinical manifestations associated with HCV natural infection.

Hepatitis C virus (HCV) is, the main cause of chronic hepatitis worldwide and often leads to chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (1). The virus is classified as a member of the *Flaviviridae* family and produces a precursor polyprotein that is processed by proteases in order to yield structural and non-structural proteins. Core protein forms the capsid, which is surrounded by a lipid bilayer containing the glycoproteins E1, E2. However, different forms of HCV particles may exist in the circulation of infected individuals, one form being naked capsids (2,3). Furthermore, novel HCV subgenomes with in-frame deletions of both envelope proteins (E1 and E2), were identified in the liver, as well as in the serum of HCV infected individuals (4-7). When expressed in various heterologous systems, HCV core efficiently self-assembles into capsid-like core particles indistinguishable from native non-enveloped capsid shells (8,9). Our laboratory reported not only the generation of recombinant non-enveloped HCV core particles in the absence of other HCV proteins but, more importantly, demonstrated that these naked capsids can be uptaken by cells and induce cell-signalling phenomena (10,11).

Recent studies have revealed a surprising variety of endocytic routes for enveloped as well as non-enveloped viral capsids (12,13). Entry via some of these pathways proceeds through endosomes and the decreasing pH of these vesicular compartments often assists further viral trafficking (14). This is also the case for HCV enveloped particles. They interact with host cell surface molecules (CD81,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

SR-B1, Claudin-1 and glycosaminoglycans, reviewed in (15) and are internalised in a clathrin-mediated pathway into endosomes, where pH triggers fusion between viral envelope and endosomal membrane (16-20). The early endosome marker Rab5, a small GTPase which is a key regulator of early endosomal function including internalization and signalling, is involved in this process (18). The endocytosis pathway and endosomal pH modifications are also used by certain non-enveloped virus families, like *Picornaviridae* (21,22), *Adenoviridae* (23) and *Parvoviridae* (24). This critical process is highly regulated and/or coordinated by a number of cellular and viral factors. It occurs either after binding to a surface receptor or from endocytic vesicles (25-27).

In this study, we attempt to elucidate the postbinding entry mechanism of recombinant HCV non-enveloped capsid-like core particles (designated HCVne particles) and their relation to different events. We provide evidence that following entry in cells of hepatic origin, HCVne are processed through early to late endosomes and finally lysosomes via the clathrin-dependent pathway. The acidic milieu of endosomes and different host phosphorylated proteins are essential for this process. We also demonstrate that HCVne particles modulate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade during their entry and, more specifically, activate the extracellular-signal regulated kinase ($ERK_{1/2}$) pathway. A sustained activation was observed that leads to $ERK_{1/2}$ nuclear translocation and induction of *c-fos* and *egr-1* immediate early genes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells, plasmids, antibodies and reagents. HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) and *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells were purchased from ATCC. Huh-7 (Human hepatoma) cells were kindly provided by Dr. R. Bartenshlager (University of Heidelberg, Germany). Plasmids mRFP-Rab5 and m-RFP-Rab7 (28) (plasmid 14437 and 14436 respectively) as well as plasmid pFos WT-GL3 (29) (plasmid 11983) were all obtained from Addgene. GFP-Rab5WT, GFP-Rab5S34N and GFP-Rab5Q79L were a gift from Dr. Juan S. Bonifacino (30). pEgr1.2-luc plasmid was kindly provided by Dr. Gerald Thiel (31).

The following antibodies were used: mouse anti-EE autoantigen 1 (EEA1) (BD Biosciences), mouse anti-Lysosome associated membrane protein 2 (Lamp2) (Santa Cruz), mouse anti-actin (Chemicon), rabbit anti-phospho-p44/42, rabbit anti-phospho p38, mouse anti-p38, rabbit anti-c-fos (all from Cell Signaling), rabbit anti-ERK1 (K-23) (Santa Cruz) which detects both ERK1 and ERK2, mouse anti-α-tubulin (Molecular Probes) rabbit anti-core (10). As secondary antibodies for immunostaining we used rabbit and mouse Alexa-488, -546, and -647. MEK inhibitors UO126 and PD98059 were from Cell Signaling, recombinant human EGF from R&D, Alexa fluor 546-conjugated transferrin was from Molecular Probes and Alexa Fluor 546-phalloidin from Invitrogen. All other reagents were from Sigma.

*Cell culture, transient transfection and Western Blotting.*Cells were grown in low glucose DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS 100U/ml penicillin and 100μg/ml streptomycin $2.5x10^5$ HepG2 cells were transiently transfected with JetPEI reagent (PolyPlus) according to manufacturer's protocol.

For Western blotting analysis, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (1%(v/v) Triton X-100, 50mM KCl, 10mM Tris pH 7.5, 1 mM DTT, 2 mM $MgCl_2$, Complete-Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche), 1mM PMSF, 2mM Sodium Orthovanadate), electrophoretically separated on 8-10% (w/v) SDS-gels, transferred onto nitrocellulose membranes, incubated with appropriate antibodies and detected by enhanced chemiluminescence (Pierce). Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts has been described elsewhere (32). Program Quantity One 4.4.1 (Bio-Rad) was used for densitometric analysis of gels.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Production of HCV-non enveloped capsid-like particles. The capsid-like particles were isolated from cell lysates, as described in (10). Fractions (650µl each) were collected from the top of the gradient, the density was determined by refractometry, and HCV antigen was analyzed both with the Ortho HCV core antigen ELISA test system (dilution 1:1000 in PBS), and by SDS-PAGE followed by immunoblotting.

Immunofluorescence staining. Following addition of HCVne, corresponding to 10ng of core protein, at the indicated times cells grown on coverslips were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS (30 min) and the remaining reactive groups were blocked with 100 mM glycine. Cells were permeabilized with 0.02% (v/v) Triton X-, and incubated with the appropriate primary and secondary antibodies for 45 min respectively. Slides were examined using a Leica TCS-SPS confocal microscope. Sequential scanning between channels was used to separate fluorescence emission from different fluorochromes and to completely eliminate bleed-through between channels. Typically, nine to fifteen confocal sections from three to five independent experiments, were quantified with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics).

HCV non-enveloped particles tracking. For live microscopy, mRFP-Rab5 and mRFP-Rab7 transfected cells were grown in 35mm glass-bottomed culture dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Internalization of HCVne into the host cells and cytoplasmic transport at 37°C were monitored at the indicated times by time lapse live imaging microscope. An inverted time-lapse Olumpus X181 Cell-R microscope equipped with a Hamamatsu CCD ORCA/AG camera and 60x or 100x objective lenses. Cells were maintained in 37°C. Procession of movies was made with the Cell-R software (Olympus).

Luciferase assay. HepG2 cells ($2.5x10^5$) were transfected as already described. Twenty-four hour after transfection cells were starved by incubation with DMEM without serum for twelve hours and HCVne, as well as controls, were added for eighteen hours. Cell extracts were prepared and luciferase assays were performed using the Luciferase Assay System (Promega). In brief, 20µl of the room temperature cell extract was mixed with 100µl of room temperature luciferase assay reagent containing the substrate. The reaction was performed and measured in a Luminometer GloMax^{TM} 20/20 (Promega). Protein concentration was determined using a protein assay kit (Bio-Rad) and was used for normalization of the luciferase assays. All experiments were repeated at least five times in duplicate wells.

mRNA expression analysis. Total cellular RNA was extracted from HepG2 cells using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The purity and integrity of RNA samples were assessed by A260/280 spectrophotometric measurement and gel analysis. 1µg of RNA was reversely transcribed using MMLV reverse transcriptase (Promega) and the resulting cDNA was subjected to semi-quantitative PCR analysis. Primers used were for: *c-fos* (33), *egr-1* (34), 28S rRNA (same for human and mouse) were used as internal control in the PCR reaction (35). All PCR conditions were in the exponential phase of amplification and, therefore, provided a direct correlation between the amount of products and RNA template abundance in the samples. The PCR products were analyzed on a 2% (w/v) agarose gel and the Quantity-One software (BioRad) was employed for densitometric analysis of the gels.

Statistical analysis. Statistical analysis of significance between control and treated samples from the confocal microscopy quantifications was performed by ANOVA and Student *t*-test. Transfection assays results were analyzed with an unpaired Student *t*-test. The level

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

of significance was set as P‹ 0,05 (*), P‹ 0,01 (**), P‹ 0,001 (***).

RESULTS

HCV non-enveloped particles (HCVne) colocalize with early endosomes. Internalisation of HCVne particles in Huh7 cells was tested by studying their colocalization with EEA1, a specific marker for early endosomes. Fluorescence confocal microscopy visualisation revealed extensive colocalization at 15 minutes post-incubation at 37°C which decreased after 30 minutes (Figure1A,D). Specificity of immunostaining was verified with the use of secondary antibodies Alexa 488 (green) and Alexa 647 (blue), sequentially scanned to avoid any overlaps in the emission spectra (data not shown). Similar results concerning early endosomal localization of particles were obtained in live microscopy, using green fluorescent protein (GFP) - tagged non-enveloped particles instead (described in (11)) together with transiently expressed red fluorescent protein (mRFP)-tagged Rab5 protein. Observed colocalization started approximately 9 minutes after HCVne particles were added. (Figure 1B, Movie 1).

To test the possible involvement of Rab5 in the HCVne particle uptake and trafficking, different Rab5 mutants were used. Rab5S34N is a dominant negative GDP-binding mutant shown to reduce endocytosis of different ligands, and Rab5Q79L is a GTPase-deficient, constitutively active mutant which increases ligand endocytosis (36). Expression of WT (wild type) Rab5 did not affect HCVne particles endocytosis, as colocalization with HCVne could be observed. As expected, an increased endocytosis rate in cells transfected with Rab5Q79L was observed. In contrast, Rab5S34N produced a decrease of particles entry (Figure 1C,E). Additional confirmation of this result was obtained by using EEA1 antibody (data not shown). Overall, these results suggested that between 9 and 15 minutes of incubation at 37°C, HCVne particles were transported to early endosomes, and that Rab5 was involved in this transport.

HCVne particles 'travel' from endosomes to lysosomes in a microtubule-dependent way. A punctuate perinuclear localisation of HCVne particles has been repeatedly observed (11), therefore, an eventual colocalization with late endosomes and lysosomes was investigated. As shown in figure 2A and D, within 1 hour of incubation at 37°C, 62.5% of HCVne particles were present in compartments positive for Rab7, a late endosomal marker, and this percentage decreased over time. This was further confirmed by live microscopy using mRFP-Rab7 plasmid (Figure 2C, Movie 2), where time-lapse series displayed a Rab7 - HCVne colocalization starting at 53 minutes after particle binding. At 4 hours post-incubation at 37°C, 66% of HCVne particles showed colocalization with a well known lysosomal marker, Lamp2 (Figure 2B,E). Similar results were observed with HepG2, another hepatic derived cell line (Figure S1).

The host cytoskeleton, namely the actin filaments and microtubules, has been involved in the trafficking of endocytic compartments. Actin filaments are required for the initial uptake whereas microtubules are involved in maintaining the endosomal traffic between peripheral early and late endosomes (37,38). Our results showed that the transport of particles inside endosomes was mediated by actin filaments and microtubules (Figure S2). Nocodazole disrupts microtubules dynamics (39) and thus, transport from the early endosomes to lysosomes was impaired (40). Increasing concentration of nocodazole increased the colocalization of HCVne particles with early endosomes and decreased their colocalization with lysosomes (Figure 2F). Taken together, these results provided evidence that HCVne particles reached late endosomes after approximately 1 hour of incubation and arrived at lysosomes 3 hours later, in a microtubule-dependent way.

HCV non-enveloped capsid-like particles entry is pH dependent. Many viruses that traffic through the endocytic vesicles require the acidic pH of these compartments for proper transport or to

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

otherwise facilitate function or infection (13,41). We investigated the importance of acidic pH during HCVne particles entry by treating cells with three inhibitors of endosomal acidification, the lysosomotropic agents ammonium chloride (NH_4Cl) and chloroquine, as well as bafilomycin A1, which inhibits the vacuolar H^+-ATPase (42,43). After an adequate pre-treatment of the cells with the inhibitors (15 minutes for NH_4Cl and 30 minutes for bafilomycin A1 and chloroquine) particles were added in the medium for 20 minutes. Unbound capsids were washed away, and incubation continued 40 more minutes (Figure 3A). EEA1 co-staining demonstrated that the particles remained in early endosomes even at 1 hour post-incubation in the drug-treated samples, whereas in the untreated control they moved on to the late endosomes as expected (Figure 3B,C). Differences in the percentage of colocalization were probably due to the efficacy or mechanism of action of each agent. Minimal cell toxicity was observed in drug-treated cells through the spectra of concentration used in this experiment.

Cathepsins B and L are E64-sensitive cysteine proteases that are the most abundant proteases present in endosomes and lysosomes and are active at acidic pHs in a broad range of mammalian cells (44). Incubation of cells with E64 or the aspartic protease inhibitor pepstatin A prior to HCVne addition (Figure 3D) was followed by an increase in the EEA1 colocalisation even 80 minutes after HCVne addition only with E64, thus indicating that cysteine but not aspartic proteases are implicated. Taken together, these results suggested for a strong involvement of acidic pH in HCVne trafficking.

Clathrin-mediated endocytosis is required for HCVne particles entry. Clathrin-mediated endocytosis constitutes the most exploited low pH-dependent internalization pathway used by viruses. However, other pathways including caveolae, macropinocytosis and non-caveolin, non-clathrin endocytosis can be used as well (12). Transferrin is generally accepted as a ligand exclusively internalised via the clathrin-coated-pit pathway (45). Therefore, we internalized Alexa 546-transferrin together with HCVne particles for 15 minutes at 37°C and, as shown in figure 4A, a triple colocalization (EEA1, transferrin, HCVne) was observed, thereby indicating that this pathway is used for particle entry. To further support this observation we used sucrose. Indeed, sucrose is a chemical inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. Its inhibition involves the dispersion of clathrin lattices on the plasma membrane (46). In figures 4B and C, colocalization of either particles or Alexa 546-transferrin with EEA1, was significantly decreased in a dose-dependent way. These results strongly argue towards the clathrin-mediated entry of the HCVne particles uptake in Huh7 cells. However, the lack of complete Alexa 546-transferrin/HCVne colocalization makes an alternative entry pathway plausible.

Endocytosis of HCVne particles mediates activation of MAPK -$ERK_{1/2}$. Endocytosis is a sophisticated process which can regulate different signalling pathways (25-27,47). The MAPK-$ERK_{1/2}$ pathway is involved in the control of many fundamental cellular processes and is targeted by different viruses (26,27). Moreover, earlier studies from our laboratory showed an HCVne particles dependent delocalisation of ERF, a downstream target of $ERK_{1/2,}$ (10,11). In the light of this, we tested $ERK_{1/2}$ phosphorylation in HepG2 cells challenged with HCVne particles. As shown in figure 5A, an approximately 2-fold activation of ERK1 and a 3.5-fold activation of ERK2 were observed 30 minutes post-incubation at 37°C. Epidermal growth factor (EGF 50nM), a well known stimulator of the pathway, was added for 10 minutes as a positive control. ERK-activation by HCVne particles was found to be dose-dependent, since a rising signal was detected with increasing particle concentrations (Figure 5B). Similar results where obtained in Huh7 cells (data not shown). As controls we used either a fraction with the same sucrose density expressing GFP protein

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

instead of core (described in (11)), or the same fraction but heat denaturated (1h at 100°C). In both cases no $ERK_{1/2}$ activation was observed (Figure 5C,D). In addition UO126 and PD98059, specific MEK inhibitors (48), were shown to block ERK activation induced by HCVne particles (Figure 5E,F). Purified bacterial soluble core protein was also tested, and even at high concentrations, no $ERK_{1/2}$ phosphorylation was observed (Figure 5G).

To investigate if the observed $ERK_{1/2}$ signalling occurred during HCVne binding or post-binding processing, endocytosis was inhibited by incubation at 4°C. Binding and inhibition of HCVne particles entry at 4°C has already been demonstrated (11). As shown in figure 4H, no $ERK_{1/2}$ phosphorylation was observed for HCVne or for the control EGF at 4°C, indicating that the activation was endocytosis-dependent. Next, the previously demonstrated ability of NH_4Cl to increase the endosomal pH therefore blocking particles in the endosomes, was used. Treatment of HepG2 cells with this chemical agent decreased $ERK_{1/2}$ phosphorylation produced by HCVne particles (Figure 5I), granting endosomes an important role in the pathway activation. Additional proof was also provided by the use of nocodazole. It is well known that cytoskeleton stability and signalling are correlated. Nocodazole treatment produces not only a peripheral localization of endosomes but also a sustained $ERK_{1/2}$ activation (49). This was also observed in our case (Figure 5J), indicating the possibility of a link between $ERK_{1/2}$ signalling and endosomes. Taken together, these results suggested that HCVne particles were capable of activating the $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ pathway in a dose-dependent way, and that the particulate form and not the protein itself produced this phenomenon.

Host cell proteins influence uptake and trafficking of HCVne particles.

Signal transduction and endocytosis are inseparably linked cell functions (25-27,47). We tested the effects of broad-spectrum phospho-inhibitors in HCVne particles uptake or cellular trafficking by measuring their colocalization with the EEA1 endosomal marker. Cells were pre-treated with the drugs for the adequate time at 37°C, and remained present during incubation time.

We first tested the influence of these inhibitors in the post-binding entry, by testing the EEA1-HCVne colocalization 15 minutes post-incubation at 37°C (Figure 6A). Sodium orthovanadate (5mM), an inhibitor of tyrosine and alkaline phosphatases as well as a number of ATPases, and SB202190 (20μM), a selective p38-MAPK inhibitor, significantly reduced the transport of HCVne particles to early endosomes by 30 and 35% respectively (Figure 6B). Such an effect was not observed in the case of okadaic acid (0.5μM), a general inhibitor of serine/threonine phosphatases or UO126 (1μM) and PD98059 (5μM) MEK inhibitors. To confirm these results, the involvement of MAPK-p38 in the entry process of HCVne particles was tested further with specific phospho-antibodies, where a 2-fold activation was observed at 20 minutes after the addition of the particles (Figure 6C).

Next, we tested whether cellular phospho-proteins were involved in trafficking of HCVne particles from early to late endosomes. Therefore, following pre-treatment of cells, particles where added for 20 minutes, washed off and incubated further for a total of 80 minutes (Figure 6D). Little EEA1-particles colocalization was measured in the control (no inhibitors added) however, a significant colocalization was observed in the presence of sodium orthovanadate, okadaic acid, UO126, PD98059 and SB202190 (Figure 6E). These results suggested that tyrosine phospho-proteins and p38 protein, but not $ERK_{1/2}$ seem to be important for the transport of particles into early endosomes. In contrast, for the processing of the particles from early to late endosomes and lysosomes, $ERK_{1/2}$ and p38 phosphorylation, as well as, serine/threonine and tyrosine phosphatases were necessary. It is important to comment that the unexpected high colocalization observed with sodium orthovanadate and SB202190 inhibitors was probably due to a possible previous

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

obstruction of HCVne particles in early endosomes.

HCVne particles confer induction of immediate early gene (IEG) transcription via $ERK_{1/2}$ nuclear translocation. Upon activation, $ERK_{1/2}$ proteins can either phosphorylate other proteins in the cytoplasm or translocate to the nucleus and activate different genes (50,51). To investigate which possibility is plausible, confocal sections of 100 cells were observed for $ERK_{1/2}$ localization. As shown in figure 7A and B, cells starved or treated with the GFP-expressing and heat-denatured control fractions exhibited almost completely cytoplasmic localisation of $ERK_{1/2}$. In contrast, there was a 46% and 50% nuclear translocation of $ERK_{1/2}$ in the EGF or HCVne particle-treated cells, respectively.

The induction of IEG represents the first major transcriptional response following exposure to extracellular stimuli (52). Specifically, the $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ signalling pathway plays a crucial role in IEG induction by directly activating IEG promoter-bound transcription factors (51,53,54). Thus, we sought to investigate whether the HCVne recombinant particles could affect the transcription of two important IEG genes, *c-fos* and *egr-1*, through $ERK_{1/2}$ activation. For this purpose, hepatic cells were transfected with luciferase reporter plasmids containing *c-fos* or *egr-1* promoter sequences. An important upregulation of luciferase activity was observed with *c-fos* plasmid following incubation of the transfected cells with HCVne particles (Figure 7C) compared to the heat-denatured particles. The response was utterly abolished by the use of MEK inhibitor UO126, therefore showing that it was $ERK_{1/2}$-mediated. A significant upregulation was also observed in the case of *egr-1* - luc plasmid as compared to the heat-denatured control (Figure 7D). On the contrary, the use of UO126 only partially abolished the HCVne particles conferred induction, thereby indicating that there are additional transcription factors regulating *egr-1* promoter activity (55). Furthermore, endogenous mRNA levels of these genes were tested and normalized against 28S (Figure 7E). Up-regulation for both genes was observed at 1 hour post-incubation with HCVne particles and was evident throughout the 24h time-course. Moreover, an important activation was observed in late time-points. As before, the levels of activation of *c-fos* were higher than *egr-1*, probably due to the different promoter's elements. In addition, when HepG2 cells were transfected with GFP-Rab5S34N plasmid, an important downregulation was observed compared to the GFP-Rab5WT transfected cells (Figure 7F), phenomenon which was confirmed by endogenous mRNA levels (Figure 7G), indicating that *c-fos* and *egr-1* activation is related to endocytosis.

Magnitude and duration of $ERK_{1/2}$ phosphorylation is important for IEG promoter activity as well as the stability of the produced proteins (50,53,54). Because we observed high mRNA levels at late hours, especially for *c-fos*, $ERK_{1/2}$ activation was studied. After a peak at 30 minutes, a stable signal was observed for 12 hours (Figure 7I). To further support this observation, stability of c-Fos protein was investigated. It is established that *c-fos* is transcriptionally induced upon stimulation and degraded within 45 minutes unless phosphorylated by $ERK_{1/2}$ (53). High steady-state levels of c-Fos protein in HepG2 nuclear extracts, 6 hours post-incubation with HCVne particles, indicated high protein stability thus suggesting sustained $ERK_{1/2}$ activation (Figure 7H).

Taken together these results suggest that HCVne endocytosis induced $ERK_{1/2}$ phosphorylation followed by its translocation to the nucleus and subsequent transcriptional activation of the *c-fos* and *egr-1* genes. Their expression exhibited the same classic 'immediate early genes' pattern and was entirely (*c-fos*) or partially (*egr-1*) dependent upon the $ERK_{1/2}$ activation and duration.

DISCUSSION

The presence of non-enveloped particles for the hepatitis C virus has been previously described, (2,3) however their role in HCV infection remains unclear.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Clathrin-mediated endocytosis is a commonly exploited entry pathway for members of the *Flaviviridae* family such as west-nile virus (56), dengue virus (57), bovine viral diarrhea virus (58) and HCV enveloped particles (16-18). However, non-enveloped viruses including polyomavirus JC (59), human rhinovirus serotype 2 (21,60) and HBV core particles (61), also use this pathway. Data presented here, suggested that HCVne particles penetrated into hepatic cells via pH-dependent clathrin-mediated endocytosis during which different MAPK pathways were activated. A variety of experimental approaches was utilized to study the detailed entry pathway taken by HCVne particles.

The entry process started with the attachment of HCVne particles at the cell surface which was followed by a clathrin-mediated internalization, and localization of particles to early endosomes. Transferrin, a well known ligand of clarthin-mediated endocytosis, partially colocalized with HCVne particles strongly implying that this pathway was used for HCVne entry. This result was supported by the observation that when using sucrose to inhibit clathrin-mediated endocytosis, colocalization of HCVne with early endosomes was decreased. Furthermore, okadaic acid, a general inhibitor of serine/threonine phosphatases that has been reported to increase caveolar internalisation (62,63) did not have a significant effect in the entry process, making caveolin-dependent endocytosis a less plausible entry pathway. Internalization occured relatively fast, with the majority of entering viral particles internalized in early endosomes between 9 to 15 minutes which correlated with the average time of endosomal dengue virus, foot-and-mouth disease virus and semliki forest virus particles localization (28,57,64).

Endocytosis via clathrin is related to low endosomal pH, therefore we have tested HCVne particles entry in the presence of ammonium chloride, chloroquine and bafilomycin A1, agents that block endosomal acidification. Particles were obstructed in early endosomes even at late time points, indicating that the acidic milieu of this compartment is important in their trafficking. Hepatitis B virus capsid-like core particles follow a similar pathway (61). On the other hand non-enveloped viruses use pH to provoke either detachment from a receptor or to undergo conformational changes (13,21,65). Thus, the role of cathepsins B and L was investigated. Results suggested for a putative effect of these acid-dependent proteases in the HCVne particle stability/disassembly. This finding is also supported by the notion that chloroquine could inhibit cathepsins B and L reversibly (66). It is also important to note that these proteases are abundant in the liver (67), and that other hepatitis viruses as well as non enveloped viruses require their endocytic presence (44,61,65). Further clarification is needed to determine the exact role of these proteases in HCVne traffic.

Early endosomes are characterized by well-defined and peculiar lipid and protein composition, which typically include the small GTPase Rab5 and EEA1. Rab5 contributes to the compartmental specificity, robustness and dynamic properties of the early endosome (36,68) and is shown to be involved in the transport of HCVne particles from the cellular surface to early endosomes, as different mutants provoke changes in the entry rate. This is also established for HBV core particles and adenovirus (61,69). It is interesting to note that Rab5-GTP activity is implicated in HCV genome replication (70).

SB202190, a specific p38 pathway inhibitor caused a significant reduction of the HCVne - early endosome colocalization. Activation of p38 increases endocytic rates allowing more efficient internalisation of cell surface components (71). We also observed a very early activation of p38 after cell incubation with HCVne particles, this event may be important for endocytosis and should be further investigated. Tyrosine phospho-proteins are also involved in HCVne transport to early endosomes as it is the case for SV40 virus (62). A large number of receptors are related to tyrosine kinases (RTK) (72), therefore, it would be

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

tempting to speculate about possible involvement of receptor-mediated endocytosis in the entry of HCVne particles.

After entering early endosomes, HCVne particles moved along from endosomal to lysosomal compartments, with the assistance of the microtubules network. Presented data showed a colocalization of HCVne with late endosomes at 1 hour post incubation reaching maximum colocalization with lysosomes at 4 hours. This phenomenon was further investigated with the use of nocodazole, which suppresses the association and dissociation rates of tubulin thus stabilizing the microtubules dynamics (39). Our results clearly showed that colocalization with lysosomes, diminished impressively in a dose-dependent manner, and HCVne particles where blocked in early endosomes. Various phosphorylated proteins were showed to be essential during early endosome-lysosome transport, such as serine/threonine and tyrosine phosphoproteins, as well as phospho-$ERK_{1/2}$ and possibly phospho-p38.

Previously described data (10,11) concerning specific ERF translocation from the nucleus to the cytoplasm after HCVne particles uptake were further investigated and endocytosis-dependent $ERK_{1/2}$ pathway activation was demonstrated. Maximum activation was observed 30 min after internalization. In contrast no effect was observed when using different controls or soluble core protein indicating that the particulate form induces activation of this pathway.

The endosomal system serves as an intracellular site for the initiation and regulation of signal transduction. The endosome population acts as a platform for the assembly of different signalling effectors (25,47,73,74). One of them, Rab5 has been involved in $ERK_{1/2}$ signal transduction (75,76). When HCVne particles were blocked into early endosomes, after NH_4Cl treatment, $ERK_{1/2}$ activation decreased. An analogous effect of further upregulation of the sustained ERK activation produced by nocodazole treatment was observed due to HCVne obstruction in endosomes. In addition, the use of MEK inhibitors UO126 and PD98059 blocked HCVne particles specific transport from early to late endosomes, but not from the surface to the early endosomes, thereby associating $ERK_{1/2}$ and early endosomes. These results, together with the fact that no $ERK_{1/2}$ activation was observed when endocytosis was blocked at 4^oC, put forward the possibility of an early endosome involvement in signalling. However, $ERK_{1/2}$ activation can also occur from a surface receptor or late endosomes (26,27,47,73,77). Further investigation with specific mutants are in progress.

The importance of $ERK_{1/2}$ pathway in the viral life cycle is well established since it has been reported to influence viral protein expression and replication, as well as host cell modifications (78-80). Endocytosis has been proposed to produce a sustained $ERK_{1/2}$ activation and nuclear accumulation (81,82). Both phenomena were observed during HCVne endocytosis. Previous studies reported a sustained $ERK_{1/2}$ activation in EGF stimulated core-expressing cells that, together with higher basal $ERK_{1/2}$ levels, have been suggested to correlate with hepatocellular carcinoma development and progression (83). Furthermore, activated $MEK_{1/2}$ and $ERK_{1/2}$ are frequently observed in different type of tumors (84,85).

$ERK_{1/2}$ activation and nuclear localisation leads to modulation of IEGs like *c-fos* and *egr-1* (53,54). *c-fos* is a member of the fos family which dimerizes with members of the Jun family to create AP-1 transcription factors that bind to AP-1 binding sites of gene promoters and initiate gene transcription (86). The c-Fos protein is considered as a ‘sensor’ of the duration of $ERK_{1/2}$ activity. Sustained activation allows efficient phosphorylation of the C-terminus of newly synthesized c-Fos stabilizing it for several hours, thus dictating the number and type of genes whose transcriptional regulation is AP-1-mediated (53,54). Our experimental data showed that $ERK_{1/2}$ sustained activation after HCVne endocytosis regulated promoter, mRNA and protein levels of *c-fos*. This is an interesting observation as *c-*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

fos has been found to be overexpressed with high frequency in aggressive and invasive hepatocarcinomas (87). In addition, a similar phenomenon was previously observed with latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus and has been suggested to contribute in viral tumorigenicity (88).

Another IEG, *egr-1*, was found to be upregulated during HCVne endocytosis in a partly $ERK_{1/2}$ - dependent manner. Even though to a lower extent, a sustained transcriptional activation was observed. *Egr-1* upregulation has been described in murine hepatitis virus entry and infection and correlates with the establishment of viral persistence (89). It has also been involved in human polyoma JC, rabies and borna disease viruses life cycles (90,91). Additionally, Lee S. and colleagues (92) observed that HCV core protein stimulated *egr-1* phosphorylation, which indirectly increased insulin-like growth factor II (IGF-II) gene transcription (93). IGF-II has been implicated in tumor progression of several tumor cell types including prostate, hepatoma, pancreatoma and breast cancer (94). It is noteworthy that in prostate cancer, significantly increased *egr-1* levels were recorded in tumors with aggressive morphology (95), making *egr-1* an important target protein for antiviral therapy.

In conclusion, different forms of HCV particles have been found in the circulation of infected individuals, among them naked capsids (2,3). HCV propagation although progressed, it is restricted to certain genotypes and additionaly HCV production of different forms of viral particles in cell culture is still largely limited, begging the question of whether naturally occurring HCVne particles can indeed be infectious. Another interesting question raised by this study was whether HCVne particles, possessing a highly conserved YXXL and distal di-leucine motifs that represent primary endocytosis signals (96) had the potential to be endocytosed and to activate the $ERK_{1/2}$ pathway as proposed in Figure 8. Similar endocytic processing was reported for recombinant HBV capsid-like particles (61).

Cellular environment modifications produced by signalling events similar to those exerted by the endocytotic properties of HCVne particles could potentially be of major importance for HCV life cycle and severity of the disease during natural HCV infection. Furthermore, virus-like particles (VLPs) are attractive as a recombinant protein vaccine because they have proved to be efficient in generating powerful immune responses (97). Recent data (98) offered support, for HCV core protein, towards this possibility. Thus, particle uptake and processing during HCV natural infection can possibly be involved in the intricate processes of immune activation and immune evasion by the virus. Data presented in this study can provide evidence for additional important features of particulate HCV core protein, rising new questions concerning its role as regulator of cellular functions leading to HCV disease progression.

Acknowledgements. We thank P. Foka for useful discussions and Dr. D. Blaas for critical reading. We also thank our colleague Dr. K. Lazaridis (Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute) for assisting in statistical analysis. This work was supported by PENED 03EΔ297, co-financed by E.U.-European Social Fund (75%) and the Greek Ministry of Development-GSRT (25%).

REFERENCES

1. But, D. Y., Lai, C. L., and Yuen, M. F. (2008) *World J Gastroenterol* **14**(11), 1652-1656
2. Andre, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., and Lotteau, V. (2005) *Semin Liver Dis* **25**(1), 93-104

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

3. Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., and Budkowska, A. (2001) *J Virol* **75**(17), 8240-8250
4. Noppornpanth, S., Smits, S. L., Lien, T. X., Poovorawan, Y., Osterhaus, A. D., and Haagmans, B. L. (2007) *J Virol* **81**(22), 12496-12503
5. Sugiyama, K., Suzuki, K., Nakazawa, T., Funami, K., Hishiki, T., Ogawa, K., Saito, S., Shimotohno, K. W., Suzuki, T., Shimizu, Y., Tobita, R., Hijikata, M., Takaku, H., and Shimotohno, K. (2009) *J Virol* **83**(13), 6922-6928
6. Iwai, A., Marusawa, H., Takada, Y., Egawa, H., Ikeda, K., Nabeshima, M., Uemoto, S., and Chiba, T. (2006) *J Viral Hepat* **13**(8), 523-531
7. Yagi, S., Mori, K., Tanaka, E., Matsumoto, A., Sunaga, F., Kiyosawa, K., and Yamaguchi, K. (2005) *J Med Virol* **77**(3), 399-413
8. Lechmann, M., Murata, K., Satoi, J., Vergalla, J., Baumert, T. F., and Liang, T. J. (2001) *Hepatology.* **34**(2), 417-423.
9. Acosta-Rivero, N., Rodriguez, A., Musacchio, A., Falcon, V., Suarez, V. M., Martinez, G., Guerra, I., Paz-Lago, D., Morera, Y., de la Rosa, M. C., Morales-Grillo, J., and Duenas-Carrera, S. (2004) *Biochem Biophys Res Commun.* **325**(1), 68-74.
10. Tsitoura, P., Georgopoulou, U., Petres, S., Varaklioti, A., Karafoulidou, A., Vagena, D., Politis, C., and Mavromara, P. (2007) *FEBS Lett* **581**(21), 4049-4057
11. Katsarou, K., Serti, E., Tsitoura, P., Lavdas, A. A., Varaklioti, A., Pickl-Herk, A. M., Blaas, D., Oz-Arslan, D., Zhu, R., Hinterdorfer, P., Mavromara, P., and Georgopoulou, U. (2009) *Biochimie* **91**(7), 903-915
12. Pelkmans, L., and Helenius, A. (2003) *Curr Opin Cell Biol* **15**(4), 414-422
13. Tsai, B. (2007) *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 23-43
14. Smith, A. E., and Helenius, A. (2004) *Science* **304**(5668), 237-242
15. von Hahn, T., and Rice, C. M. (2008) *J Biol Chem* **283**(7), 3689-3693
16. Codran, A., Royer, C., Jaeck, D., Bastien-Valle, M., Baumert, T. F., Kieny, M. P., Pereira, C. A., and Martin, J. P. (2006) *J Gen Virol* **87**(Pt 9), 2583-2593
17. Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., and Rouille, Y. (2006) *J Virol* **80**(14), 6964-6972
18. Meertens, L., Bertaux, C., and Dragic, T. (2006) *J Virol* **80**(23), 11571-11578
19. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12), 7271-7276
20. Tscherne, D. M., Jones, C. T., Evans, M. J., Lindenbach, B. D., McKeating, J. A., and Rice, C. M. (2006) *J Virol* **80**(4), 1734-1741
21. Bayer, N., Schober, D., Huttinger, M., Blaas, D., and Fuchs, R. (2001) *J Biol Chem* **276**(6), 3952-3962
22. Chung, S. K., Kim, J. Y., Kim, I. B., Park, S. I., Paek, K. H., and Nam, J. H. (2005) *Virology* **333**(1), 31-40
23. Wang, K., Huang, S., Kapoor-Munshi, A., and Nemerow, G. (1998) *J Virol* **72**(4), 3455-3458
24. Parker, J. S., and Parrish, C. R. (2000) *J Virol* **74**(4), 1919-1930
25. Miaczynska, M., Pelkmans, L., and Zerial, M. (2004) *Curr Opin Cell Biol* **16**(4), 400-406
26. McPherson, P. S., Kay, B. K., and Hussain, N. K. (2001) *Traffic* **2**(6), 375-384
27. Greber, U. F. (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**(4), 608-626
28. Vonderheit, A., and Helenius, A. (2005) *PLoS Biol* **3**(7), e233

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

29. Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R. C., Hitzler, J. K., Ma, Z., Morris, S. W., and Prywes, R. (2003) *Mol Cell Biol* **23**(18), 6597-6608
30. Mattera, R., and Bonifacino, J. S. (2008) *Embo J* **27**(19), 2484-2494
31. Groot, M., Boxer, L. M., and Thiel, G. (2000) *Eur J Cell Biol* **79**(12), 924-935
32. Kockar, F. T., Foka, P., Hughes, T. R., Kousteni, S., and Ramji, D. P. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**(2), 362-372
33. Li, Y. Q., Tao, K. S., Ren, N., and Wang, Y. H. (2005) *World J Gastroenterol* **11**(28), 4427-4430
34. Kim, S. O., Kwon, J. I., Jeong, Y. K., Kim, G. Y., Kim, N. D., and Choi, Y. H. (2007) *Biosci Biotechnol Biochem* **71**(9), 2169-2176
35. Kong, S. E., Hall, J. C., and McCauley, R. D. (1999) *Anal Biochem* **271**(1), 111-114
36. Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994) *Embo J* **13**(6), 1287-1296
37. Durrbach, A., Louvard, D., and Coudrier, E. (1996) *J Cell Sci* **109 (Pt 2)**, 457-465
38. Girao, H., Geli, M. I., and Idrissi, F. Z. (2008) *FEBS Lett* **582**(14), 2112-2119
39. Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (1997) *Mol Biol Cell* **8**(6), 973-985
40. Matteoni, R., and Kreis, T. E. (1987) *J Cell Biol* **105**(3), 1253-1265
41. Gruenberg, J., and van der Goot, F. G. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7), 495-504
42. Ohkuma, S., and Poole, B. (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(7), 3327-3331
43. Perez, L., and Carrasco, L. (1994) *J Gen Virol* **75 (Pt 10)**, 2595-2606
44. Qiu, Z., Hingley, S. T., Simmons, G., Yu, C., Das Sarma, J., Bates, P., and Weiss, S. R. (2006) *J Virol* **80**(12), 5768-5776
45. Willingham, M. C., Hanover, J. A., Dickson, R. B., and Pastan, I. (1984) *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(1), 175-179
46. Heuser, J. E., and Anderson, R. G. (1989) *J Cell Biol* **108**(2), 389-400
47. Teis, D., and Huber, L. A. (2003) *Cell Mol Life Sci* **60**(10), 2020-2033
48. English, J. M., and Cobb, M. H. (2002) *Trends Pharmacol Sci* **23**(1), 40-45
49. Birukova, A. A., Birukov, K. G., Gorshkov, B., Liu, F., Garcia, J. G., and Verin, A. D. (2005) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(1), L75-84
50. Ebisuya, M., Kondoh, K., and Nishida, E. (2005) *J Cell Sci* **118**(Pt 14), 2997-3002
51. Turjanski, A. G., Vaque, J. P., and Gutkind, J. S. (2007) *Oncogene* **26**(22), 3240-3253
52. Herdegen, T., and Leah, J. D. (1998) *Brain Res Brain Res Rev* **28**(3), 370-490
53. Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J. (2002) *Nat Cell Biol* **4**(8), 556-564
54. Murphy, L. O., MacKeigan, J. P., and Blenis, J. (2004) *Mol Cell Biol* **24**(1), 144-153
55. Chalmers, C. J., Balmanno, K., Hadfield, K., Ley, R., and Cook, S. J. (2003) *Biochem J* **375**(Pt 1), 99-109
56. Chu, J. J., and Ng, M. L. (2004) *J Virol* **78**(19), 10543-10555
57. van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., and Smit, J. M. (2008) *PLoS Pathog* **4**(12), e1000244
58. Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., and Rouille, Y. (2005) *J Virol* **79**(16), 10826-10829

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

59. Pho, M. T., Ashok, A., and Atwood, W. J. (2000) *J Virol* **74**(5), 2288-2292
60. Snyers, L., Zwickl, H., and Blaas, D. (2003) *J Virol* **77**(9), 5360-5369
61. Cooper, A., and Shaul, Y. (2006) *J Biol Chem* **281**(24), 16563-16569
62. Pelkmans, L., Puntener, D., and Helenius, A. (2002) *Science* **296**(5567), 535-539
63. Parton, R. G., Joggerst, B., and Simons, K. (1994) *J Cell Biol* **127**(5), 1199-1215
64. O'Donnell, V., LaRocco, M., Duque, H., and Baxt, B. (2005) *J Virol* **79**(13), 8506-8518
65. Chandran, K., and Nibert, M. L. (2003) *Trends Microbiol* **11**(8), 374-382
66. Otto, H. H., and Schirmeister, T. (1997) *Chem Rev* **97**(1), 133-172
67. Xing, R., Addington, A. K., and Mason, R. W. (1998) *Biochem J* **332 (Pt 2)**, 499-505
68. Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., and Wandinger-Ness, A. (2007) *J Cell Sci* **120**(Pt 22), 3905-3910
69. Rauma, T., Tuukkanen, J., Bergelson, J. M., Denning, G., and Hautala, T. (1999) *J Virol* **73**(11), 9664-9668
70. Stone, M., Jia, S., Heo, W. D., Meyer, T., and Konan, K. V. (2007) *J Virol* **81**(9), 4551-4563
71. Felberbaum-Corti, M., Cavalli, V., and Gruenberg, J. (2005) *Methods Enzymol* **403**, 367-381
72. Hubbard, S. R., and Miller, W. T. (2007) *Curr Opin Cell Biol* **19**(2), 117-123
73. Sadowski, L., Pilecka, I., and Miaczynska, M. (2009) *Exp Cell Res* **315**(9), 1601-1609
74. Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**(9), 609-622.
75. Barbieri, M. A., Fernandez-Pol, S., Hunker, C., Horazdovsky, B. H., and Stahl, P. D. (2004) *Eur J Cell Biol* **83**(6), 305-314
76. Hunker, C. M., Kruk, I., Hall, J., Giambini, H., Veisaga, M. L., and Barbieri, M. A. (2006) *Arch Biochem Biophys* **449**(1-2), 130-142
77. Lu, A., Tebar, F., Alvarez-Moya, B., Lopez-Alcala, C., Calvo, M., Enrich, C., Agell, N., Nakamura, T., Matsuda, M., and Bachs, O. (2009) *J Cell Biol* **184**(6), 863-879
78. Sharma-Walia, N., Krishnan, H. H., Naranatt, P. P., Zeng, L., Smith, M. S., and Chandran, B. (2005) *J Virol* **79**(16), 10308-10329
79. Panteva, M., Korkaya, H., and Jameel, S. (2003) *Virus Res* **92**(2), 131-140
80. Zheng, Y., Li, J., Johnson, D. L., and Ou, J. H. (2003) *J Virol* **77**(14), 7707-7712
81. Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2005) *Cell Cycle* **4**(3), 352-355
82. Kermorgant, S., and Parker, P. J. (2008) *J Cell Biol* **182**(5), 855-863
83. Giambartolomei, S., Covone, F., Levrero, M., and Balsano, C. (2001) *Oncogene* **20**(20), 2606-2610
84. Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M. K., Rodrigue-Gervais, I. G., Gaboury, L., Lamarre, D., Basik, M., and Meloche, S. (2008) *BMC Cancer* **8**, 337
85. Sebolt-Leopold, J. S. (2004) *Curr Pharm Des* **10**(16), 1907-1914
86. Karin, M. (1995) *J Biol Chem* **270**(28), 16483-16486
87. Feo, F., Frau, M., Tomasi, M. L., Brozzetti, S., and Pascale, R. M. (2009) *Exp Biol Med (Maywood)* **234**(7), 726-736

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

88. Vaysberg, M., Hatton, O., Lambert, S. L., Snow, A. L., Wong, B., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (2008) *J Biol Chem* **283**(52), 36573-36585
89. Cai, Y., Liu, Y., and Zhang, X. (2006) *Virology* **355**(2), 152-163
90. Fu, Z. F., Weihe, E., Zheng, Y. M., Schafer, M. K., Sheng, H., Corisdeo, S., Rauscher, F. J., 3rd, Koprowski, H., and Dietzschold, B. (1993) *J Virol* **67**(11), 6674-6681
91. Romagnoli, L., Sariyer, I. K., Tung, J., Feliciano, M., Sawaya, B. E., Del Valle, L., Ferrante, P., Khalili, K., Safak, M., and White, M. K. (2008) *Virology* **375**(2), 331-341
92. Lee, S., Park, U., and Lee, Y. I. (2001) *Virology* **283**(2), 167-177
93. Eto, K., Kaur, V., and Thomas, M. K. (2006) *Endocrinology* **147**(6), 2923-2935
94. Adamson, E. D., and Mercola, D. (2002) *Tumour Biol* **23**(2), 93-102
95. Eid, M. A., Kumar, M. V., Iczkowski, K. A., Bostwick, D. G., and Tindall, D. J. (1998) *Cancer Res* **58**(11), 2461-2468
96. Li, Y., Marzolo, M. P., van Kerkhof, P., Strous, G. J., and Bu, G. (2000) *J Biol Chem* **275**(22), 17187-17194
97. Ruedl, C., Schwarz, K., Jegerlehner, A., Storni, T., Manolova, V., and Bachmann, M. F. (2005) *J Virol* **79**(2), 717-724
98. Acosta-Rivero, N., Poutou, J., Alvarez-Lajonchere, L., Guerra, I., Aguilera, Y., Musacchio, A., Rodriguez, A., Aguilar, J. C., Falcon, V., Alvarez-Obregon, J. C., Soria, Y., Torres, D., Linares, M., Perez, A., Morales-Grillo, J., and Duenas-Carrera, S. (2009) *Biol Res* **42**(1), 41-56

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. **HCVne particles enter early endosomes.** A) Confocal microscopy of immunolabeled Huh7 cells incubated with HCVne particles using anti-core (green) or anti-EEA1 (red) antibodies at 5 (a), 15 (b) or 30 (c) minutes. Colocalization is shown in yellow in the merged images and inset. Bars: a,b: 20µm, c: 8µm. B) Selected images obtained from a time series, representing GFP fluorescent HCVne particles (11) in mRFP-Rab5 transfected cells. Arrows indicate traffic of fluorescent spot (min:sec) (Movie S1). C) Huh7 transfected cells with GFP-Rab5WT, GFP-Rab5S34N or GFP-Rab5Q79L plasmids treated with HCVne particles for 15 minutes. Immunofluorescence staining with anti-core (red) antibody. Bars: a: 20µm, b,c 16µm. D and E) Image-Pro Plus quantification of colocalization for HCVne with EEA1 from panel A and with GFP-Rab5 WT and mutants from panel C.

FIGURE 2. **Presence of HCVne particles in late endosomes and lysosomes.** A) Confocal microscopy using anti-core (green) antibody and mRFP-Rab7 plasmid (red) for 30 minutes (a), 1 (b) and 3 (c) hours of HCVne particles incubation. Colocalization is observed in yellow in the merged images and inset. Bars: a: 8µm, b: 16µm, c: 20µm. B) Following HCVne particles addition, Huh7 cells, were co-labelled with anti-core (green) and anti-Lamp2 (red) antibodies at 1 (a), 2.5 (b) or 4 (c) hours of incubation at 37°C. Insets show high magnification regions of the merged images. Bars: 16µm. C) Time series pictures of GFP fluorescent HCVne particles (11) incubated with mRFP-Rab7 expressing cells (Movie S2). Arrows indicate traffic of fluorescent HCVne particles (min:sec). D and E) Colocalization's quantification for HCVne particles with Rab7 and Lamp-2 respectively. F) Disruption of microtubules with increasing concentrations of nocodazole. Cells were pretreated for 2h, HCVne were added for 20 minutes and cells were fixed 4 hours later. EEA1-HCVne colocalization is shown in light grey bars and Lamp2-HCVne in dark grey bars.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

FIGURE 3. **HCVne particles require low pH for internalization** A) Schematic diagram representation of the experiment. B) Huh7 cells untreated (a) or incubated with 5mM NH_4Cl (b), 20μM chloroquine (c), or 50nM bafilomycin (d) were added with particles as described in A and immunolabeled with anti-core (green) and anti-EEA1 (red) antibodies. Inset images show a higher magnification of the boxed section of the merged pictures. Bars: a, b, d: 16μm, c: 20μm. C) Image-Pro quantification of colocalization. The control was arbitrarily set at 100% and all other values are a percentage of this. D) Quantification of colocalization from cells treated with E64 (50μm–2,5 hours) and pepstatin A (50μm-2,5 hours). Cells were pretreated with the inhibitors as described in A.

FIGURE 4. **HCVne particles are internalised via a clathrin-dependent pathway.** A) HCVne particles and Alexa 546-transferrin (red) in Huh7 cells, processed for immunofluorescence with anti-core (green) and anti-EEA1 (blue) antibodies. Arrows show individual endosomes positive for the two markers (insets). Bar: 16μm. B) Schematic diagram representation of the experiment. C) Quantification of colocalization of HCVne particles and transferrin with EEA1. Huh7 cells pre-treated with increasing concentrations of sucrose. Following addition of HCVne particles or transferrin, cells were fixed and immunostained either with anti-core/anti-EEA1 or anti-EEA1.

FIGURE 5**. HCVne particles activate $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ pathway.** A) Time course of $ERK_{1/2}$ phosphorylation from lysates of HepG2 cells maintained in serum-free conditions incubated with HCVne particles for 10, 20, 30, 40 and 60 minutes at 37°C. EGF (50nM) was used as positive control. Western blot with phospho-$ERK_{1/2}$ (a), $ERK_{1/2}$ (b), and quantification of the optical densities of phospho-ERK immunoreactive bands normalized to the optical densities of total $ERK_{1/2}$ in the same samples (c) are presented. ERK1 is represented in light grey bars and ERK2 in dark grey bars.B) HepG2 cells, maintained in serum-free conditions, were incubated with increasing concentrations of HCVne particles (expressed in ng of core protein). (C) HepG2 cells treated with a fraction of equivalent sucrose density from Sf9 cell lysates infected with a control (GFP only producing) baculovirus or (D) with the HCVne fraction heat denatured (1h at 100°C). E and F) HepG2 cells were pre-treated with MEK inhibitors UO126 or PD98059 at increasing concentrations before being treated with HCVne particles for 30 minutes. G) HepG2 cells treated with soluble bacterial core protein added at increasing concentrations for 30 minutes. H) HepG2 cells were incubated at either 4°C or 37°C followed by 30 minutes of HCVne particles and 10 minutes of EGF addition. I and J) NH_4Cl (5mM-15 minutes) or nocodazole (4μM-2 hours) treated cells with HCVne for 30 minutes. All lysates were analyzed by immunoblotting as described in A.

FIGURE 6. **Implication of host cell proteins in HCVne trafficking.** A and D) Schematic representation of the experiment. HepG2 cells were pre-treated with sodium orthovanadate (5mM-30 minutes), okadaic acid (0.5μM-30 minutes), UO126 (1μM–1.5 hours), PD98059 (5mM–1.5 hours) and SB202190 (20μM–1.5 hours). Particles were added for either 15 minutes (B) or for 20 minutes, removed and incubated until 80 minutes (E). Cells were fixed, immunostained with anti-core (green) and anti-EEA1 (red) and observed with confocal microscopy. Nine to fifteen confocal sections from three to five different experiments were selected and quantified with Image-Pro Plus software. C) HCVne particles were added in HepG2 cells for indicated times. Lysates were analysed by western blotting with anti-phospho-p38 (a) or anti-p38 (b) antibodies. Densitometric analysis is expressed in arbitrary units (c).

FIGURE 7. **Endocytosis-dependent $ERK_{1/2}$ nuclear translocation, sustained activation and IEG upregulation.** A) Untreated starved Huh7 cells or treated with EGF (50nM-10 minutes), HCVne particles (30 minutes), heat denaturated fraction (1h at 100°C-30 minutes) and a fraction of equivalent sucrose density from Sf9 cell lysates infected with a control (GFP producing) baculovirus (30 minutes) were fixed, and immunostained with anti-

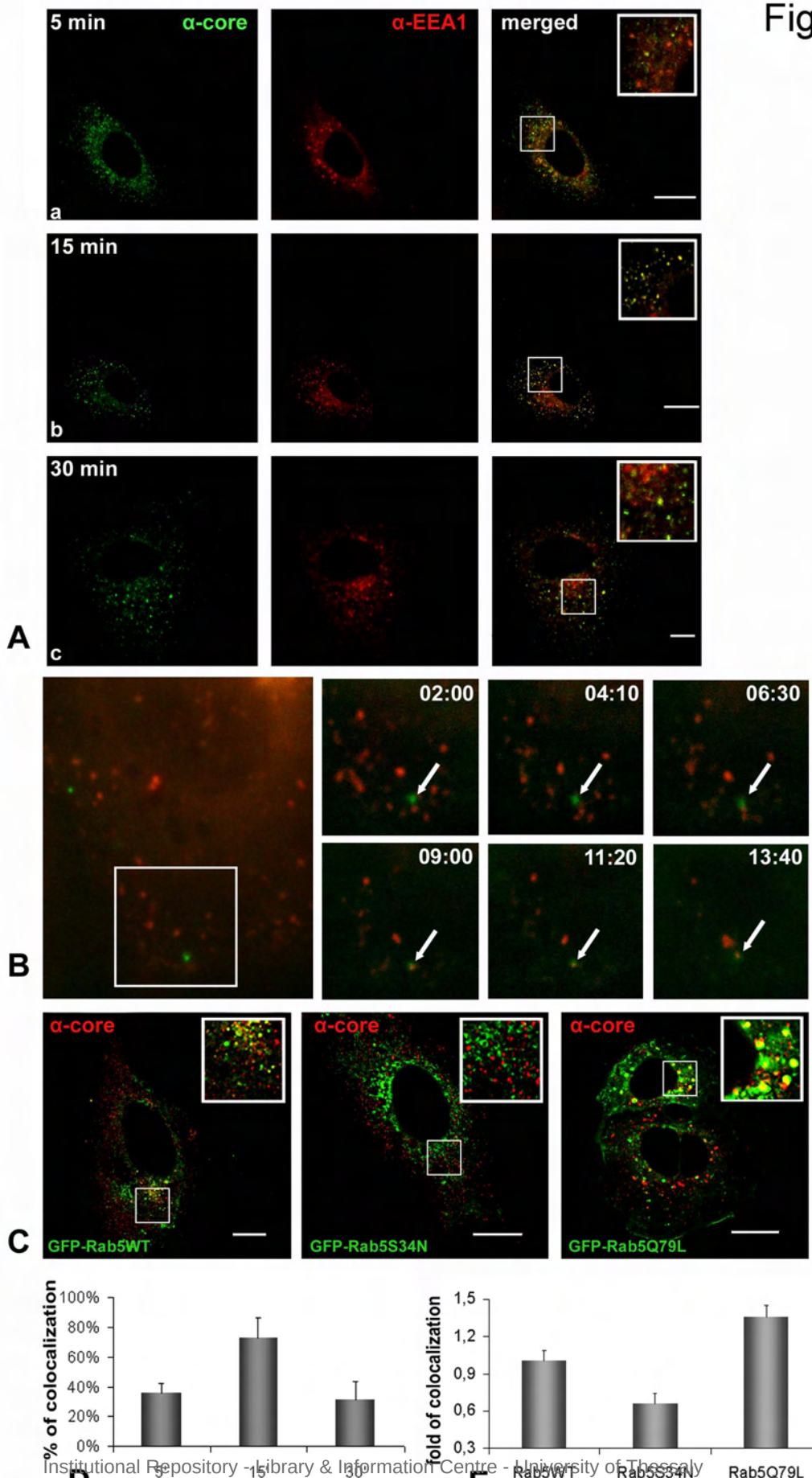
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

$ERK_{1/2}$. 100 cells were counted for nuclear and cytoplasmic ERK localisation. B) Representative confocal sections are presented. C**,** D, F) HepG2 cells were transfected with pFos WT-GL3 (c-fos), Egr1.2-luc (egr-1) and/or GFP-Rab5WT, GFP-Rab5S34N plasmids for 24 hours, then serum starved for 8 hours, and treated or not with HCVne particles or with controls (same fraction heat denatured) for 18 hours. Relative light units were measured and values were normalised to the total protein amount. E, G) Total mRNAs from HepG2 cells transfected or not with GFP-Rab5WT, GFPRab5S34N were isolated at indicated time points and cells incubated with HCVne. RT-PCR was performed with specific primers for *c-fos* (a) , *egr-1* (b), 28S (c). Densitometric results were normalized against 28S are in arbitrary units (c) (representative experiment of triplicates). H) Nuclear extract of HepG2 cells treated for 6 hours with HCVne particles and immunostained with c-fos antibody. I) Incubation of cells with HCVne particles at various times, immunostained with anti-phospho $ERK_{1/2}$ (a), $ERK_{1/2}$ (b) and densitometric analysis of ERK1 and ERK2 after normalisation against total ERKs is also presented in (c).

FIGURE 8. **Hypothetical model for HCVne particle entry** HCVne particles enter the cells most likely by the clathrin-dependent pathway, even though an alternative entry pathway is not excluded, and reach early endosomes. p38 as well as tyrosine phoshatases are involved in this process. At 1 hour of incubation, particles are progressing to late endosomes in a $ERK_{1/2}$ and serine/threonine phosphatases dependent manner. Finally, particles reach the lysosomes (4 hours). During this progression the $MEK_{1/2}$-$ERK_{1/2}$ pathway is activated in a sustainable manner. When phosphorylated ERKs proteins translocate to the nucleus and activate immediate early genes *c-fos* and *egr-1*.

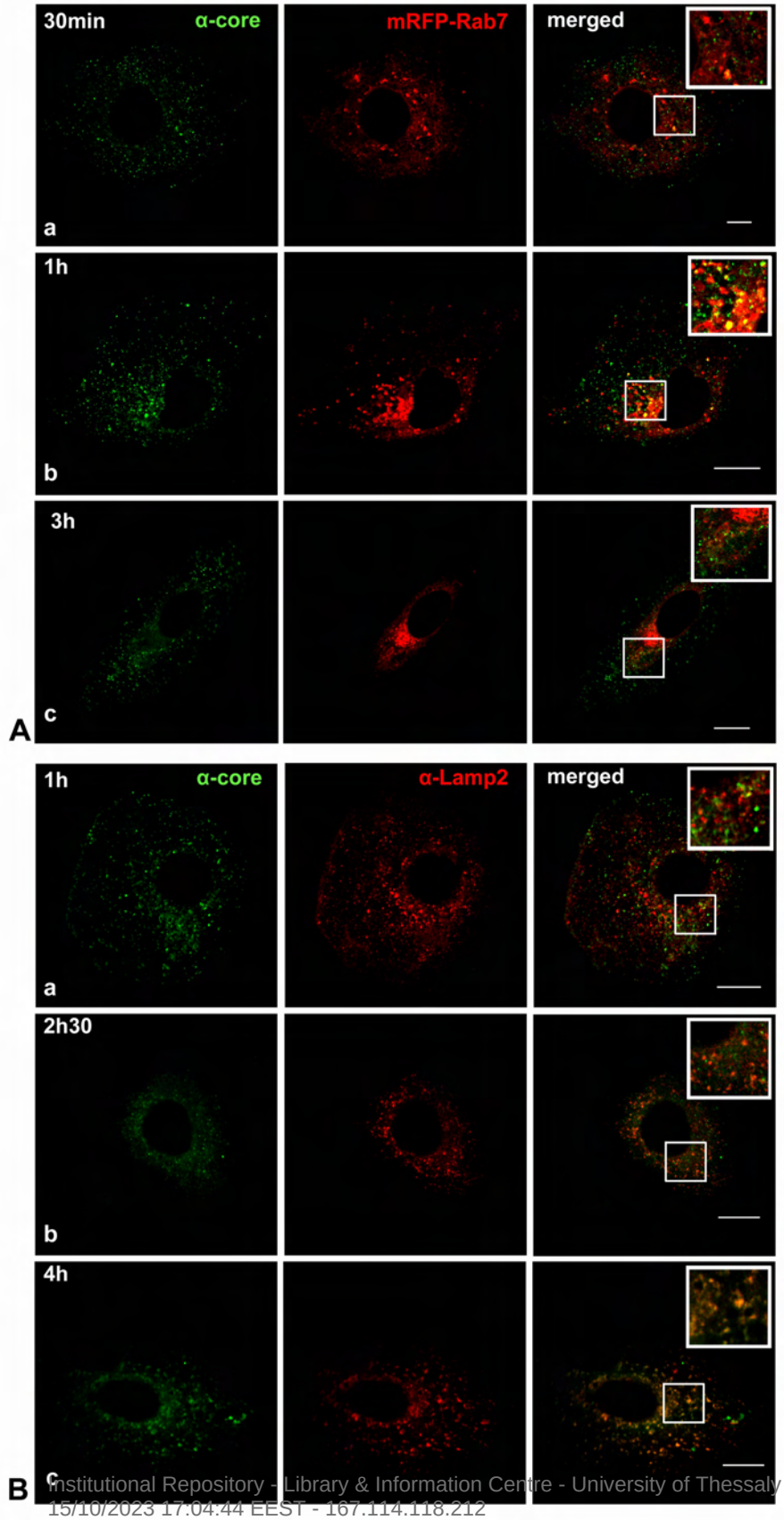
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

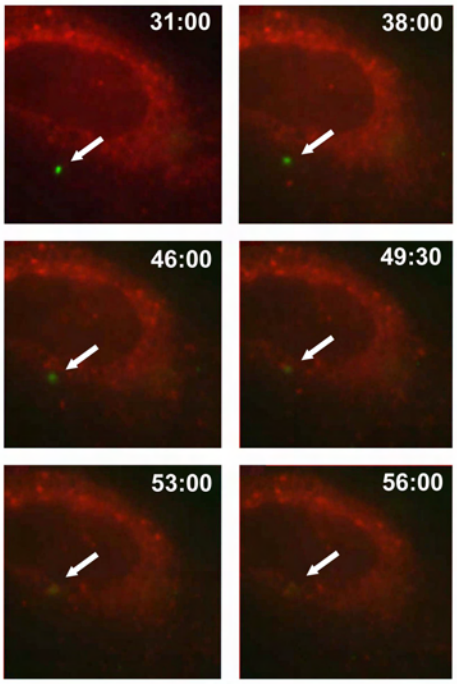
Fig.1

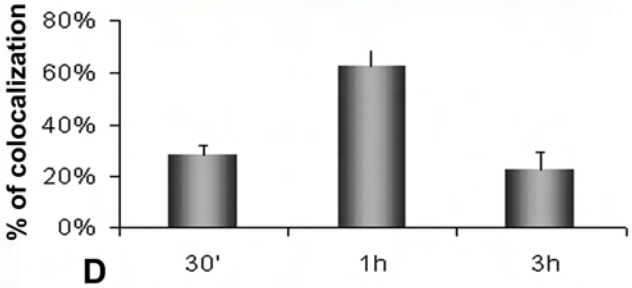


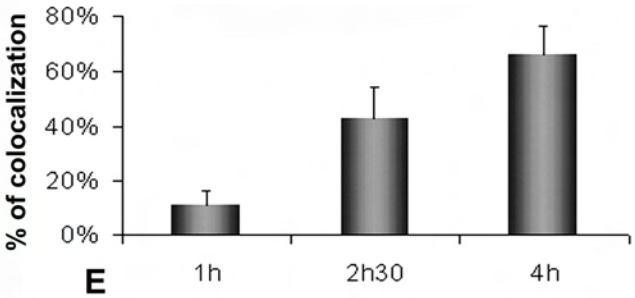
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

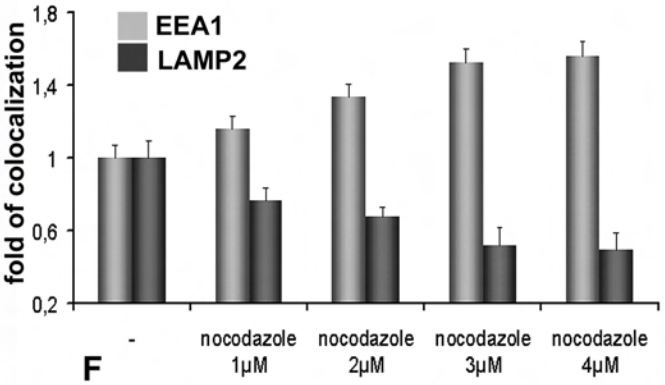
Fig.2











Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig.3

A

Pre-treat with inhibitors | +/- HCVne | Remove HCVne | Fixation

0 min | 20 min | 60 min

control | α-core | α-EEA1 | merged

a

NH_4Cl

b

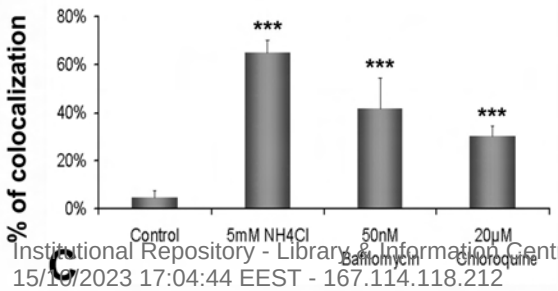
Bafilomycin

c

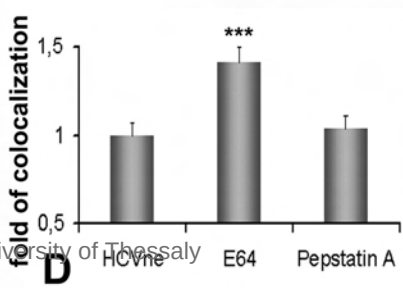
Chloroquine

d

B



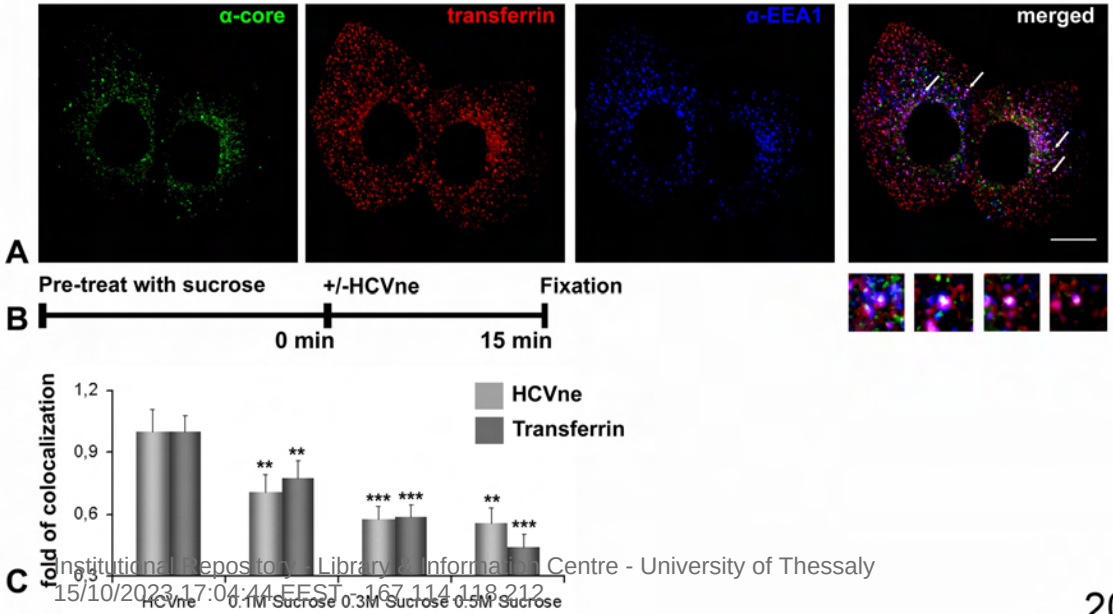
C



D

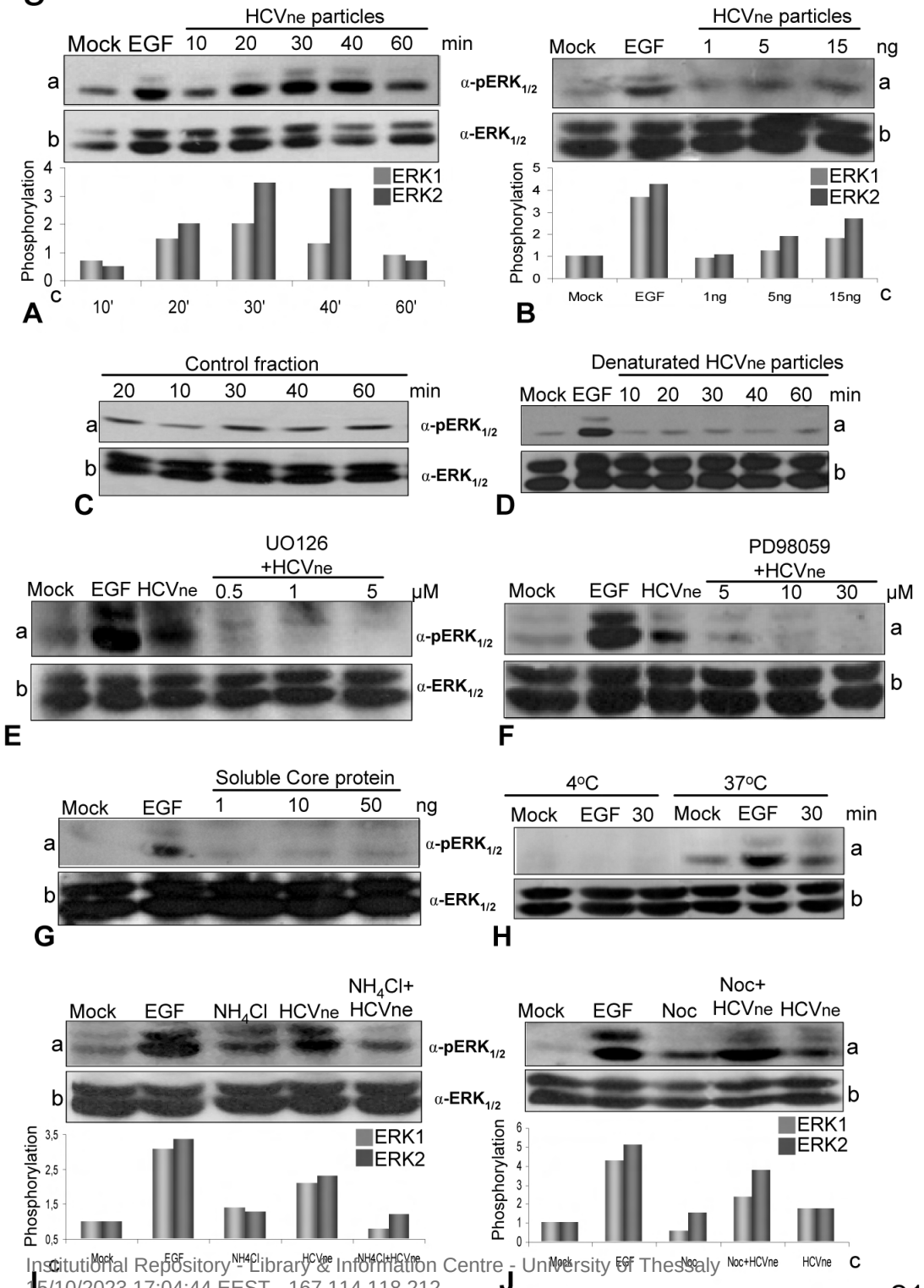
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig. 4



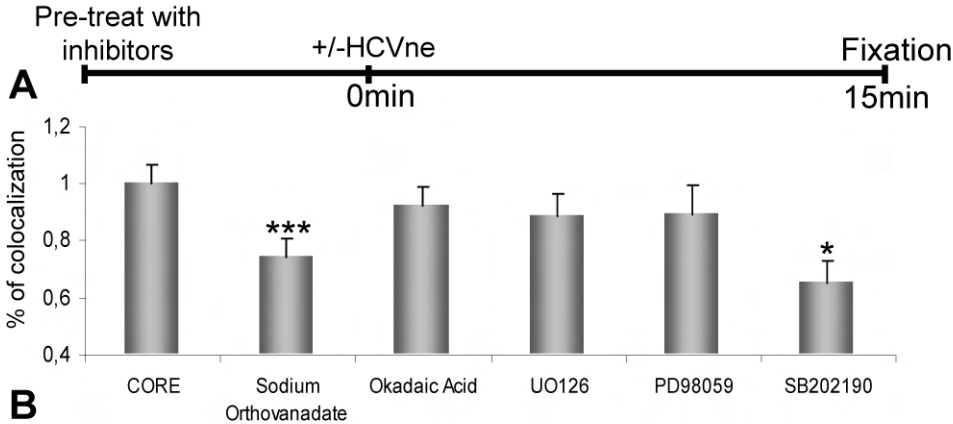
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

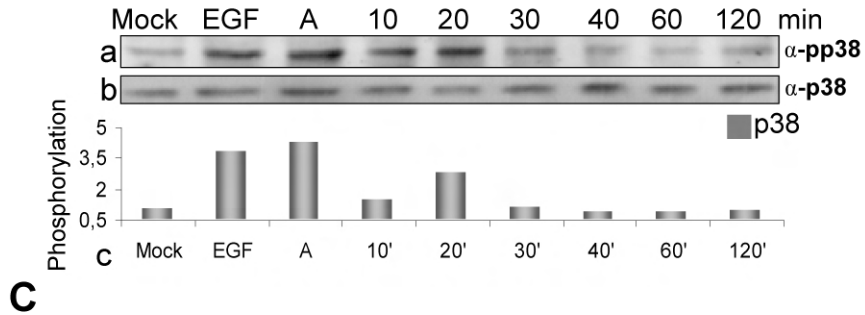
Fig. 5

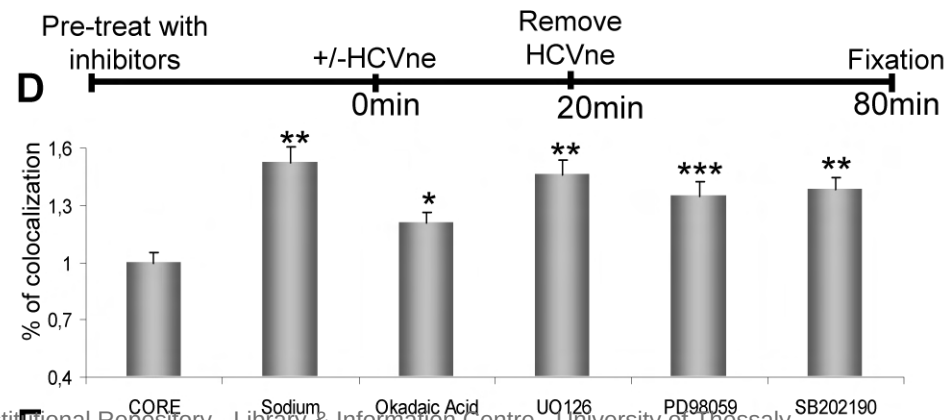


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig. 6

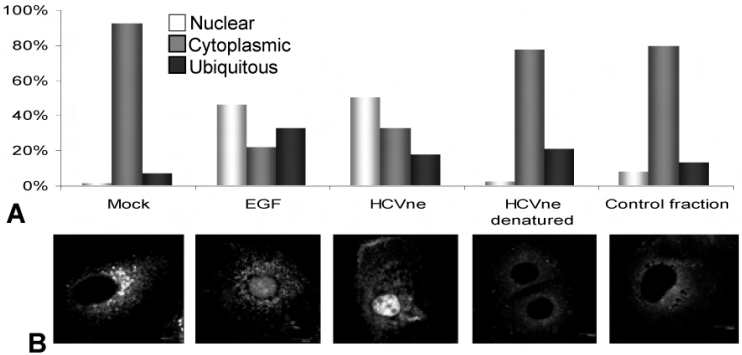


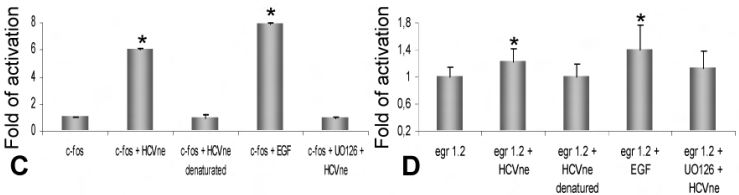


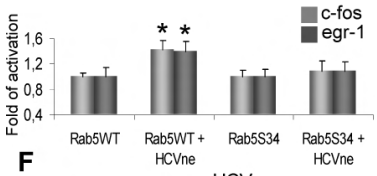


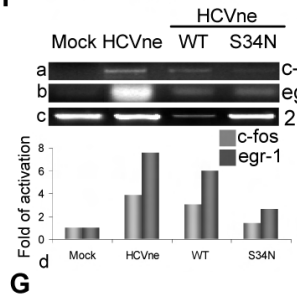
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

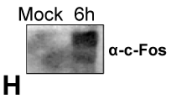
Fig.7

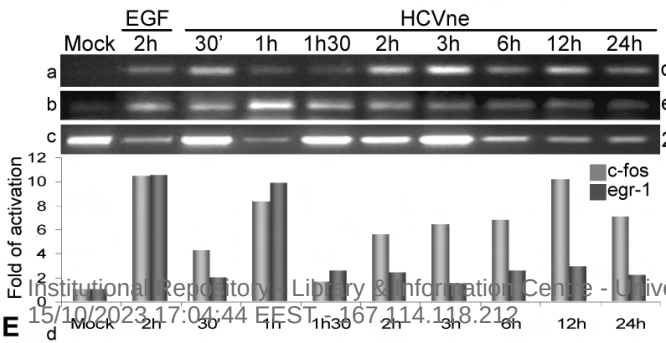


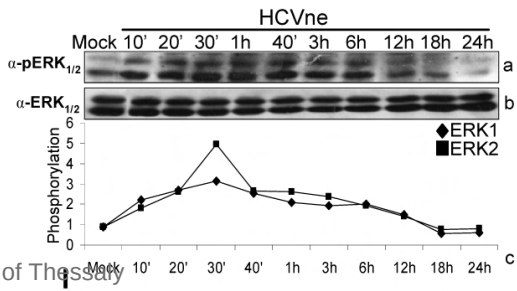






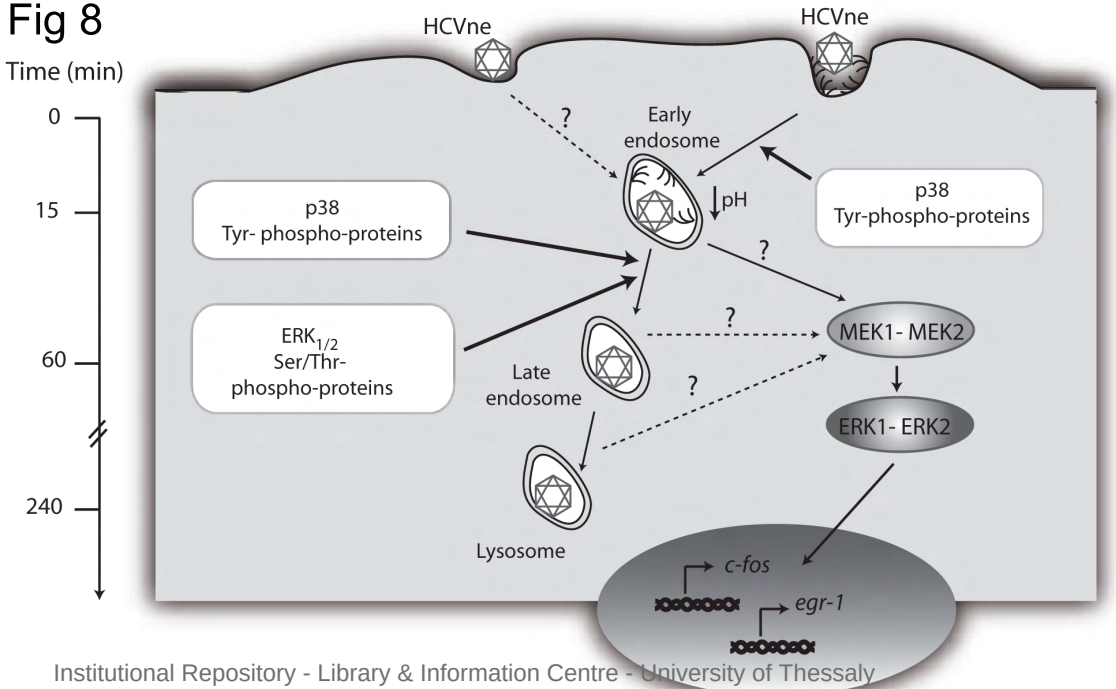






Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig 8



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Supplemental data

FIGURE S1. **HCVne particles in HepG2 cells follow an indentical progression from early to late endosomes and lysosomes.** Cells were incubated with HCVne particles for 15 minutes or 3 hours and immunostained with anti-core (green) and anti-EEA1/anti-Lamp2 (red). Cells were also transfected with mRFP-Rab7 (red). 24 hours post-transfection HCVne particles were added for 1 hour, and cells were fixed and immunostained for anti-core (green). Colocalization is observed in yellow. Bars: 8μm

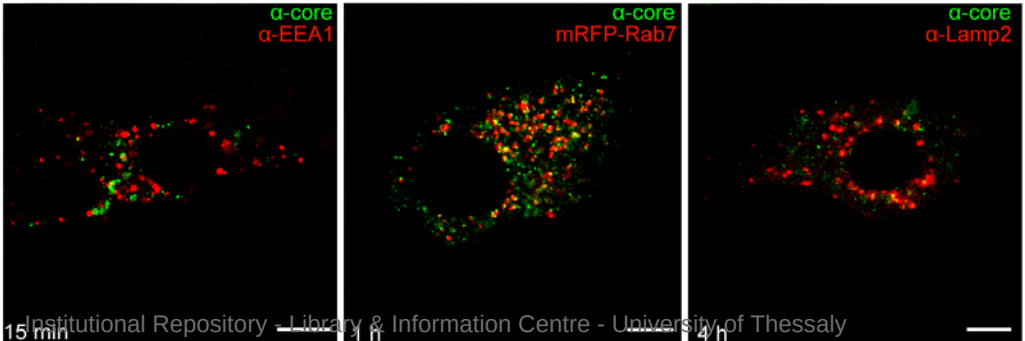
FIGURE S2. **HCVne particles in endosomes use actin filaments and microtubules for their traffic.** A) HCVne particles were added for 15 minutes in Huh7 cells wich were fixed and immunolabeled with anti-core (green) / anti-EEA1 (blue) antibodies and counterstained with Alexa 546-phalloidin. B) Huh7 cells where transfected with mRFP-Rab5. 24 hours post-transfection, cells were incubated with HCVne for 15 minutes, immunostained with anti-core (green) and anti-α tubulin (blue). Parts of cells are presented and a triple colocalization (white spot) is observed.

Movie 1. **HCVne particles colocalize with early endosomes.** Dual-color live fluorescence microscopy experiment recorded in Huh7 cells transfected with mRFP-Rab5 (red) in the presence of green fluorescent GFP-HCVne particles described in (11). One picture every 10 second was recorded with a 100x objective at 37°C for 20 minutes after recombinant HCVne binding.

Movie 2. **HCVne particles colocalize with late endosomes.** Live Huh7 cells transfected with mRFP-Rab7 (red) and challenged with green fluorescent GFP-HCVne particles (11). Video was recorded 30 minutes after particles were added with 60x objective at 37°C for 30 minutes (one picture every 30 seconds). Time elapsed from the beginning of recording is noted in each frame of figure 2C.

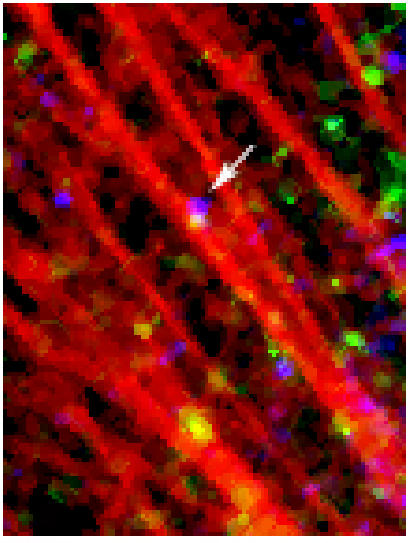
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig. S1



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Fig. S2

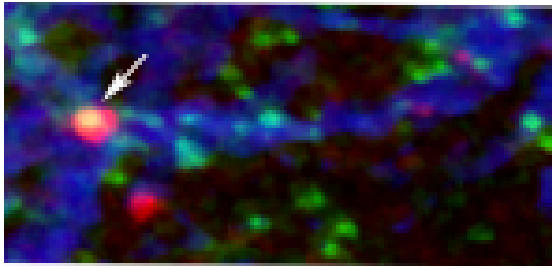


A

Phalloidin

α-EEA1

α-core



B

mRFP-Rab5

α-alpha tubulin

α-core

Institutional Repository - Librar
15/10/2023 17:04:44 EEST - 1

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2006-2009 : Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Ελληνικό ινστιτούτο παστέρ, τμήμα Μοριακής Ιολογίας σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Υπεύθυνη : Δρ. Γεωργοπούλου Ουρανία, επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π : Μαρκουλάτος Παναγιώτης
Θέμα : Μελέτη της τροποποίησης της σηματοδότησης των MAPKs- ERKs παρουσία των *HCV* δομικών πρωτεϊνών.

2004-2005 : Μεταπτυχιακό D.E.A.στη Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία. Ειδικότητα: Βιολογία φυτών. Πανεπιστήμιο 'Louis Pasteur' Strasbourg I, France.
Εργαστήριο IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes - CNRS). Τμήμα Ιολογίας
Θέμα : Comparative studies of translation strategies between *Pararetrovirus* (CaMV) and *Retrovirus* (Human Spumavirus)
Υπεύθυνοι καθηγητές : Mario Keller, Lyubov Ryabova
(Ισότιμο προς τα απονεμόμενα από τα Ελληνικά Α.Ε.Ι. : Δ.Ο.Α.Τ.Α.Π. Αρ. Πραξης 3-1454)

1999-2004 : Πτυχίο στη Βιοχημεία. Ειδικότητα: Μοριακή και Κυτταρική Βιοχημεία. Πανεπιστήμιο 'Louis Pasteur' Strasbourg I, France.
(Ισότιμο και αντίστοιχο προς τα απονεμόμενα πτυχία του τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης : Δ.Ο.Α.Τ.Α.Π. Αρ. Πράξης 3-132)

1999 : Απολυτήριο 3ου Γενικού Λυκείου Κέρκυρας

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Νοέμβριος 2003 : Πρακτική στο IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes). Τμήμα Ιολογίας.
Θέμα: Expression analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing p25 protein of *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV)
Υπεύθυνοι Καθηγητές: David Gilmer, Laure Schmidlin

Καλοκαίρι 2001 : Πρακτική στο Γενικό Νοσοκομείο της Κέρκυρας Τμήμα: Μικροβιολογικό, Βιοχημικό και Αιματολογικό. Υπεύθυνη: Ε.Παναγιωτάκη – Γατσούλη.

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

K. Katsarou, A. Lavdas, E. Serti, P. Tsitoura, P. Mavromara , U. Georgopoulou

'Endocytosis of recombinant HCV non-enveloped capsid-like particles produce $ERK_{1/2}$ - $MAPK_s$ signaling events' 16th International symposium on hepatitis C virus and related viruses (Nice, October 2009)

Κ.Κατσαρού, Ε.Σέρτη, Ρ.Τσίτουρα, Π. Μαυρομαρά, Ο. Γεωργοπούλου

'Διέγερση των $MAPK_s$ που οφείλεται σε ανασυνδυασμένα γυμνά νουκλεοκαψίδια του ιού της ηπατίτιδας c' 11ο πανελλήνιο ηπατολογικό συνέδριο (Κέρκυρα, 7-11 Μαίου 2009)

Κ.Κατσαρού, Ε.Σέρτη, Π. Τσίτουρα, Ο. Γεωργοπούλου

'Μελέτη της κυτταρικής σηματοδοτήσεως των μιτογονο – ενεργοποιούμενων κινασών ERKs (MAPKs-ERKs) οφειλομένης σε ανασυνδιασμένα γυμνά νουκλεοκαψίδια του ιού της ηπατίτιδας C' 9th Greek virology congress (Athens, November 2008)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

K.Katsarou, E. Serti, P, Tsitora, P.Mavromara, U.Georgopoulou

'Signaling events following cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsids-like particles' New developments in quantitative molecular bioscience (Spetses, September 2008)

U. Georgopoulou, P. Tsitoura, E. Serti, K Katsarou, M. Kalamvoki, P. Mavromara

'The hepatitis C NS5A protein activates PP2A and impairs T cell proliferation'
14th International symposium on hepatitis C virus and related viruses (Glasgow, September 2007)

K. Katsarou, M. Keller and L. Ryabova.

'Primate foamy virus (PFV) pregenomic RNA translation initiation strategies'
XIIIth International congress of virology IUMS 2005 (San Francisco, July 2005)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΑ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

E. Serti, K. Katsarou, P. Foka, G. Thyphronitis, P. Tsitoura, P. Mavromara, U. Georgopoulou.

'Modulation of p38 signaling pathway by HCV non-enveloped capsid like particles' 34th FEBS Congress, Life's Molecular Interactions (Prague, 4-9 July 2009)
FEBS J. 276: 251-251 Suppl 1 jul 2009

K. Katsarou, E. Serti, P. Tsitoura, P. Mavromara and U. Georgopoulou

'Signaling events upon cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsid like particles'
33th FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, biochemistry of cell regulation (Athens, June 2008)
FEBS J. 275: 271-271 Suppl 1 Jul 2008

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

'Η ενδοκύτωση των νουκλεοκαψιδίων χωρίς φάκελο του ιού της ηπατίτιδας C προκαλούν διέγερση της σηματοδότησης MAPKs-$ERK_{1/2}$'
60th National conference of biochemistry and molecular biology (Αθήνα, Νοέμβριος 2009)

'Signaling events following cellular uptake of recombinant HCV non-enveloped capsids-like particles'
New developments in quantitative molecular bioscience (Spetses, September 2008)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Katsarou K. και συνεργάτες

MEK5-ERK5-*mef*2 pathway is activated by HCV non-enveloped particles (προς υποβολή)

K. Katsarou, A.A. Lavdas, P. Tsitoura, E. Serti, P. Markoulatos, P. Mavromara and U. Georgopoulou

Endocytosis of recombinant HCV non-enveloped capsid-like particles activate MAPK-$ERK_{1/2}$ pathway (έχει υποβληθεί)

Schepetilnikov M, Schott G, Katsarou K, Thiébeauld O, Keller M, Ryabova LA,

Molecular dissection of the prototype foamy virus (PFV) RNA 5'-UTR identifies essential elements of a ribosomal shunt. Nucl. Acids Res. 2009; 1-10 doi:10.1093/nar/gkp609

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Katsarou K, Serti E, Tsitoura P, Lavdas A, Varaklioti A, Pickl-Herk A, Blaas D, Oz-Arslan D, Zhu R, Hinterdorfer P, Mavromara P, Georgopoulou U.

Green Fluorescent Protein-tagged HCV non-enveloped capsid like particles: Development of a new tool for tracking HCV core uptake. Biochimie 2009; 91,7: 903-915

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (παρουσιάσεις σε σχολεία) (2006-2009)
Αρωγό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Ιολογίας (ΕΕΒΜΒ)
Συμμετοχή στο συνέδριο '59th National conference of biochemistry and molecular biology' (Αθήνα, Δεκέμβριος 2007)
Συμμετοχή στο συνέδριο '10èmes Rencontres de Virologie Végétale' (Aussois, Γαλλία, Μάρτιος 2005)
Συμμετοχή στα ενημερωτικά σεμινάρια για την ασφάλεια στα ερευνητικά εργαστήρια "Hygiène et sécurité' (Illkirch, Αλσατία, Γαλλία, Οκτώβρης 2004)
Συμμετοχή στο συνέδριο I.D.T.A. teacher's seminar (Leicester, Αγγλία, Ιούλιος 2002)
Συμμετοχή στην οργανωτική επιτροπή του ευρωπαϊκού προγράμματος 'Socrates Comenius' μεταξύ σχολείων της Κέρκυρας (Ελλάδα) και της Ταρραγκόνας (Ισπανία) (1999)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του ΠΕΝΕΔ 2003 με κωδικό έργου 03ΕΔ297 και τίτλο :

'Ανάπτυξη ιικού συστήματος ετερόλογης έκφρασης και παραγωγής ιικών σωματιδίων – ψευδοκαψιδίων του ιού της ηπατίτιδας C και χρήση αυτών για την μελέτη τροποποίησης της σηματοδότησης των MAPKs και NFκB μονοπατιών'

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/10/2023 17:04:44 EEST - 167.114.118.212