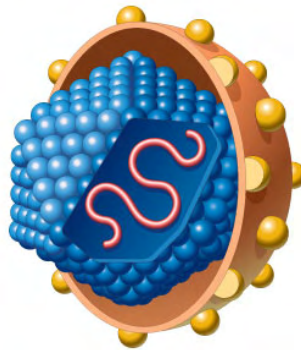




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΙΟΥ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ:

ΡΟΛΟΣ ΙΪΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CORE+1



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΙΣΣΑΣ Γ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΓΕΝΕΤΙΣΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ABSTRACT

MECHANISMS OF HCV PATHOGENESIS : ROLE OF VIRAL CORE+1 PROTEIN

Hepatitis C virus (HCV) was discovered in 1989 as the major causative agent of non-A, non-B hepatitis. It is an enveloped, single stranded, positive sense RNA virus and belongs to the family of *Flaviviridae*. Studies around the globe have identified seven major HCV genotypes and more than 100 different subtypes. It is estimated that more than 170 million people are infected worldwide, that covers about 3% of the world's population. This virus establishes a chronic infection in most acutely infected individuals, frequently leading to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

The genome of HCV is 10-kb long and encodes a single polyprotein that is proteolytically cleaved by cellular and viral proteases producing three structural (core, E1, and E2) and at least six non-structural (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, and NS5B) proteins. In addition, several studies from independent laboratories have established the existence of another viral protein by definition that is expressed during the natural course of HCV infection. Originally this protein was found to be expressed from an alternate open reading frame (ORF) overlapping the core encoding region in the +1 frame of genotype 1a (designated as AFRP, F, or core+1/F protein). Work from Boulant et al showed that the core+1 protein was found to be expressed also in genotype 1b. In addition, a shorter form of the core+1 protein has been observed derived from internal translation initiation codons at positions 85/8. A smaller core+1/S protein can be observed in the absence of these codons, the protein is still produced by an internal translation initiation site at codon 26. Another scientific group described another internal translation initiation codon at codon 26, though the resulting core+1 protein cannot be observed in the absence of codons 85/87.

To a greater extent the true nature of the core+1 viral protein has not yet been determined, although it is believed that some of the functions attributed to the core protein may actually be due to the core+1 protein or to the combined effects of both proteins. In the present study we investigated the effect of the novel HCV core+1 protein on the transcriptional and translational regulation of several hepatic genes, such as the α -1 antitrypsin. We provide strong evidence that instead of having a modulatory effect on the α 1-antitrypsin from core protein, being a transcriptional regulator, we observed such an effect from the novel core+1 protein. This effect is mediated through C/EBP, a major transcription factor for liver. Furthermore we tried to generate transgenic mouse lines that will express independently HCV core and core+1 proteins, in order to observe any regulatory differences in the mouse hepatic cells.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας Γ αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια χρόνιας ηπατικής νόσου παγκοσμίως. Στην Ελλάδα ο επιπολασμός της χρόνιας λοίμωξης από τον ιό υπολογίζεται σε 1,5-2%. Αν και ελαττώθηκε η λοίμωξη μετά τα τέλη της δεκαετίας του 1980, παλαιότερα μη διαγνωσμένα περιστατικά αναμένεται να αυξήσουν σημαντικά τον αριθμό ασθενών με χρόνια λοίμωξη την επόμενη δεκαετία.

Ο ιός της ηπατίτιδας Γ μεταδίδεται κυρίως παρεντερικά και η χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών αποτελεί σήμερα το συχνότερο τρόπο διασποράς του. Η οξεία ιϊκή λοίμωξη είναι κυρίως ασυμπτωματική και μεταπίπτει σε χρόνια σε 60-80% των ασθενών. Άνω του 90% των ασθενών με χρόνια λοίμωξη αναπτύσσουν χρόνια ηπατίτιδα και ίνωση του ήπατος και σε ποσοστά 20-30% εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο κίρρωσης του ήπατος, ηπατική ανεπάρκεια, ή και ηπατοκυτταρικό καρκίνο εντός 20ετίας. Αντι-ιϊκή θεραπεία πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-άλφα και ριμπαβιρίνης βελτιώνει αποτελεσματικά τις ηπατικές βλάβες και αναστέλλει την εξέλιξη της χρόνιας ηπατίτιδας Γ σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο.

Το γονιδίωμα του ιού της ηπατίτιδας Γ φέρει ένα κανονικό ανοιχτό και ένα εναλλακτικό +1 πλαίσιο ανάγνωσης, που κωδικοποιούν πολυπρωτεΐνη και πρωτεΐνη F ή ARFP ή core+1, αντίστοιχα. Το εναλλακτικό αυτό πλαίσιο ανάγνωσης +1 στερείται κωδικού έναρξης, υποδηλώνοντας ότι στην έκφρασή του εμπλέκονται ασυνήθιστοι μηχανισμοί μετάφρασης και συμμετέχει με αμινοξικά κατάλοιπα στην δημιουργία χιμαιρικών πρωτεϊνών με τμήματα καψιδιακής πρωτεΐνης. Απόδειξη μετάφρασης της πρωτεΐνης core+1 σε φυσική μόλυνση με τον ιό έδωσε η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι επιτόπων core+1 σε ορρούς ασθενών με οξεία ή χρόνια λοίμωξη. Επίσης, το 2008 οι *Vassilaki et al.* έδειξαν ότι τα εναρκτήρια κωδικόνια 85 και 87 είναι συντηρημένα στους γονότυπους 1α και 1β του ιού με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη core+1/S να είναι η επικρατέστερη core+1 μορφή.

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν μηχανισμοί παθογένειας του ιού της ηπατίτιδας Γ και ιδιαίτερα ο ρόλος των ιϊκών πρωτεϊνών core και core+1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας συγκεκριμένων υποκινητών ηπατικών γονιδίων, που αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες του ξενιστή μπορεί να οδηγήσουν σε ηπατική βλάβη και καρκίνο. Επιπλέον, ένας άλλος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν ξεχωριστά τις πρωτεΐνες core και core+1 στο ήπαρ, ώστε να συγκριθεί η ογκογόνος δράση και η ρυθμιστική λειτουργία τους στα ηπατικά κύτταρα των πειραματοζώων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ.....	9
1.1.1 Οικογένεια φλαβοϊών	9
1.1.2 Ιστορική αναδρομή του ιού της ηπατίτιδας Γ.....	11
1.1.3 ΜΗ – Α ΜΗ – Β ηπατίτιδα	12
1.1.4 Η ανακάλυψη του ιού της ηπατίτιδας Γ.....	14
1.1.5 Επιδημιολογία	14
1.1.6 Τρόποι μετάδοσης του ιού	16
1.1.7 Τροπισμός του ιού.....	18
1.1.8 Φυσική πορεία της μόλυνσης	18
1.1.9 Κλινική εικόνα του ιού	22
1.1.10 Ήπαρ - ο ξενιστής του ιού	24
1.1.11 Θεραπεία.....	27
1.1.12 Συστήματα μελέτης του ιού της ηπατίτιδας Γ.....	28
1.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ.....	29
1.2.1 Πρωτεΐνη core	30
1.2.2 Πρωτεΐνες E1 και E2	31
1.2.3 Πρωτεΐνη p7	32
1.2.4 Πρωτεΐνη NS2	32
1.2.5 Πρωτεΐνες NS3 και NS4A	32
1.2.6 Πρωτεΐνη NS4B.....	33
1.2.7 Πρωτεΐνη NS5A.....	33
1.2.8 Πρωτεΐνη NS5B.....	34
1.2.9 Πρωτεΐνη core+1	34

1.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΟΙ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ	39
1.3.1 Μεταγραφή και RNA πολυμεράση	39
1.3.2 RNA πολυμεράση II και βασικός υποκινητής.....	40
1.3.3 Μεταγραφικοί παράγοντες	41
1.3.4 Οικογένεια CCAAT	41
1.3.5 Πρωτεΐνη C/EBPα	45
1.3.6 Πρωτεΐνη C/EBPβ	46
1.3.7 Πρωτεΐνη C/EBPγ.....	47
1.3.8 Πρωτεΐνη C/EBPδ	47
1.3.9 Πρωτεΐνη C/EBPε.....	48
1.3.10 Πρωτεΐνη C/EBPζ.....	48
1.3.11 Αλβουμίνη	48
1.3.12 A1- Αντιτρυψίνη	49
1.3.13 Απολιποπρωτεΐνη Β.....	50
1.3.14 Εψιδίνη	50
1.3.15 Αλκοολική αφυδρογονάση 6.....	50
1.4 ΣΤΟΧΟΙ-ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	51
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
2.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	53
2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ).....	76
2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	77
2.4.1 Παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων DH-5α για μετασχηματισμό.	77
2.4.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH5α	78
2.4.3 Απομόνωση DNA Μικρής κλίμακας – Μέθοδος βρασμού boiling lysis (miniprep).....	79
2.4.4 Απομόνωση DNA Μεσαίας κλίμακας – Μέθοδος με Nucleobond kit (midiprep)	80
2.4.5 Απομόνωση DNA Μεγάλης κλίμακας – Μέθοδος με PEG 8000 (maxiprep)	81
2.4.6 Κατάτμηση DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	82

2.4.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	83
2.4.8 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	83
2.4.9 Αποφωσφορυλίωση των άκρων του DNA.....	86
2.4.10 Αντίδραση Klenow / T4 πολυμεράσης για την συμπλήρωση των υπολειπόμενων άκρων.....	87
2.4.11 Σύνδεση ενός πλασμιδιακού φορέα με ξένο τμήμα DNA	87
2.4.12 Ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	88
2.4.13 Ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης.	88
2.4.14 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	90
2.4.15 Ανοσοσύτωση τύπου WESTERN.....	91
2.4.16 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών	93
2.4.17 Λύση κυττάρων	95
2.4.18 Αποϋβριδισμός και επαναϋβριδισμός της μεμβράνης.....	97
2.4.19 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	98
2.4.20 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	99
2.4.21 Δείκτες DNA και πρωτεϊνών	100
2.4.22 Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης.....	100
2.4.23 Απομόνωση DNA από βιοψία ουράς ποντικού	101
2.4.24 Απομόνωση DNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.	102
2.4.25 Μέθοδος ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης.....	103
2.4.26 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης	106
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	111
3.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE/CORE+1 ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.	111
3.1.1 Αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών core και core+1 με χιμαιρικούς υποκινητές.	111
3.1.2 Επίδραση των πρωτεϊνών core και core+1 στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης..	117
3.1.3 Ανάλυση της ειδικότητας του φαινομένου.....	119
3.1.4 Αλληλεπίδραση ιικών πρωτεϊνών core και core+1 με γονοτυπο 1b στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης.	120

3.1.5 Επίδραση ιϊκών πρωτεΐνων core και core+1 με γονότυπο 1a στα ενδογενή επίπεδα της α1-αντιτρυψίνης.	121
3.1.6 Επίδραση ιϊκών πρωτεΐνων core και core+1 με γονότυπο 1a στα ενδογενή επίπεδα της α1-αντιτρυψίνης απο βιοψίες.	122
3.1.7 Η ιϊκή πρωτεΐνη core+1 με γονότυπο 1a ρυθμίζει τη μεταγραφική δράση του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης μέσω C/EBP.	123
3.1.8 Η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP στον υποκινητή επηρεάζεται απο την πρωτεΐνη core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ.	128
3.1.9 Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντισώματα C/EBP, επιβεβαιώνει πρόσδεση ετεροδιμερούς C/EBP στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης.	130
3.1.10 Η πρωτεΐνη core+1/S ρυθμίζει τη πρωτεΐνη C/EBPβ, σε επίπεδο πρωτεΐνης και όχι mRNA	133
3.1.11 Επίδραση της πρωτεΐνης core+1/S στη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή σε συνθηκες χαλάρωσης της χρωματίνης.	134
3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE/CORE+1 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ.	135
3.2.1 Επίδραση των πρωτεΐνων core και core+1 στον υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης.	135
3.2.2 Επίδραση των ιϊκών πρωτεΐνων core και core+1 της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a στα ενδογενή επίπεδα της αλβουμίνης.	137
3.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ W/T CORE, CORE+1 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ.	138
3.3.1 Κατασκευή πλασμιδίων για τη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών ποντικών που θα εκφράζουν ιϊκές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.	138
3.3.2 Έκφραση των διαγονιδιακών πλασμιδίων σε κύτταρα ηπατικής προελεύσεως.	138
3.3.3 Προετοιμασία του διαγονιδίου πριν τον εμβολιασμό των ποντικών C57/Bl6-CBA.	142
3.3.4 Εμβολιασμός των ποντικών C57/Bl6-CBA και ανίχνευση της πρωτεΐνης W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.	143
3.3.5 Παραγωγή της διαγονιδιακής σειράς ποντικών W/T core με γονότυπο 1a.	145
3.3.6 Εμβολιασμός ποντικών C57/Bl6-CBA και ανίχνευση της πρωτεΐνης core+1/S με γονότυπο 1a.	149
3.3.8 Κατασκευή πλασμιδίων για τη δημιουργία διαγονιδιακής σειράς ποντικών που θα εκφράζει την ιϊκή πρωτεΐνη W/T core με γονότυπο 1b.	150
3.3.9 Προετοιμασία του διαγονιδίου W/T core 1b πριν τον εμβολιασμό των C57/Bl6-CBA ποντικών.	150

3.3.10. Εμβολιασμός των ποντικών C57/Bl6-CBA και ανίχνευση της ενσωμάτωσης της διαγονιδιακής αλληλουχίας W/T core 1b	151
3.3.11. Παραγωγή της W/T core με γονότυπο 1b διαγονιδιακής σειράς ποντικών.....	152
3.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΙΣΧΥΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ CMV ΚΑΙ EF-1α	153
3.4.1 Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων για την μελέτη των δύο υποκινητών.	153
3.4.2 Διαμόλυση κυτταρικής σειράς BHK-21 με πλασμίδια pHPI 1733 και 1734.....	153
3.4.3 Παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών χρησιμοποιώντας τα πλασμίδια pHPI 1733 και pHPI 1734.....	155
3.4.4 Διαμόλυση κυτταρικών σειρών HepG2 και Huh-7 με τα πλασμίδια pHPI 1733 και pHPI 1734. .	157
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	160
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	166

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ

Ο ιός της ηπατίτιδας Γ ανήκει στην οικογένεια των φλαβοϊών. Μία συνοπτική επισκόπηση της οικογένειας των φλαβοϊών είναι απαραίτητη για την πληρέστερη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του ιού της ηπατίτιδας Γ.

1.1.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΦΛΑΒΟΪΩΝ

1.1.1.A ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι Φλαβοϊοί ανήκουν στην β ομάδα των ορμποϊών και ήταν ταξινομημένοι ως γένος της οικογένειας των τογκαϊών μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1980¹. Παρά τις πολλές ομοιότητες των φλαβοϊών με τους τογκαϊούς, διαχωρίστηκαν λόγω των σημαντικών διαφορών τους ως προς την στρατηγικές ιϊκής αντιγραφής και μοριακής δομής. Ο διαχωρισμός των φλαβοϊών σε νέα οικογένεια έγινε από τον Δρ. Westaway. Το όνομα της οικογένειας των φλαβοϊών προέρχεται από τη λατινική λέξη flavi που σημαίνει κίτρινο². Συνολικά υπάρχουν 66 είδη φλαβοϊών που διαχωρίζονται ορολογικά σε 7 ομάδες. Ένα από αυτά τα είδη των φλαβοϊών είναι και ο ιός της ηπατίτιδας Γ που ανήκει στην ομάδα των Pestiviruses.

1.1.1.B ΓΕΝΙΚΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι Φλαβοϊοί περιβάλλονται από έλυτρο, είναι σφαιρικοί ή πλειόμορφοι με διάμετρο 40-60nm. Το καψίδιό τους είναι εικοσαεδρικό με άγνωστο αριθμό καψομεριδίων. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η επιφάνεια των βιρίων δείχνει λεία. Το ιϊκό γονιδίωμα αποτελείται από ένα μονόκλωνο γραμμικό μόριο RNA θετικής πολικότητας, με μέγεθος 10-12x10³ νουκλεοτιδικών βάσεων². Το 5' άκρο έχει συνήθως μεθυλιωμένο κάλυπτρο. Το 3' άκρο δεν έχει ουρά πολυ-A, εκτός από τα στελέχη του συμπλέγματος των ιών κρωτογενούς εγκεφαλίτιδας. Επιπλέον στο 3' άκρο ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες ελικάση, πολυμεράση και πρωτεάση. Τα βίρια έχουν λιπίδια που βρίσκονται στο έλυτρο και προέρχονται από την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή³. Η αλληλουχία των βάσεων των φλαβοϊών είναι παρόμοια με αυτή των πικόρναϊων. Το γονιδίωμα του ιού περιέχει εντολές για τη σύνθεση της καψιδιακής πρωτεΐνης και τις γλυκοπρωτεΐνες του ιϊκού φακέλου. Επιπλέον το γονιδίωμα κάθε φλαβοϊού περιέχει εντολές για την σύνθεση των 7 μη δομικών πρωτεϊνών NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5⁴.

1.1.1.Γ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Η είσοδος των φλαβοϊών στο κύτταρο γίνεται μέσω πρόσδεσης των γλυκοπρωτεϊνών του ιϊκού φακέλου με ειδικούς υποδοχείς. Το απογυμνωμένο πλέον RNA χρησιμεύει ως mRNA για την σύνθεση όλων των ιϊκών πρωτεϊνών και η αντιγραφή των βιρίων λαμβάνει χώρα στο σύστημα Golgi του κυτταροπλάσματος. Ουσιαστικά ο μηχανισμός σύνθεσης των βιρίων καθώς και ο τρόπος διαφυγής των βιρίων από το κύτταρο δεν έχει κατανοηθεί πλήρως⁵. Οι Φλαβοϊοί πολλαπλασιάζονται στα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα πολλών οργάνων, στο ηπατικό παρέγχυμα, στους αδένες των επινεφριδίων, την καρδιά και τα νεφρά².

1.1.1.Δ ΜΕΤΑΔΩΣΗ

Οι φλαβοϊοί μεταδίδονται μέσω ενδιάμεσων ξενιστών όπως αρθρόποδα, τρωκτικά, νυχτερίδες (Πίνακας 1.1) καθώς και με κατανάλωση γάλακτος μολυσμένου ζώου².

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: Κύριοι τρόποι μετάδοσης φλαβοϊών

Τρόπος μετάδοσης	Ποσοστό φλαβοϊών
Τρωκτικά	20%
Νυχτερίδες	29%
Τσιμπούρια	63%
Κουνούπια	65%
Άλλος/Άγνωστος	1%

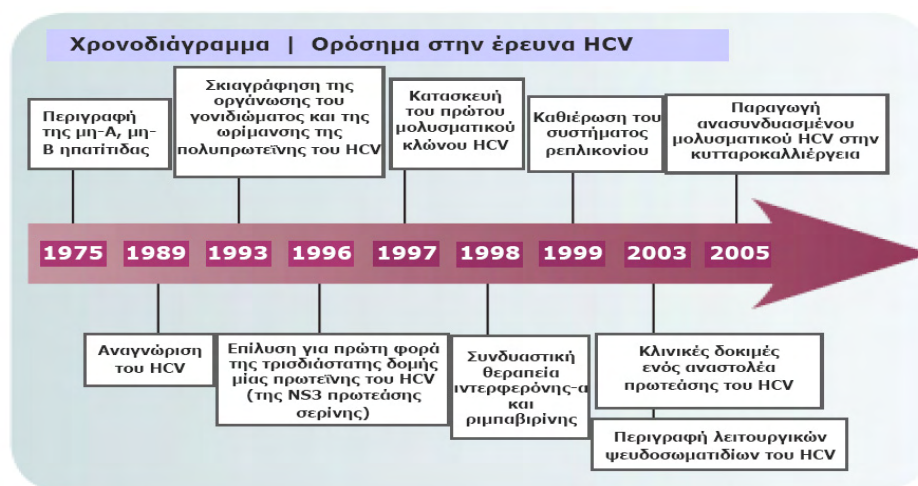
1.1.1.Ε ΠΡΟΛΗΨΗ

Η πρόληψη της προσβολής από φλαβοϊό επιτυγχάνεται με εμβολιασμό, αυστηρούς ελέγχους στα αεροδρόμια, έλεγχο πληθυσμού κουνουπιών και τσιμπουριών, αποφυγή κατανάλωσης γάλακτος προερχόμενου από μολυσμένο ζώο, καθώς και έλεγχο των στάσιμων νερών και του αίματος που προορίζεται για μεταγίσεις⁶.

1.1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ

Η αναζήτηση για τον προσδιορισμό και την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας Γ αποτέλεσε ένα από τα δυσκολότερα επιστημονικά εγχειρήματα των τελευταίων πενήντα χρόνων. Η ανακάλυψη του ιού επιτεύχθηκε αφού πρώτα είχαν έρθει στο φως διάφοροι παράγοντες υπεύθυνοι για τον επιπολασμό της ηπατίτιδας μετά από μετάγγιση αίματος⁷. Κατά τη δεκαετία του 1940 έγινε φανερό ότι η ηπατίτιδα μπορούσε να μεταδωθεί με μετάγγιση αίματος και βρέθηκαν δύο τουλάχιστον μορφές ηπατίτιδας, η “μολυσματική”, ή τύπος Α και η “ορρογενής”, ή τύπος Β⁸.

Περαιτέρω διερεύνηση έδειξε ότι ο ιός της ηπατίτιδας Α μεταδιδόταν μέσω πρόσληψης μολυσμένου φαγητού ή ποτού⁹, ενώ της ηπατίτιδας Β μέσω μετάγγισης αίματος¹⁰. Επιπλέον, ο ιός της ηπατίτιδας Α συσχετίστηκε με οξεία ηπατίτιδα, ενώ της Β και με οξεία και με χρόνια. Για το περιορισμό μετάδοσης ηπατίτιδας μέσω μετάγγισης αίματος, που ανερχόταν σε 20% στις αναπτυσσόμενες χώρες της Δύσης κατά τη δεκαετία του 1960¹¹, καθιερώθηκαν ορολογικοί διαγνωστικοί έλεγχοι των ιών της ηπατίτιδας Α & Β, που αν και περιόρισαν στο μισό περίπου, δεν εξάλειψαν την πιθανότητα μόλυνσης από μετάγγιση αίματος¹²⁻¹⁴. Καθιερώθηκε συνεπώς ο όρος μη-Α, μη-Β ηπατίτιδα (Εικόνα 1.1) για να συμπεριλάβει τον ή τους μολυσματικούς παράγοντες που ευθύνονταν για μετάδοση φλεγμονώδους ηπατικής νόσου από μετάγγιση αίματος^{12,15-16}.



ΕΙΚΟΝΑ 1.1: Χρονοδιάγραμμα της επιστημονικής έρευνας για την ανακάλυψη και τη μελέτη του ιού της ηπατίτιδας Γ

1.1.3 ΜΗ – Α ΜΗ – Β ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ

Τις δεκαετίες του 1970 και του 1980 η διάγνωση ηπατίτιδας μη-Α, μη-Β (ΜΑΜΒΗ) αποτελούσε ακόμη διάγνωση αποκλεισμού. Παράλληλα καταγράφονταν όλες εκείνες οι διαφορές που υπήρχαν μεταξύ της κλινικής εικόνας της ΜΑΜΒΗ σε σχέση με την κλινική εικόνα της ηπατίτιδας Α ή Β (Πίνακας 1.2) χωρίς να αποσαφηνίζεται αν η αιτιολογία της ιογενούς νόσου ήταν ενδημική, σποραδική, ή επιδημική κατόπιν μεταγίσεως¹⁷.

Παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, χαρακτηριστικοί σωληνωτοί σχηματισμοί μεγέθους 150-300nm στο κυτταρόπλασμα ηπατοκυττάρων χιμπατζή μολυσμένων με ορρό ασθενούς θετικού για τον επιπολασμό νόσου ΜΑΜΒΗ¹⁸. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι ο παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει ΜΑΜΒΗ είναι ιός που φέρει λιπιδικό περίβλημα, καθώς η επεξεργασία δειγμάτων που ήταν ικανά να μεταδώσουν την ασθένεια στο χιμπατζή με διάφορες οργανικές ουσίες, όπως το χλωροφόρμιο, εξουδετέρωναν τον μολυσματικό παράγοντα¹⁹⁻²⁰. Το 1984, δύο ομάδες επιστημόνων δημοσίευσαν ότι ο παράγοντας της ΜΑΜΒΗ ίσως είναι ένας ρετροϊός²¹⁻²². Οι παραπάνω έρευνες στηρίχτηκαν στο γεγονός ότι ο ορρός ασθενών θετικών για την παρουσία ΜΑΜΒΗ, ήταν συνεχώς θετικός για την ενεργότητα του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (RT). Κατά την πορεία των μελετών ομο-ρετροϊκά σωματίδια απομονώθηκαν από ηπατικές κυτταροσειρές χιμπατζή επιμολυσμένες με ορρό ΜΑΜΒΗ. Επίσης, υγιείς χιμπατζήδες μολύνθηκαν με ορρό ασθενούς θετικό για ΜΑΜΒΗ, με αποτέλεσμα να εμφανίσουν την ίδια νόσο. Τις παραπάνω μελέτες επιβεβαίωσε η παρουσία, ομο-ρετροϊκών σωματιδίων στο κυτταρόπλασμα ηπατοκυττάρων ασθενών που είχαν προσβληθεί με οξεία ή χρόνια ΜΑΜΒΗ, έπειτα από μετάγγιση αίματος²³. Επιπλέον, μελέτες σε ορρούς ασθενών και χιμπατζήδων μολυσμένων με ιό ΜΑΜΒΗ έδειξαν ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας παρέμενε μολυσματικός, αν και είχε διηθηθεί από φίλτρα πόρων 80nm, φαινόμενο που ενισχύει την άποψη ότι επρόκειτο για μικρό σφαιρικό ιό²⁴.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: Σύγκριση μολύνσεων με ηπατίτιδα Α, Β και ΜΑΜΒΗ

Χαρακτηρισμός	Ηπατίτιδα Α	Ηπατίτιδα Β	ΜΑΜΒΗ
<i>Παρουσίαση</i>			
Μέση περίοδος επώασης (εύρος) {ημέρες}	~25(15-50)	~70(50-180)	~50(15-180)

Έναρξη	Οξεία	Συνήθως χρόνια	Συνήθως χρόνια
Προσβαλλόμενες ηλικίες	Παιδιά και έφηβοι	Όλες οι ηλικίες	Όλες οι ηλικίες
<u>Κλινικά συμπτώματα</u>			
Αθροαλγίες	Ασύνηθες	Σύνηθες	Ασύνηθες
Ναυτία και έμετος	Σύνηθες	Σύνηθες	Σύνηθες
Πυρετός	Σύνηθες	Ασύνηθες	Ασύνηθες
Ίκτερος	Ασύνηθες	Σύνηθες	Ασύνηθες
<u>Κλινικές Τιμές</u>			
Αύξηση αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης	Παροδική	Παρατεταμένη	Παρατεταμένη
Διάρκεια αύξησης της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης	1-3 εβδομάδες	1-8 ή και περισσότερες εβδομάδες	1-8 ή και περισσότερες εβδομάδες
Αντισώματα έναντι ηπατίτιδας Α	Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό
Αντιγόνα ηπατίτιδας Β	Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό
<u>Συσχέτιση Ασθενειών</u>			
Οξεία ηπατίτιδα	Ναι	Ναι	Ναι
Χρόνια ηπατίτιδα	Όχι	Ναι	Ναι
Κίρρωση	Όχι	Ναι	Ναι
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	Όχι	Ναι	Ναι
<u>Μετάδοση</u>			
Διαδερμική	Σπάνια	Συνήθης	Συνήθης
Στοματική	Συνήθης	Σπάνια	Άγνωστη
Ιός στα κόπρανα	Θετική	Αρνητική	Αρνητική
Αφροδισιακή	Σπάνια	Συνήθης	Σπάνια
Περιγεννητική	Αρνητική	Συνήθης	Σπάνια

1.1.4 Η ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ

Το 1989 ομάδα ερευνητών της εταιρίας Chiron περιέγραψε ένα μοριακό κλώνο που παρασκευάστηκε από χιμπατζή, ο οποίος είχε μολυνθεί από παράγοντα που προκαλούσε MAMBH²⁵. Πλάσμα με υψηλή συγκέντρωση στον παράγοντα που προκαλούσε MAMBH φυγοκεντρήθηκε για να συγκεντρωθεί ο πιθανός ιός ως ίζημα. Στη συνέχεια απομονώθηκε γενετικό υλικό από το ίζημα, που μετουσιώθηκε και υποβλήθηκε σε σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA με τυχαίους εκκινητές και το προϊόν κλωνοποιήθηκε σε όχημα έκφρασης λάμδα gt11. Σε αυτό το όχημα τα πρωτεϊνικά κομμάτια που κωδικοποιούνταν από το γονιδίωμα του παράγοντα MAMBH εκφράζονταν συνδεδεμένα με τη πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν με ορρό ασθενούς που έπασχε από MAMBH και ανιχνεύτηκε ένας επίτοπος 155 νουκλεοτιδικών βάσεων που δεν υβριδιζόταν με αντίστοιχο DNA από άνθρωπο ή χιμπατζή που έπασχε από την νόσο. Το παραπάνω αποτέλεσμα ενίσχυσε και υποστήριξε τις προηγούμενες μελέτες που υποδείκνυαν ότι ο παράγοντας που προκαλούσε νόσο MAMBH δεν περιείχε DNA. Αντίθετα ο συγκεκριμένος επίτοπος και ένας κλώνος μεγέθους 353 νουκλεοτιδικών βάσεων υβριδίστηκε με RNA που είχε απομονωθεί από ήπαρ και ορρό χιμπατζή με πάθηση MAMBH. Παρόμοιος υβριδισμός δεν παρατηρήθηκε σε υγιή ζώα, δείχνοντας ότι το γενετικό υλικό του παράγοντα MAMBH ήταν RNA.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου παράγοντα έδειξε ότι το μέγεθός του ήταν 9600 νουκλεοτιδικές βάσεις περίπου, είχε θετική πολικότητα και η οργάνωση του γονιδιώματός του ήταν παρόμοια με εκείνη των φλαβοϊών²⁶⁻²⁷. Ο παράγοντας ονομάστηκε ιός ηπατίτιδας Γ και η ανακάλυψή του ήταν επιστέγασμα επίπονων εργαστηριακών δοκιμών σε χιμπατζήδες^{25,28}.

Η δυσκολία αναγνώρισης και ανακάλυψης του ιού οφειλόταν στους χαμηλούς τίτλους του ιού στο αίμα, στη γενετική του ετερογένεια και στη φυσική πορεία μόλυνσης και επιπολλασμού του, που είναι συχνά ασυμπτωματική στα πρώτα έτη της χρόνιας λοίμωξης²⁹.

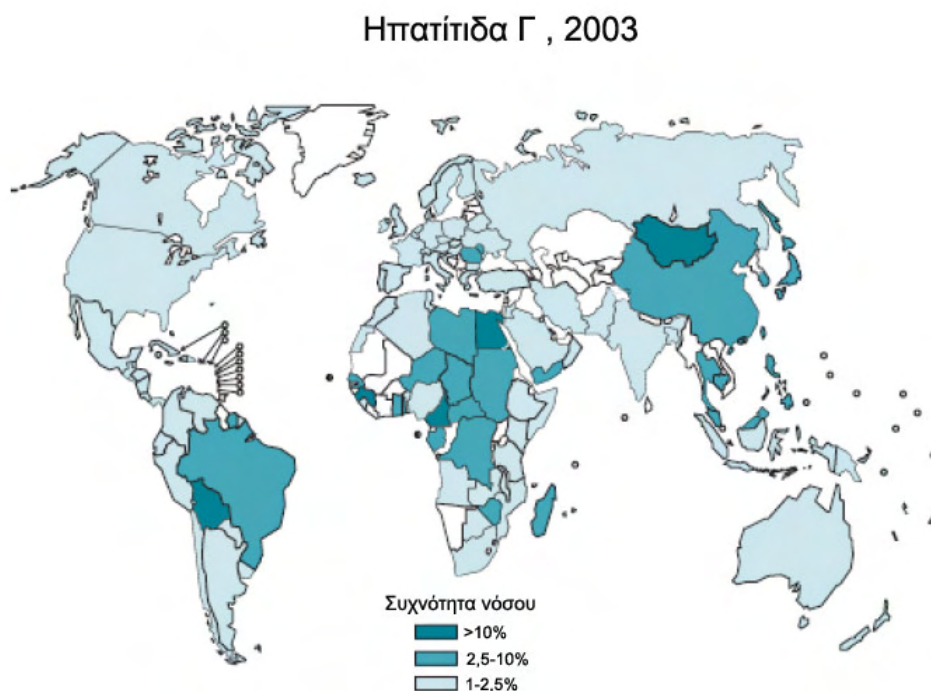
1.1.5 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Με την ανακάλυψη του ιού της ηπατίτιδας Γ και την παραγωγή ειδικών ορολογικών αναλύσεων για διάγνωση, έγινε φανερό ότι ο ιός της ηπατίτιδας Γ ήταν το κύριο αίτιο της αιμογενούς και σποραδικής MAMBH³⁰⁻³³. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των διαγνωστικών αναλύσεων πρώτης γενιάς αποτύγχαναν να διαγνώσουν το 10-20% των οροθετικών λοιμώξεων. Επιπροσθέτως, τα ίδια διαγνωστικά παρουσίαζαν ποσοστό 8-10% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Πλέον των ανωτέρων περιορισμών, εκτιμήθηκε αρχικά ότι το 0,5-1,5% του

συνολικού πληθυσμού ήταν θετικοί για τον ιό της ηπατίτιδας Γ³⁴. Θετικοί ασθενείς έναντι του ιού της ηπατίτιδας Γ ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 0,2-0,8% σε δωρητές αίματος σε χώρες της Βορείου Ευρώπης³⁵⁻³⁶, σε ποσοστό 0,5-1,5% δωρητών της Νοτίου Ευρώπης³⁷⁻⁴⁰ και σε 1-1,5% δωρητών της Ιαπωνίας⁴¹. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το ποσοστό στους δωρητές αίματος ήταν χαμηλό, μόλις της τάξης της μισής ποσοστιαίας μονάδας, αλλά δραματικά υψηλό στους επί πληρωμή δωρητές, όπου άγγιζε το 10%⁴².

Σήμερα χάρη στις ειδικές ορολογικές αναλύσεις τρίτης γενιάς υπολογίζεται ότι πάνω από 170 εκατομμύρια άνθρωποι (3% του παγκόσμιου πληθυσμού) είναι προσβεβλημένοι με τον ιό της ηπατίτιδας Γ, ενώ 3 με 4 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνονται ετησίως⁴³. Για την επιδημιολογική μελέτη της ηπατίτιδας Γ χρησιμοποιείται σαν δείκτης επιπολασμού της λοίμωξης η παρουσία αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας Γ στον ορρό του ατόμου. Στη δεκαετία του 1990 σε διάγνωση υποβάλλονταν ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως νεφροπαθείς, τοξικομανείς ή πολυμεταγγιζόμενα άτομα που εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά επιπολασμού⁴³.

Στοιχεία της παγκόσμιας οργάνωσης υγείας δείχνουν ότι η συχνότητα της λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Γ είναι υψηλότερη σε χώρες της Αφρικής και του Δυτικού Ειρηνικού. Μεγαλύτερη συχνότητα μολύνσεων με χαρακτηριστικά επιδημίας έχουν καταγραφεί στην Αίγυπτο (έως και 28% σε μερικές περιοχές της χώρας)⁴⁴. Η Εικόνα 1.2 απεικονίζει την παγκόσμια κατανομή του ιού της ηπατίτιδας Γ που κατέγραψε το Κέντρο Έλεγχου Λοιμώξεων και Πρόληψης των Η.Π.Α. το 2003.



ΕΙΚΟΝΑ 1.2: Παγκόσμια κατανομή νοσηρότητας με ιό ηπατίτιδας Γ.

1.1.6 ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός της ηπατίτιδας Γ μεταδίδεται κυρίως με έκθεση σε μολυσμένο αίμα ή παράγωγά του (πλάσμα, παράγοντες πήξης κ.λπ.)⁴⁵. Όπως, αναφέρθηκε μεγάλο ποσοστό δωρητών αίματος και μεταγγιζόμενων δεκτών, μολύνθηκαν με τον ιό της ηπατίτιδας Γ πριν την ανακάλυψή του. Σήμερα το ποσοστό αυτό έχει μειωθεί σε 10% του αρχικού, χάρη στους διαγνωστικούς ελέγχους τρίτης γενιάς. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, ο κυριότερος παράγοντας πρόκλησης ηπατίτιδας Γ είναι η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών (60%), μεταξύ εξαρτημένων χρηστών ναρκωτικών, κυρίως ηρωίνης. Η σεξουαλική μετάδοση του ιού της ηπατίτιδας Γ έχει σχετικά χαμηλή συχνότητα (15%), που οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα του ιού στα αντίστοιχα σωματικά υγρά αλλά και στην έλλειψη δεκτικών κυττάρων στην περιοχή αυτή⁴⁶⁻⁴⁷.

Ένα μικρό ποσοστό (4%) του ιατρικού προσωπικού μολύνεται ετησίως με τον ιό. Αντιθέτως, σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, όπου δεν ελέγχονται με διαγνωστικά μέσα οι μεταγγίσεις αίματος ή παραγώγων αίματος, το ποσοστό είναι αρκετά υψηλό σε σχέση με τις αναπτυσσόμενες χώρες της Δύσης. Επιπλέον, η χρήση μη αποστειρωμένων εργαλείων στη χάραξη του δέρματος και την περιτομή είναι παρακινδυνευμένη⁴⁸⁻⁵⁰.

Το Κέντρο Έλεγχου Λοιμώξεων και Πρόληψης (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) διενεργεί επιδημιολογικό έλεγχο ποσοστών και συχνότητας της λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας Γ σε ετήσια βάση (Εικόνα 1.3) .



ΕΙΚΟΝΑ 1.3: Τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Γ.

Κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο είναι σπάνια αλλά έχει περιγραφεί⁵¹⁻⁵⁴. Επίσης, ασθενείς που πάσχουν από τον ιό της επίκτητης ανοσοεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus) είναι πιο επιρρεπείς σε μόλυνση με ιό ηπατίτιδας Γ⁵⁵. Παρακάτω αναφέρονται όλοι οι πιθανοί τρόποι μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Γ (Πίνακας 1.3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3: Παράγοντες κινδύνου μετάδοσης του ιού της ηπατίτιδας Γ

<u>Κίνδυνος Μετάδοσης</u>	Παράγοντες
Υψηλός	<p>Πολλαπλές μεταγγίσεις ολικού αίματος (πριν τον Ιούλιο του 1992), ή κλάσματα αίματος (όπως ανοσοσφαιρίνες ή παράγοντες πήξεως του αίματος, πριν το 1987), ειδικά από δωρητές αίματος επί πληρωμή για τη θεραπεία αιμορροφιλίας και θαλασσαιμίας.</p> <p>Ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών (χρήση κοινών μολυσμένων βελονών), ενδορρινική χρήση κοκαΐνης (άγνωστο)</p>
Μέτριος	<p>Πολυετής αιμοκάθαρση (χρήση κοινών μηχανημάτων και/ή μόλυνση των υλικών και παρασκευασμάτων κατά την διαδικασία). Πολλαπλοί σεξουαλικοί σύντροφοι: ετεροφυλοφιλικές ή ομοφυλοφιλικές σχέσεις και ο κίνδυνος αυξάνει, με τον αριθμό των συντρόφων.</p> <p>Ιατρικό ιστορικό μεταδιδόμενων αφροδισιακών νοσημάτων.</p> <p>Κάθετη μητρική μετάδοση στο βρέφος πριν ή μετά τη γέννηση.</p> <p>Μεταμόσχευση μολυσμένων οργάνων σε μη μολυσμένους δέκτες.</p> <p>Εκστρατείες εμβολιασμών σε χώρες, όπου το ιατρικό προσωπικό ξαναχρησιμοποιεί την ίδια σύριγγα στον ακόλουθο εμβολιασμό.</p>
Χαμηλός	<p>Σεξουαλική μετάδοση σε μονογαμικές σχέσεις (καταγεγραμμένο αλλά σπάνιο).</p> <p>Τατουάζ (χρήση μολυσμένων οργάνων, ενδημεί κυρίως σε διάφορες νομαδικές φυλές Αφρικής και Ασίας, όπου γίνεται συνεχώς για θρησκευτικά, ή τοπολατρικά έθιμα).</p> <p>Βελονισμός (χρήση μολυσμένων οργάνων, πάλι συναντάται συχνά σε διάφορες νομαδικές φυλές Αφρικής και Ασίας, όπου γίνεται συνεχώς για θρησκευτικά, ή τοπολατρικά έθιμα).</p> <p>Μόλυνση με HIV (επιμολυσμένοι με τον ιό του AIDS διαθέτουν ενισχυμένη παθογένεση του HCV στο ήπαρ).</p> <p>Άλλες ενδοσκοπομειακές μολύνσεις (όπως κατά τη διάρκεια χειρουργείου, χρήση μολυσμένων γαντιών, μολυσμένες σύριγγες κατά την εφαρμογή ενδοφλέβιου καθετήρα)</p> <p>Οδοντικές επεξεργασίες (μολυσμένα γάντια ή όργανα)</p> <p>Ενδοοικογενειακή μετάδοση (κοινές οδοντόβουρτσες, κοινά λεπίδια).</p>
Ελάχιστος	Ιατρικές βελόνες (προσωπικό σε ιατρικά κέντρα)

1.1.7 ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Επιπολασμός του ιού της ηπατίτιδας Γ γίνεται κατεξοχήν στο ήπαρ, όπου ο ιός εντοπίζεται σε ποσοστά έως και 75%. Επίσης, διάφορες γονιδιωματικές αλληλουχίες του ιού έχουν ανιχνευθεί σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, σε μονοκύτταρα/μακροφάγα, σε λεμφοκύτταρα, σε χοληφόρα επιθηλιακά κύτταρα, στο στοματικό βλεννογόνο, καθώς και σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) ασθενών με χρόνια λοίμωξη⁵⁶.

Επιπλέον, επισημάνθηκε μόλυνση και πιθανή αντιγραφή ιϊκού γονιδιώματος σε διαφοροποιημένα και μη δενδριτικά κύτταρα, καθώς και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών, που υπέφεραν από χρόνια λοίμωξη ηπατίτιδας Γ. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, το ήπαρ είναι το κύριο όργανο-στόχος του ιού της ηπατίτιδας Γ, αλλά και ότι ο ιός είναι ικανός να μολύνει σε μικρότερο βαθμό και άλλους ιστούς όπως το πάγκρεας, τον σπλήνα, το θυρεοειδή, τα επινεφρίδια, το μυελό των οστών, το κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και ομάδες κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος⁵⁷.

1.1.8 ΦΥΣΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Στους περισσότερους ασθενείς με οξεία λοίμωξη, ο ιός ανιχνεύεται μία με δύο εβδομάδες μετά από μόλυνση⁵⁸⁻⁵⁹. Σε αυτές τις περιπτώσεις το ιϊκό RNA ανιχνεύεται μετά από κατεργασία με συνδυασμό ανάστροφης μεταγραφάσης και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Αν και όλοι οι μολυσμένοι ασθενείς εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT), που υποδηλώνει οξεία ηπατοκυτταρική βλάβη, επτά εβδομάδες μετά την έκθεση στον ιό, μόλις 30% εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα, ενώ οι υπόλοιποι είναι ασυμπτωματικοί⁶⁰⁻⁶¹.

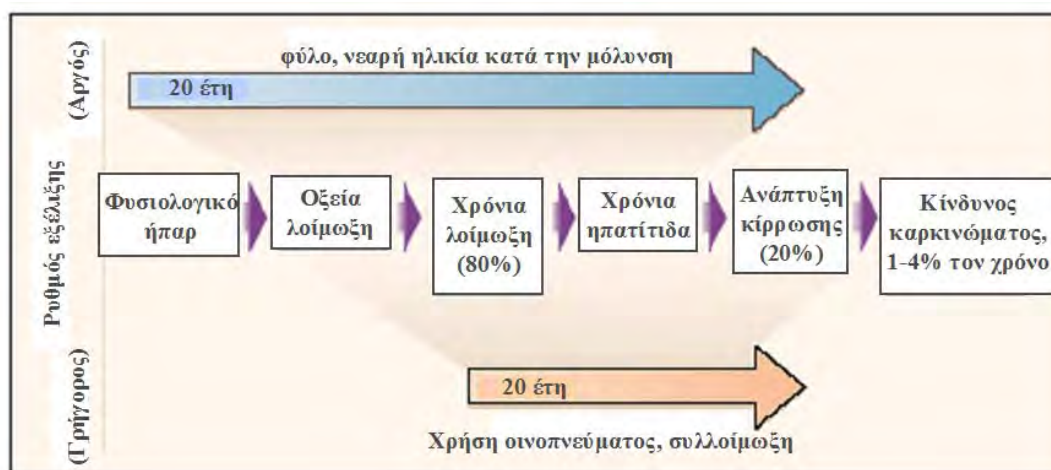
Ανάρρωση ασθενών με οξεία ηπατίτιδα Γ πραγματοποιείται από την δεύτερη κιόλας εβδομάδα έως και την δωδέκατη και σηματοδοτείται από: 1) απουσία ιϊκού RNA από την κυκλοφορία, 2) επιστροφή της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης στα κανονικά επίπεδα, 3) απουσία όλων των συμπτωμάτων που συνδέονται με ηπατοκυτταρική βλάβη. Δυστυχώς, η "κάθαρση" οξείας ηπατίτιδας Γ συμβαίνει σε 15% μόνο των ασθενών⁶².

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4: Παράγοντες ξενιστή που διευκολύνουν ανάπτυξη κίρρωσης από ιό ηπατίτιδας Γ.

- Κάθετη μετάδοση του ιού ηπατίτιδας Γ από τη μητέρα στο έμβρυο
- Χρόνιος αλκοολισμός (>50γρ./ημερα)
- Άρρεν φύλλο
- Ηλικία (>50 ετών όταν το άτομο προσβάλλεται από τον ιό)
- Έλλειψη ειδικών HL-A απλότυπων
- Διαβήτης
- Αιμορροφιλία
- Συνεπιμόλυνση είτε τον ιό της ηπατίτιδας Β, είτε με τον ιό του AIDS

Στους υπόλοιπους ασθενείς, τα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, και ιϊκού RNA στην κυκλοφορία παραμένουν υψηλά^{30,59,63} (ΕΙΚΟΝΑ 1.5). Ωστόσο, η εμμένουσα ιαιμία πλεονεκτεί διαγνωστικά της μέτρηση επιπέδων αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης για επιπολασμό του ιού σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα Γ. Συμπτώματα οξείας ηπατίτιδας Γ εμφανίζουν συμπτωματικοί ασθενείς, αλλά η ηπατοκυτταρική βλάβη εξελίσσεται και γίνεται πιο σοβαρή με την πάροδο των ετών⁶⁴. Οι περισσότεροι ασθενείς παραμένουν συμπτωματικοί για 10-30 χρόνια, αν και εμφανίζουν σταθερά υψηλά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, καθώς και ήπια ή σοβαρή χρόνια ηπατική βλάβη^{62,65}.

Επιπλέον θα πρέπει να σημειωθεί ότι το 1/3 των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Γ πάσχουν από εμμένουσα ιαιμία αν και έχουν κανονικά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, ενώ άλλοι ασθενείς έχουν υψηλά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης^{66,67}. Μεταξύ των συμπτωματικών χρονίως πασχόντων με αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης το 35% θα αναπτύξει κίρρωση (ΕΙΚΟΝΑ 1.4), ενώ το ένα τέταρτο των ιδίων ασθενών θα παρουσιάσει ηπατοκυτταρικό καρκίνο την τρίτη δεκαετία έκθεσης στον ιό^{65,68-69}. Ηπατική κίρρωση αναπτύσσει 10-20% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα Γ σε χρονική 20-30 έτη, ενώ ηπατοκυτταρικό καρκίνο 1-5% των κίρρωτικών ασθενών ετησίως^{70,71}.



ΕΙΚΟΝΑ 1.4: Η φυσική πορεία λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Γ

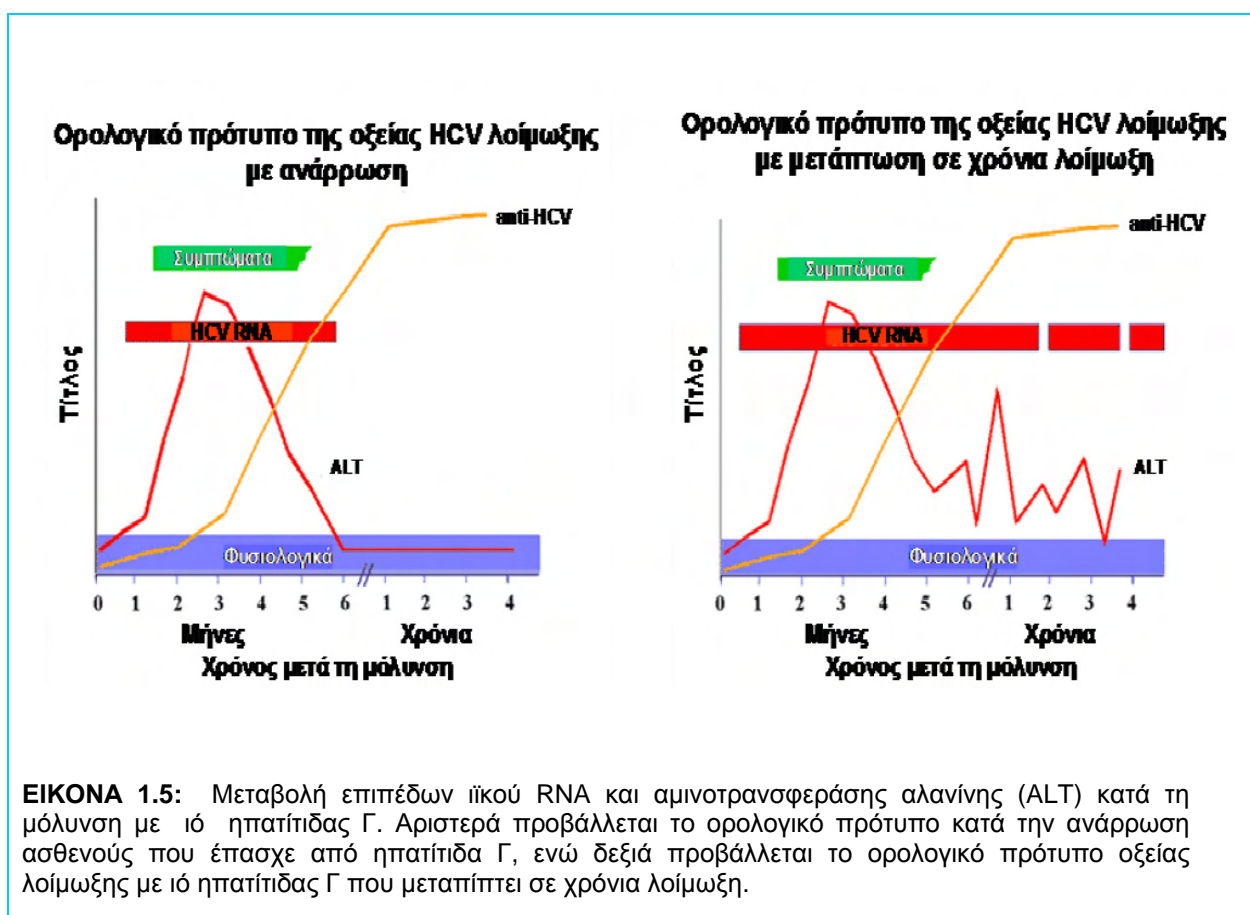
Παράγοντες που προβλέπουν τη σοβαρότητα της χρόνιας ηπατικής βλάβης έχουν προσφάτως εδραιωθεί, με την ασθένεια του ήπατος να είναι πιο σοβαρή σε άρρενες ασθενείς άνω των 40 ετών και σε αλκοολικούς που έχουν προσβληθεί από τον ιό⁷². Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από επιδημιολογικές μελέτες, όπου αναφέρεται ότι δόση αλκοόλ >10 γραμ. ημερησίως οδηγεί σε ηπατική βλάβη και ηπατοκυτταρικό καρκίνο⁷³. Επιπλέον, καταγράφηκαν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ανθρώπων και χιμπατζήδων μολυσμένων με ιό ηπατίτιδας Γ (Πίνακας 1.5)⁷⁴.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.5: Κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ανθρώπων και χιμπατζήδων μολυσμένων με τον ιό ηπατίτιδας Γ⁷⁴.

<u>Όψη της λοίμωξης</u>	<u>Κοινά Χαρακτηριστικά</u>
Οξεία λοίμωξη	<p>Νεκροφλεγμονώδης δράση στο ήπαρ.</p> <p>Αυξημένα επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης.</p> <p>Αλλοιώσεις στις λεπτές δομές των ηπατοκυττάρων (πολλαπλασιασμός του ενδοπλασματικού δικτύου).</p> <p>Εστιακός εκφυλισμός των ηπατοκυττάρων</p> <p>Αλλοιώσεις των χοληφόρων πόρων</p> <p>Φλεγμονή στην πυλαία οδό</p> <p>Ηπατική φλεγμονή και βλάβη πριν την αύξηση της αμινοτρανσφεράσης της</p>

	αλανίνης.
Χρόνια λοίμωξη	<p>Η ηπατίτιδα στο χιμπατζή είναι παρόμοια με την χρόνια εμμένουσα ηπατίτιδα στον άνθρωπο, με πολλαπλασιασμό των κολποειδών κυττάρων, εστιακή νέκρωση και φλεγμονή της πυλαίας οδού.</p> <p>Η συχνότητα της εμμένουσας μόλυνσης ανέρχεται στο 70% των ανθρώπων και χιμπατζήδων που πάσχουν από οξεία ηπατίτιδα Γ.</p>
Επιπολασμός του ιού και της γονιδιακής του έκφρασης	<p>Ο αναδιπλασιασμός του ιού προηγείται της έναρξης της οξείας ηπατίτιδας αρκετές εβδομάδες πριν.</p> <p>Ανοσοστοχημική ανίχνευση ιικών αντιγόνων στον ήπαρ κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης.</p> <p>Μείωση της ιαιμίας κατά την έναρξη της αύξησης των επιπέδων της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης.</p> <p>Ο τίτλος του ιού ποικίλλει, σε πολλές δε περιπτώσεις πάνω από 4-6 λογαριθμικές μονάδες.</p> <p>Ο ρυθμός μετάλλαξης του ιού της ηπατίτιδας Γ κυμαίνεται μεταξύ $1,44 \times 10^{-3}$ με $1,92 \times 10^{-3}$ υποκατάσταση νουκλεοτιδικών βάσεων/συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος/έτος</p>
Ανοσοαπόκριση έναντι του ιού	<p>Εδραίωση εμμένουσας λοίμωξης παρά την εμφάνιση αντισωμάτων έναντι στις πιο πολλές ιικές πρωτεΐνες.</p> <p>Αντισώματα φακέλου που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης εξουδετερώνουν μερικώς.</p> <p>Και τα δυο είδη οργανισμών είναι επιρρεπή στην αναμόλυνση, ή υπερμόλυνση ακόμη και με ένα ομόλογο στέλεχος του ιού της ηπατίτιδας Γ, επισημαίνοντας την αδύναμη ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι στην εισβολή και τον επιπολασμό του ιού.</p> <p>Δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του αναδιπλασιασμού του ιού και της αύξησης της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης.</p> <p>Η συγκέντρωση του ιού στο αίμα αυξάνεται κατά την θεραπεία με κυτταροτοξικά και ανασοκατασταλτικά φάρμακα.</p>

Τέλος, το μεγαλύτερο ποσοστό (>85%) των μολυσμένων ατόμων με ιό ηπατίτιδας Γ αδυνατούν να καταπολεμήσουν και στη συνέχεια να εξαλείψουν τον ιό, λόγω της ικανότητας του ιού να διαφεύγει την ανοσολογική απόκριση. Αυτή η ικανότητα διαφυγής του ιού επιτυγχάνεται μέσω παθητικής διέγερσης των μηχανισμών εγγενούς ανοσίας του ξενιστή, που ενώ εκκρίνει ιντερφερόνη, αυτή δεν δρα στο κύτταρο στόχο και ο ιός μεταλλάσσεται ταχύτατα σε βαθμό που δεν αναγνωρίζεται από τα Β και Τ λεμφοκύτταρα⁷⁵



1.1.9 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ ΙΟΥ

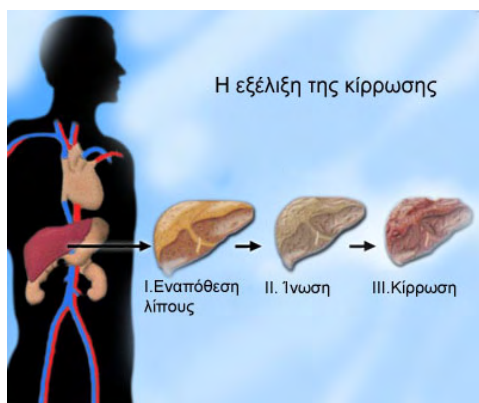
Η χρόνια φάση της λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Γ είναι ασυμπτωματική για μεγάλο χρονικό διάστημα και εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια επιπέδων ιαίμιας μεταξύ των ασθενών. Η κλινική εικόνα της χρόνιας λοίμωξης ποικίλλει αρκετά, εμφανίζοντας έντονη διαφοροποίηση στο ρυθμό εξέλιξης της ηπατοκυτταρικής βλάβης και ιστο-βιοχημική ετερογένεια μεταξύ των ασθενών.

Η κλινική εικόνα της οξείας ηπατίτιδας είναι παρόμοια σε ασθενείς μολυσμένους είτε με ιό ηπατίτιδας Α, ή Β, ή Γ. Ωστόσο, η οξεία λοίμωξη από ιό ηπατίτιδας Γ τείνει να είναι πιο ήπια σε σχέση με εκείνη που προκαλεί ο ιός ηπατίτιδας Β. Πράγματι, το 70-95% των πασχόντων με ηπατίτιδα Γ δεν ανακαλούν κάποιο επεισόδιο οξείας ηπατίτιδας, γεγονός που καταδεικνύει κοινή υποκλινική πορεία της λοίμωξης^{76,77}. Ο μέσος χρόνος επώασης του ιού της ηπατίτιδας Γ είναι μεταξύ εκείνου του ιού της ηπατίτιδας Α και του ιού της ηπατίτιδας Β. Τα συμπτωματικά επεισόδια οξείας λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Γ δεν διαφέρουν από εκείνα που προκαλούν οι ιοί ηπατίτιδας Α ή Β⁷⁸.

Τα συμπτώματα οξείας λοίμωξης με ιό ηπατίτιδας Γ διαφέρουν σε εξέλιξη, σφοδρότητα και διάρκεια που μπορεί να εκτείνεται από 2 έως 12 εβδομάδες. Συχνά είναι αδιαθεσία, ναυτία και πόνος στο άνω δεξί τεταρτημόριο, συνοδευόμενος από ίκτερο και σκουρόχρωμα ούρα. Επίσης, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν ανορεξία⁶². Τα παραπάνω συμπτώματα συμβαίνουν μερικές εβδομάδες μετά την εμφάνιση RNA ηπατίτιδας Γ στην κυκλοφορία και συμπιπτουν χρονικά με την αύξηση των τρανσαμινασών⁷⁹.

Συνήθη ιστολογική εικόνα της χρόνιας ηπατίτιδας αποτελούν η ίνωση και η γεφυρική νέκρωση, καθώς και οι λεμφοκυτταρικές αθροίσεις στα πυλαία διαστήματα και η μεγαλοφουσαλιδώδης λίπωση. Το 20% των πασχόντων από χρόνια λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Γ αναπτύσσει ηπατική κίρρωση 10-20 χρόνια περίπου μετά την έναρξη της μόλυνσης (ΕΙΚΟΝΑ 1.6), ενώ ένα μικρό ποσοστό των κίρρωτικών ασθενών θα αναπτύξει ηπατοκυτταρικό καρκίνο 30 περίπου έτη μετά την αρχική μόλυνση⁸⁰⁻⁸².

Έρευνες έδειξαν ότι ο ιός της ηπατίτιδας Γ εμπλέκεται σε μη-ηπατικές αυτοάνοσες παθήσεις όπως μεικτή κρουοσφαιριναιμία, λεμφο-υπερπλασία και λεμφώματα μη Hodgkins Β (NHL)⁸³. Η παθογένεια του ιού έχει επίσης συνδεθεί με διάφορες αιματολογικές διαταραχές, όπως απλαστική αναιμία και ιδιοπαθής θρομβοπενία. Αρκετές σοβαρές περιπτώσεις χρόνιας ιϊκής λοίμωξης συνδέονται με σπειραματονεφρίτιδα και με επιπλοκές του νευρικού συστήματος, πιθανόν σαν απόρροια εκτεταμένης ηπατικής νέκρωσης⁸⁴. Αυτοάνοσα θυρεοειδικά σύνδρομα, όπως υποθυρεοειδισμός και νόσος Hashimoto, καθώς και θυρεοειδικές διαταραχές όπως υπερθυρεοειδισμός έχουν συσχετιστεί με ιϊκή μόλυνση. Επιπλέον, διάφορες δερματικές διαταραχές, όπως κνίδωση, οζώδες ερύθημα και ομαλός λειχήνας, λεμφοκυτταρική σιελοαδενίτιδα και δερματική πορφυρία εμφανίζονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε χρόνια λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Γ σε αρκετά μεγάλο ποσοστό πασχόντων^{85,86}. Τέλος, μικρό ποσοστό (5-7%) κίρρωτικών ασθενών μολυσμένων με ιό ηπατίτιδας Γ πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη⁸⁴.



ΕΙΚΟΝΑ 1.6: Πανω, απεικόνιση της εξέλιξης της ηπατικής κίρρωσης. Κάτω, κλινική εικόνα κίρρωσης του ήπατος.



1.1.10 ΉΠΑΡ- Ο ΞΕΝΙΣΤΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Όπως είδαμε και παραπάνω ο ιός της ηπατίτιδας Γ μολύνει άνω του 75% των ηπατοκυττάρων. Το ήπαρ είναι ζωτικής σημασίας όργανο των σπονδυλωτών και στον άνθρωπο είναι δεύτερο σε μέγεθος και πρώτο σε βάρος (1.400-1.600kg) όργανο. Διεκπεραιώνει πλήθος λειτουργιών όπως αποτοξίνωση, πρωτεϊνοσύνθεση, αποθήκευση γλυκογόνου, αποσύνθεση ερυθρών αιμοσφαιρίων, σύνθεση πρωτεϊνών πλάσματος, παραγωγή ορμονών και βιοχημικών συστατικών απαραίτητων στην πέψη. Παράγει χολή, μια αλκαλική ένωση που βοηθά στην πέψη, μέσω γαλακτωματοποίησης λιπιδίων. Επίσης εκτελεί και ρυθμίζει μεγάλο όγκο βιοχημικών αντιδράσεων υψηλής ιστοξειδίκευσης, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης και διάσπασης μικρών και σύνθετων μορίων, πολλά από τα οποία είναι απαραίτητα για τη ζωή. Το ήπαρ καταναλώνει 12% της συνολικής περιεκτικότητας του αίματος σε οξυγόνο για μεταβολισμό υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών και η θερμοκρασία του αίματος στις φλέβες του φτάνει

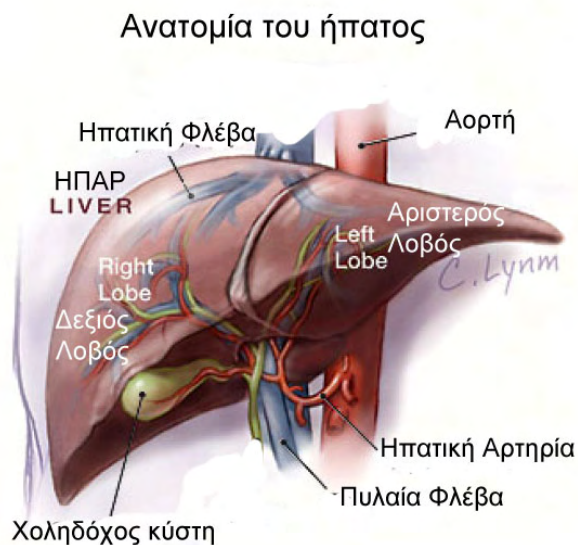
τους 40°C. Το ήπαρ είναι απαραίτητο για την επιβίωση και στις μέρες μας δεν υπάρχει κανένας τρόπος να αντισταθμιστεί η απουσία της λειτουργίας του⁹¹⁻⁹⁴.

1.1.10. Α. Δομική επισκόπηση του ήπατος

Το ήπαρ εντοπίζεται στο δεξί άνω τεταρτημόριο της κοιλιακής κοιλότητας, ακριβώς κάτω από τον δεξί θόλο του διαφράγματος, δεξιά από το στομάχι, επικαλύπτει την χοληδόχο κύστη και συνδέεται με δύο μεγάλα αιμοφόρα αγγεία, την ηπατική αρτηρία και την πυλαία φλέβα. Επίσης περιβάλλεται από κάψα συνδετικού ιστού, την κάψα του Glisson⁹¹.

Στο ήπαρ διακρίνουμε δύο επιφάνειες, την άνω ή διαφραγματική και την κάτω ή σπλαγγχνική. Το πρόσθιο χείλος του ήπατος φέρεται προς τα έξω, κατά μήκος του πλευρικού τόξου, ενώ από τη θέση όπου χιάζονται η μεσοκλειδική γραμμή με την 8η πλευρά, το πρόσθιο χείλος φέρεται λοξά προς τα αριστερά μέχρι την 7η αριστερή πλευρά^{91,93}.

Το σχήμα του είναι τριγωνικό (ΕΙΚΟΝΑ 1.7), η υφή του μαλακή και το χρώμα του καφεκόκκινο. Αποτελείται από τέσσερεις λοβούς, άνισου μεγέθους και σχήματος⁹¹.



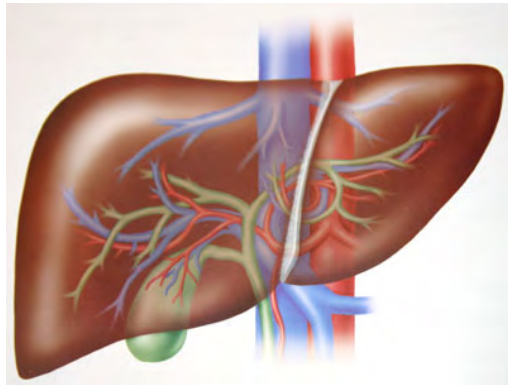
ΕΙΚΟΝΑ 1.7: Το τριγωνικό σχήμα του ήπατος.

1.1.10. Β. Αιμάτωση του ήπατος

Το ήπαρ δέχεται διπλό εφοδιασμό σε αίμα από την ηπατική πυλαία φλέβα και τις ηπατικές αρτηρίες (ΕΙΚΟΝΑ 1.8). Η ηπατική πυλαία φλέβα φέρει φλεβικό αίμα από τον σπλήνα, την γαστροεντερική οδό και τα σχετικά της όργανα και εφοδιάζει το ήπαρ με το 75% του αίματος που διακινεί. Οι ηπατικές φλέβες εφοδιάζουν το ήπαρ με αρτηριακό αίμα από την αορτή, που

αποτελεί το υπόλοιπο της ροής αίματος στο όργανο⁹¹⁻⁹⁴.

Η οξυγόνωση του οργάνου γίνεται κατά το ήμισυ από την πυλαία φλέβα και το υπόλοιπο μισό καλύπτεται από τις ηπατικές αρτηρίες. Αυτά τα αιμοφόρα αγγεία υποδιαιρούνται στα τριχοειδή αγγεία που οδηγούν στα λοβία. Το αίμα που διατρέχει τα τριχοειδή αγγεία παροχετεύεται στην κεντρική φλέβα κάθε λοβίου. Οι κεντρικές φλέβες συγχωνεύονται στις ηπατικές φλέβες, οι οποίες εξέρχονται του ήπατος και παροχετεύονται στην κατώτερη κοίλη φλέβα^{91,92}.



EIKONA 1.8: Η διπλή αιμάτωση του ήπατος

1.1.10. Γ. Χολική ροή του ήπατος

Ο όρος χολικό δέντρο προέρχεται από τους δενδριτικούς κλάδους των χολικών αγωγών. Η χολή που παράγεται στο ήπαρ συλλέγεται μέσα σε χοληφόρα τριχοειδή που συγχωνεύονται για να διαμορφώσουν τα ενδοηπατικά χοληφόρα αγγεία. Η χολή φέρεται από το κέντρο προς την περιφέρεια του λοβίου, στους μεσολόβιους χοληφόρους πόρους, που έχουν επιθηλιακό τοίχωμα. Αυτοί συνενώνονται διαρκώς με τους παρακείμενους και σχηματίζουν προς τις πύλες του ήπατος, το δεξί και αριστερό ηπατικό πόρο. Οι ηπατικοί πόροι συνδέονται μεταξύ τους σε κοινό ηπατικό πόρο.

Η χολή απάγεται άμεσα στον δωδεκαδάκτυλο μέσω κοινού χολικού πόρου, ή αποθηκεύεται προσωρινά στη χοληδόχο κύστη μέσω κυστικού αγωγού. Ο κοινός χολικός αγωγός και ο παγκρεατικός αγωγός εισέρχονται μαζί στο δεύτερο μέρος του δωδεκαδάκτυλου στο φύμα Vater⁹¹⁻⁹⁴.

1.1.10. Δ. Περιτοναϊκοί σύνδεσμοι του ήπατος

Εκτός από το τμήμα σύνδεσης με το διάφραγμα, το ήπαρ καλύπτεται εξ' ολοκλήρου από το σπλαγχνικό περιτόναιο, ώστε να μειώνει την τριβή με τα άλλα όργανα. Το περιτόναιο αυτοαναδιπλώνεται και σχηματίζει τον δρεπανοειδή και τον δεξί και αριστερό τριγωνικό σύνδεσμο⁹⁴.

1.1.10. Ε. Λειτουργική ανατομία του ήπατος

Η κεντρική περιοχή όπου ο κοινός χολικός αγωγός, η ηπατική πυλαία φλέβα, και η ηπατική αρτηρία εισέρχονται, ονομάζεται πύλη του ήπατος. Ο αγωγός, η φλέβα, και η αρτηρία διαιρούνται σε αριστερούς και δεξιούς κλάδους και τα τμήματα του ήπατος που αιματώνονται αποτελούν το λειτουργικό αριστερό και δεξί λοβό⁹¹.

Η μέση ηπατική φλέβα επίσης οριοθετεί το δεξί και αριστερό λοβό. Ο δεξιός λοβός διαιρείται περαιτέρω από τη δεξιά ηπατική φλέβα σε οπίσθιο και πρόσθιο τμήμα. Ο αριστερός λοβός διαιρείται σε διάμεσα και πλευρικά τμήματα από την αριστερή ηπατική φλέβα⁹¹⁻⁹⁴.

1.1.10. ΣΤ. Λειτουργικός ρόλος του ήπατος

Οι λειτουργίες του ήπατος στον ανθρώπινο οργανισμό είναι αναρρίθμητες και μόνο ορισμένες θα αναφερθούν εδώ. Στο ήπαρ επιτελείται μεγάλο μέρος της σύνθεσης των αμινοξέων, γλυκονογένεση (σύνθεση γλυκόζης από αμινοξέα), γλυκογένεση (σχηματισμός γλυκογόνου από γλυκόζη) και γλυκογονόλυση (διάσπαση γλυκογόνου σε γλυκόζη). Το ήπαρ είναι αρμόδιο για βιοσύνθεση και μεταβολισμό πρωτεϊνών, ομοιοστάση σιδήρου, μεταβολισμό λιπιδίων (σύνθεση χοληστερόλης) και παραγωγή τριγλυκεριδίων. Επιπλέον στο ήπαρ συντίθενται οι παράγοντες πήξης του αίματος I (ινωδογόνο), II (προθρομβίνη) B, VII, IX, X και XI, καθώς και οι πρωτεΐνες C, S και η αντιθρομβίνη. Κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης στο ήπαρ του εμβρύου παράγονται ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ από την 35η εβδομάδα και έπειτα, τον ρόλο αυτό αναλαμβάνει ο μυελός των οστών. Τέλος, το ήπαρ είναι το όργανο, όπου παράγονται όλες οι πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε ερεθίσματα ή στρες.

1.1.11 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο στόχος της θεραπείας είναι η αφαίρεση του ιού της ηπατίτιδας Γ από τον οργανισμό και η αποφυγή/μείωση της βλάβης στο ήπαρ. Ορισμένοι γονότυποι του ιού της ηπατίτιδας Γ ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπευτική αγωγή από άλλους και μπορούν να εξαλειφθούν εντελώς από το σώμα, αφαιρώντας όλες τις ενδείξεις της ασθένειας⁸⁷.

Η θεραπεία χορηγείται συνήθως για 6 έως 12 μήνες. Καλύτερη θεραπεία ηπατίτιδας Γ επιτυγχάνεται με Πεγκυλιωμένη Ιντερφερόνη (Pegylated Interferon) και Ριμπαβιρίνη (Ribavirin). Η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη χορηγείται με υποδόρια ένεση και η ριμπαβιρίνη με μορφή χαπιού. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ο γιατρός ή ο ειδικός χρειάζεται να ελέγχει την υγεία του ασθενούς τακτικά⁸⁷⁻⁸⁹.

Η θεραπευτική αγωγή της ηπατίτιδας Γ βελτιώνεται συνεχώς. Σήμερα περίπου 50 έως 60% των ατόμων σε θεραπεία απαλλάσσονται από τον ιό. Μερικοί γονότυποι του ιού της ηπατίτιδας Γ παρουσιάζουν ποσοστό κάθαρσης (clearance rate) 80%⁸⁸. Βελτίωση στα πρωτόκολλα χορήγησης των φαρμάκων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αύξηση της συχνότητας ανταπόκρισης των ασθενών σε θεραπεία, καθώς επίσης και καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των παραγόντων αυτών⁹⁰.

1.1.12 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ

Τα κυριότερα συστήματα μελέτης του ιού της ηπατίτιδας Γ δίνονται αναφορικά στον παρακάτω πίνακα 1.6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.6 In vitro και in vivo συστήματα μελέτης του ιού της ηπατίτιδας Γ.

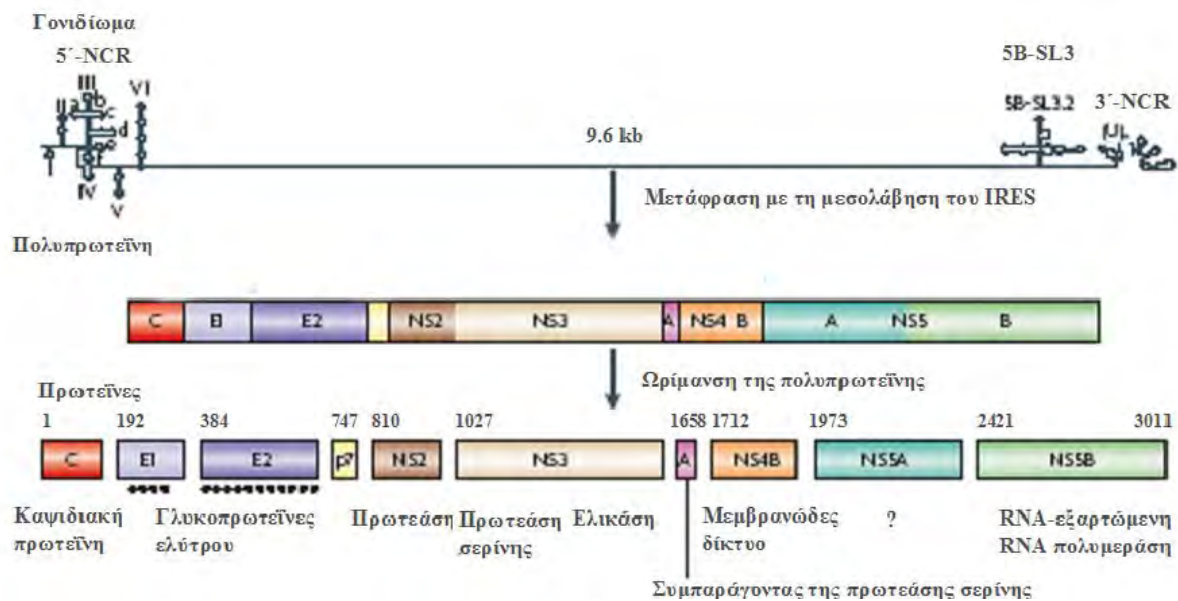
In vitro μοντέλα	Παροδική επιμόλυνση σε κυτταρικές καλλιέργειες ⁹⁶⁻¹⁰³ .
	Κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά κάποιια, ή κάποιες πρωτεΐνες του ιού ¹⁰⁴ .
	Σύστημα των ρεπλικονίων (υπογονιδιωμικά ή πλήρους μήκους, με επιλογή ή παροδικά) ^{102,103} .
	Ρετροϊοί που φέρουν κωδική αλληλουχία για την έκφραση κάποιιας, ή κάποιων πρωτεϊνών του ιού ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ .
	Παρόμοιοι ιοί (π.χ. ιός GBV-B) ¹¹⁰⁻¹¹² .
	Σύστημα μόλυνσης με τον ιό της ηπατίτιδας JFH-1 ¹²⁴⁻¹²⁷ .
In vivo μοντέλα	Διαγονιδιακοί ποντικοί ¹¹⁷⁻¹²² .
	Ποντικοί με ανοσοανεπάρκεια ή με ξένα ανθρώπινα μοσχεύματα ήπατος (liver xenografts) ¹²³ .
	Παρόμοιοι ιοί (π.χ. ιός GBV-B) ¹¹⁰⁻¹¹² .
	Χιμπαντζής (<i>Pan troglodytes</i>) ^{19,113-116}

1.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ

Το ιϊκό γονιδίωμα είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, μήκους 9600 νουκλεοτιδίων. Το ιϊκό RNA περιλαμβάνει 5' και 3' μη μεταφραζόμενα άκρα και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μήκους 3000 αμινοξέων. Η πολυπρωτεΐνη πρωτεολύεται με τη βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου, σε τουλάχιστον 3 δομικά και 7 μη δομικά πολυπεπτίδια (ΠΙΝΑΚΑΣ 1.7 και ΕΙΚΟΝΑ 1.9)¹²⁸. Στις παρακάτω ενότητες αναλύονται διεξοδικά οι πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.7 Οι πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ.

Πρωτεΐνη	Μέγεθος	Λειτουργία
core	21kDa	Πρόσδεση RNA, σχηματισμός του Νουκλεοκαψιδίου
core+1	17kDa	
E1	31-25kDa	Γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου, σύνδεση με την E2
E2	70kDa	Γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου, πρόσδεση στον υποδοχέα, σύνδεση με την E1
p7	7kDa	Κανάλι ιόντων
NS2	21kDa	Συστατικό της πρωτεΐνάσης NS2-3
NS3	69kDa	Αμινοτελική περιοχή: πρωτεΐνάση, καρβοξυτελική: NTPάση/ελικάση
NS4A	6kDa	Συμπαράγοντας της πρωτεΐνάσης NS3-4A
NS4B	27kDa	Επάγει μεμβρανικές αλλαγές
NS5A	56-58kDa	Φωσφοπρωτεΐνη
NS5B	68 kDa	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση



ΕΙΚΟΝΑ 1.9: Οργάνωση του γονιδιώματος και ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας Γ.

1.2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ CORE

Η πρωτεΐνη core παράγεται από το αμινοτελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας Γ και σχηματίζει το νουκλεοκαψίδιο του ιού. Η πρωτεόλυση γίνεται μέσω μίας κυτταρικής πεπτιδάσης σινιάλου (SP). Η αμινοξική της αλληλουχία είναι αρκετά συντηρημένη στους διαφορετικούς υπότυπους, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού. Η αμινοτελική περιοχή της είναι βασική, ενώ το καρβοξυτελικό της άκρο είναι υδρόφοβο. Έχουν αναγνωρισθεί διάφορες μορφές της πρωτεΐνης core με διαφορετικά μοριακά βάρη (16-23 KDa) και διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό¹²⁹⁻¹³¹.

Η πρωτεΐνη core εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, συγκριμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και εντοπίζονται όλες οι άλλες ιικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ. Περιέχει λειτουργική αλληλουχία εντοπισμού της στον πυρήνα (nuclear localization site, NLS) και εντοπίζεται σε πολύ μικρό βαθμό στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Το καρβοξυτελικό της άκρο χαρακτηρίστηκε ως διαμεμβρανική περιοχή που συνδέεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου¹³².

Εκτός από το ρόλο της ως δομικό συστατικό του ιού (στο σχηματισμό του νουκλεοκαψιδίου), επιδρά σημαντικά σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική αύξηση και διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος^{133,132}. Επιπλέον, η πρωτεΐνη core πιθανολογείται ότι οδηγεί στην καταστολή της απόπτωσης του κυττάρου. Η καταστολή της

απόπτωσης έχει συσχετιστεί με χρόνια λοίμωξη και ηπατοκυτταρικό καρκίνο¹³⁶. Πράγματι, έρευνες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας Γ φαίνεται να αλληλεπιδρά με το κυτταροπλασματικό τμήμα υποδοχέων της οικογένειας TNF-R και τον υποδοχέα θανάτου Fas, ρυθμίζοντας έτσι την απόπτωση του κυττάρου¹³⁵. Επίσης, η πρωτεΐνη core ενεργοποιεί μονοπάτια σηματοδότησης, όπως των MAPK κινασών (Mitogen-Activated Protein Kinases), των ERKs (extracellular signal-regulated protein kinase), του p38 και της SAPK/JNK (stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase). Τα παραπάνω μονοπάτια σηματοδότησης είναι υπεύθυνα για τη φωσφορυλίωση πολυάριθμων κινασών με τελικούς αποδέκτες μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση, την διαφοροποίηση και την απόπτωση του κυττάρου¹³⁷⁻¹³⁹.

Η ικανότητα της πρωτεΐνης core για μεταγραφική ρύθμιση οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδρασή της με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στην περιοχή των υποκινητών και ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου. Από την πρωτεΐνη core ρυθμίζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB (Nuclear Factor kappa B), AP-1 (Activator Protein 1) και SRF (Serum Response Factor)¹⁴⁰. Ο NF-κB ρυθμίζεται μέσω πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης και αποτελεί αντιαποπτωτικό, προπολλαπλασιαστικό και αντιφλεγμονώδες μεταγραφικό παράγοντα που ελέγχει διαδικασίες αύξησης και ανοσοαπόκρισης¹⁴¹. Οι μεταγραφικοί παράγοντες AP-1 και SRF επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση¹⁴².

1.2.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ E1 ΚΑΙ E2

Οι πρωτεΐνες φακέλου E1 και E2 είναι γλυκοζυλιωμένες και σχηματίζουν μη ομοιοπολικό σύμπλεγμα, που θεωρείται θεμελιώδης λίθος του ιϊκού φακέλου. Οι διαμεμβρανικές περιοχές των E1 και E2 που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, συμμετέχουν στον ετεροδιμερισμό και έχουν ιδιότητα πρόσδεσης στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου¹⁴³. Η κάθε διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από δύο αλυσίδες υδρόφοβων ομάδων, που διαχωρίζονται με πολικό τμήμα. Η δεύτερη υδρόφοβη ομάδα λειτουργεί ως εσωτερικό πεππίδιο σινιάλο για το μάτισμα των πρωτεϊνών E2 και p7¹⁴⁴.

Το μη ομοιοπολικό σύμπλεγμα των πρωτεϊνών είναι το ιϊκό συστατικό της επιφάνειας του ιού της ηπατίτιδας Γ που αναγνωρίζεται από πληθώρα κυτταρικών υποδοχέων, όπως η CD81 τετρασπανίνη¹⁴⁵, ο υποδοχέας scavenger receptor ομάδας B τύπου I (SR-B1)¹⁴⁶, και πανόζες πρόσδεσης λεκτίνης DC-SIGN και L-SIGN¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Είναι προφανές ότι, οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 αποτελούν στόχο για την ανάπτυξη αντι-ιϊκών μορίων που θα εμποδίζουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα¹⁵⁰.

1.2.3 ΠΡΩΤΕΪΝΗ Ρ7

Το πολυπεπτιδίο ρ7 είναι μικρή πολυτοπική πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές με το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό της άκρο να κατευθύνεται προς τις εσωτερικές πτυχές του ενδοπλασματικού δικτύου του κυττάρου του ξενιστή^{151,152}. Μικρό ποσοστό της πρωτεΐνης έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου. Η πρωτεΐνη ρ7 του ιού της ηπατίτιδας Γ δεν απαιτείται για την αντιγραφή RNA *in vitro*, αλλά είναι απαραίτητη για παραγωγική μόλυνση *in vivo*¹⁵³. Έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει ολιγομερή, διαθέτει ενεργότητα καναλιού κατιόντων και ανήκει στην οικογένεια των βιροπορινών¹⁵⁴.

1.2.4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS2

Η πρωτεΐνη NS2 ανήκει στις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού και χρησιμεύει στην δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής του. Η λειτουργία της ώριμης μορφής της πρωτεΐνης NS2 είναι άγνωστη, αλλά πριν από το μάτισμά της από την πολυπρωτεΐνη του ιού, η πρωτεΐνη NS2 συμμετέχει ενεργά στο μάτισμα του συμπλόκου των πρωτεϊνών NS2 και NS3 155-157. Η δομή της πρωτεΐνης NS2 είναι ανάλογη με εκείνη μιας διμερικής κυστεϊνικής πρωτεάσης με δύο ενεργά μέρη. Διαθέτει πολλά υδρόφοβα αμινοξέα και πιθανολογείται ότι είναι μία πολυτοπική μεμβρανική πρωτεΐνη. Όταν η πρωτεΐνη NS2 εκφράζεται μόνη της, εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου του κυττάρου¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Πρόσφατα προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή της περιοχής της NS2 πρωτεάσης (αμινοξικά κατάλοιπα 94-217, NS2 pro). Η NS2 pro σχηματίζει ένα διμερές που έχει σύνθετα ενεργά κέντρα. Κάθε κέντρο αποτελείται από κατάλοιπα και από τα δύο μονομερή. Επίλυση της δομής των δύο μονομερών και ειδικότερα της αμινοτελικής μεμβρανικής περιοχής της πρωτεΐνης NS2 πιθανόν να συμβάλει στην διαλεύκανση και άλλων λειτουργιών της στον κύκλο ζωής του ιού της ηπατίτιδας Γ¹⁶².

1.2.5 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ NS3 ΚΑΙ NS4A

Η NS3 είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Μοτίβα πρωτεάσης σερίνης και RNAελικάσης/NTPάσης εντοπίζονται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό της άκρο αντίστοιχα^{166,167}. Η πρωτεολυτική δράση της πρωτεΐνης NS3 ενισχύεται από την πρωτεΐνη NS4A¹⁶⁴. Η πρωτεΐνη NS4A είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη με υδρόφοβο αμινοτελικό άκρο, που απαιτείται για την πρόσδεσή της στις πτυχές του ενδοπλασματικού δικτύου¹⁶⁵. Επιπλέον, η πρωτεΐνη NS4A διαθέτει μία κεντρική περιοχή όπου συνδέεται με την πρωτεΐνη NS3 με μη πολικούς δεσμούς. Το

σύμπλοκο που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες NS3 και NS4A (NS3-NS4A) έχει πρωτεολυτική δράση^{167,168} και είναι απαραίτητο για τον πλήρη κύκλο ζωής του ιού της ηπατίτιδας Γ¹⁶⁹.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το σύμπλοκο μεταξύ των πρωτεϊνών NS3 και NS4A πρωτεολύει και απενεργοποιεί, δύο καθοριστικής σημασίας πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές, Triff77 και Cardif78, είναι πρωτεΐνες προσαρμογής της έμφυτης ανοσίας του κυττάρου κατά την είσοδο μικροβίου¹⁷⁰. Επίσης, το σύμπλοκο μεταξύ των πρωτεϊνών NS3 και NS4A δημιουργεί ασυνήθιστα ρηχή περιοχή με εκτεταμένη επιφάνεια πρόσδεσης του υποστρώματος, που προσφέρεται για τον σχεδιασμό ειδικών αναστολέων (ως αντιϊκών παραγόντων)^{171,172}.

1.2.6 ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS4B

Η πρωτεΐνη NS4B είναι μία αρκετά υδρόφοβη, μη δομική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Γ¹⁷³. Μελέτες προβλέπουν ότι διαθέτει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές. Στο κυτταρόπλασμα εντοπίζονται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης NS4B, αλλά ένα μέρος του αμινοτελικού της άκρου μπορεί να βρεθεί και στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η παρουσία της πρωτεΐνης και στις δύο μεριές της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, υπαινίσσει ότι η πρωτεΐνη κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενδοεπικοινωνία μεταξύ του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου και του κυτταροπλάσματος του κυττάρου^{174,175}. Γενικά δεν είναι μία πολύ καλά χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη του ιού και ίσως στο προσεχές μέλλον θα έχουμε περισσότερες πληροφορίες για την διαμεμβρανική της λειτουργία.

1.2.7 ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS5A

Η πρωτεΐνη NS5A μία μη δομική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Γ. Είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη που προσκολλάται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου κυττάρου¹⁷⁶. Η προσκόλλησή της επιτυγχάνεται μέσω αμινοτελικής αμφιπαθητικής α-έλικας που είναι ενσωματωμένη παράλληλα στο φύλλο της λιπιδικής διπλοστιβάδας¹⁷⁸. Η πρωτεΐνη NS5A αποτελείται από τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές (I, II, III). Η περιοχή I (αα 1-213) αποτελεί το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, όπου βρίσκεται η αμφιπαθητική α-έλικα. Δομικές αναλύσεις της αμινοξικής αλληλουχίας της περιοχής I αποκαλύπτουν ότι η συγκεκριμένη περιοχή διμερίζεται και δημιουργεί δακτύλιο ψευδαργύρου, καθιστώντας την NS5A μεταλλοπρωτεΐνη¹⁷⁷. Στην περιοχή II (αα 250-342) εντοπίζονται ρυθμιστικές αλληλουχίες της πρωτεΐνης που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, όπως μια περιοχή πλούσια σε προλίνες (SH3 domains), η οποία αλληλεπιδρά με το μονοπάτι των MAP κινασών. Η περιοχή III (αα 356-447) της πρωτεΐνης NS5A

αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Είναι μια περιοχή ελάχιστα συντηρητική και διαθέτει ένα λειτουργικό σινιάλο εντοπισμού στον πυρήνα (NLS)¹⁷⁹.

Η πρωτεΐνη NS5A αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών και είναι μία πολυλειτουργική φωσφοπρωτεΐνη απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και την παθογένεια του ιού. Η πρωτεΐνη NS5A αποτελεί απαραίτητο στοιχείο του συμπλόκου αναπαραγωγής του ιϊκού RNA. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της NS5A είναι συντηρημένο χαρακτηριστικό στα γένη Hepacivirus και Pestivirus, καθώς και στις πρωτεΐνες NS5 του γένους Flavivirus, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού¹⁸⁰. Ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη NS5A έχει σημαντικό ρόλο στην εδραίωση της μόλυνσης από τον ιό, συμμετέχοντας στους μηχανισμούς αποφυγής της ενδογενούς ανοσιακής απόκρισης του κυττάρου ξενιστή¹⁸¹. Μια άλλη σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης NS5A είναι η συμμετοχή της στην ανθεκτικότητα του ιού της ηπατίτιδας Γ στην ιντερφερόνη. Τούτο επιτυγχάνεται μέσω της παρέμβασης της πρωτεΐνης NS5A στα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγουν οι ιντερφερόνες για να καταστείλουν τη σύνθεση των ιϊκών πρωτεϊνών¹⁸². Τέλος, όπως η καψιδιακή πρωτεΐνη core, έτσι και η πρωτεΐνη NS5A επηρεάζει τη δράση κυτταρικών και ιϊκών υποκινητών, με αποτέλεσμα να συμβάλλει στη ρύθμιση της μεταγραφής πολυάριθμων κυτταρικών γονιδίων¹⁸³.

1.2.8 ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS5B

Η πρωτεΐνη NS5B είναι μεμβρανική μη δομική πρωτεΐνη του ιού της ηπατίτιδας Γ. Διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή ιϊκού RNA σε κυτταρικές σειρές. Όπως οι περισσότερες πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ, έτσι και η πρωτεΐνη NS5B εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η πρωτεΐνη NS5B είναι μία RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase)¹⁸⁴. Η αντιγραφή του ιού της ηπατίτιδας Γ περιλαμβάνει σύνθεση συμπληρωματικού RNA αρνητικής πολικότητας και γονιδιωματικών μορίων RNA θετικής πολικότητας. Η όλη σύνθεση καταλύεται από την πρωτεΐνη NS5B¹⁸⁵.

1.2.9 ΠΡΩΤΕΪΝΗ CORE+1

Αφήσαμε στο τέλος της ενότητας την περιγραφή της πρωτεΐνης core+1, όχι γιατί είναι λιγότερο σημαντική από τις πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ που προαναφέρθηκαν, αλλά επειδή αποτελεί κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης (ΕΙΚΟΝΑ 1.10). Κατά τα μέσα της δεκαετίας του '90 μελέτες έκφρασης της κωδικής περιοχής του γονιδιώματος του ιού της

ηπατίτιδας Γ έδειξαν ότι εκφράζει μία πρωτεΐνη μικρότερη από 21 kDa. Η μικρή αυτή πρωτεΐνη 17kDa περίπου εκφράζονταν από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης core του ιού¹⁸⁶⁻¹⁸⁸.

Ο Δρ. Walewski και οι συνεργάτες του απέδειξαν την παρουσία λειτουργικού εναλλακτικού ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (ARF – Alternative Reading Frame) στην αρχή του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Γ. Το συγκεκριμένο εναλλακτικό ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης επικαλύπτει την περιοχή έκφρασης της καψιδιακής πρωτεΐνης core στο νουκλεοτίδιο +1. Επιπλέον, η ίδια επιστημονική ομάδα κατασκεύασε πεπτίδια που αντιπροσώπευαν την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης core+1 για να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε ορρούς ασθενών που έπασχαν από ιό ηπατίτιδας Γ¹⁸⁹.

Λίγο αργότερα, η επιστημονική ομάδα του Δρ Χυ και το εργαστήριο της Δρ Μαυρομαρά επισημοποίησαν ανεξάρτητα την έκφραση της πρωτεΐνης core+1 σε ακυτταρικά συστήματα, όπως δικτυοερυθροκύτταρα κουνελιού και κυτταρικά εκχυλίσματα σίτου. Η νέα αυτή πρωτεΐνη είχε μοριακό μέγεθος 17kDa. Η έκφραση της νέας πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με μεταφραστική αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης κατά -2/+1 νουκλεοτίδια. Η μεταφραστική αλλαγή συμβαίνει στην πλούσια σε κατάλοιπα αδενίνης περιοχή των κωδικών 8-11 (νουκλεοτίδια 364-373) από ριβοσώματα που ξεκινούν τη μετάφραση στο εναρκτήριο κωδικόνιο AUG της ιικής πολυπρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε ARFP (πρωτεΐνη που προκύπτει από εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης, alternative reading frame protein) ή F (πρωτεΐνη που προκύπτει από μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, frameshift protein) ή core+1^{190,191,194}.

Περαιτέρω μελέτες στο εργαστήριο της Δρ Μαυρομαρά έδειξαν ότι η μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης οφείλεται σε αλληλουχία των 10 συνεχόμενων αδενινών του πρωτότυπου στελέχους 1a του ιού της ηπατίτιδας Γ. Πιθανολογείται ότι η ύπαρξη των 10 συνεχόμενων αδενινών προκαλεί 'γλίστρημα' των ριβοσωμάτων που μεταφράζουν την πρωτεΐνη core, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στο +1. Παραγωγή της πρωτεΐνης core+1 (17kDa) δεν παρατηρήθηκε στο στέλεχος H του γονότυπου 1a του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η αλληλουχία του στελέχους H του γονότυπου 1a φέρει γουανίνη και κυτοσίνη στις θέσεις 4 και 10 της συνεχόμενης αλληλουχίας αδενινών (A AAG AAA AAC). Ίσως η αποτελεσματική σύνθεση της πρωτεΐνης core+1 (17kDa) να εξαρτάται άμεσα από τις δέκα συνεχόμενες αδενίνες. Επιπλέον για να αποκλειστεί η πιθανότητα έκφρασης της core+1 ως απόρροια του 'γλιστρήματος' της RNA πολυμεράσης (T7 ή SP6) στο πλαίσιο ανάγνωσης +1 κατά την *in vitro* μεταγραφή, πραγματοποιήθηκε σήμανση με ραδιενεργό φωσφόρο της κωδικής αλληλουχίας αδενινών του πρωτότυπου στελέχους 1a του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η αλληλουχία των 10 συνεχόμενων αδενινών

στο RNA παρέμεινε ακέραιη, χωρίς να υπάρχει καμία έλλειψη ή προσθήκη που θα οδηγούσε στη σύνθεση ενός προϊόντος μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης¹⁹⁰.

Επίσης, παροδική διαμόλυνση σε κυτταρικών σειρών θηλαστικών με πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν την κωδική αλληλουχία της πρωτεΐνης core+1 συζευγμένη με το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης έδειξαν πως σε αντίθεση με τα ακυτταρικά συστήματα, η πρωτεΐνη core+1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα τόσο από το πρωτότυπο στέλεχος του γονότυπου 1a, όσο και από το στέλεχος H του γονότυπου 1a του ιού της ηπατίτιδας Γ¹⁹². Ωστόσο, η έκφραση της πρωτεΐνης core+1 δεν έγινε μέσω καποιού φαινομένου μετατόπισης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης στη θέση +1. Αντιθέτως, και τα δύο ιικά στελέχη του ιού της ηπατίτιδας Γ εξέφρασαν την πρωτεΐνη core+1 μέσω μηχανισμού εσωτερικής έναρξης της μετάφρασης.

Ειδικότερα, ο μηχανισμός χρησιμοποιεί κωδικόνια έναρξης AUG που εντοπίζονται εσωτερικά στο πλαίσιο ανάγνωσης +1, μεταξύ των νουκλεοτιδίων 598 και 604 (κωδικόνια 85 και 87) και είναι ανεξάρτητος από την σύνθεση της πρωτεΐνης core και την παρουσία των συνεχόμενων αλληλουχιών στα κωδικόνια 8-11. Συνεπώς, η έναρξη της μετάφρασης στο πλαίσιο ανάγνωσης +1 στα εναρκτήρια κωδικόνια 85 και 87, οδήγησε στη σύνθεση μίας άλλης μορφής της πρωτεΐνης core+1, γνωστή ως πρωτεΐνη core+1/S (όπου S για short, κοντή). Η νέα μορφή της πρωτεΐνης core+1 ήταν μικρότερη σε μοριακό μέγεθος (περίπου 11kDa) από την πρωτεΐνη core+1 που εκφράζεται μετά από μεταφραστική αλλαγή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης^{192,195}.

Τα εσωτερικά κωδικόνια έναρξης AUG στις θέσεις 85 και 87 του πλαισίου ανάγνωσης +1 εμφανίζουν υψηλή συντηρητικότητα μεταξύ των διαφόρων στελεχών του ιού της ηπατίτιδας Γ. Συγκριτική μελέτη 117 αλληλουχιών έκφρασης της καψιδιακής πρωτεΐνης core των γονοτύπων 1a, 1b, 2a-c, 2k, 3a,3b, 4a-f, 5a, 6a, 6d, 6e, 6h και 6k, έδειξε ότι 66 αλληλουχίες περιέχουν και τα δύο AUG, 23 φέρουν μόνο το AUG 85 ή το AUG 87 και 5 δεν περιέχουν κανένα από τα δύο AUG¹⁹⁵.

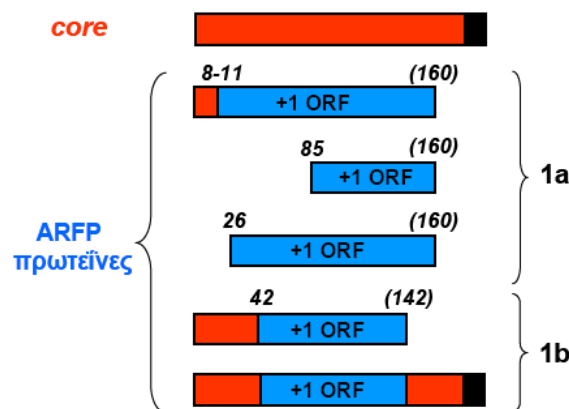
Επιπλέον η ομάδα του Δρ. Baril επιβεβαίωσε τα παραπάνω και απέδειξε ότι η πρωτεΐνη core+1 μπορεί να παράγεται από ένα άλλο εναλλακτικό προϊόν που προκύπτει από την έναρξη της μετάφρασης σε εσωτερικό κωδικόνιο του πλαισίου ανάγνωσης +1 του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Το εσωτερικό αυτό κωδικόνιο αναγνωρίστηκε στο κωδικόνιο 26 του πλαισίου ανάγνωσης +1. Επίσης, βρέθηκε ότι σε πιθανή απώλεια των εναρκτήριων κωδικών 85 και 87, η έκφραση της πρωτεΐνης core+1 μπορεί να ξεκινήσει από το εσωτερικό κωδικόνιο 26¹⁹⁶.

Η πρωτεΐνη core+1 ανιχνεύτηκε και στον ιό ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b. Η παραγόμενη πρωτεΐνη core+1 είναι απόρροια δυο διαδοχικών μετατοπίσεων του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης στην αρχή του γονιδιώματος του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b. Οι διαδοχικές μετατοπίσεις του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης είναι ανεξάρτητες από την ύπαρξη των

επαναλαμβανόμενων αδενινών. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μετατόπιση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης στο +1 (κωδικόνιο 42) και στην συνέχεια επαναφορά των ριβοσωμάτων στο κύριο πλαίσιο ανάγνωσης της πολυπρωτεΐνης στο κωδικόνιο 144 (κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης +1 του γονότυπου 1b)¹⁹⁷.

Με βάση τα παραπάνω, η πρωτεΐνη core+1 είναι δυνατόν να εκφράζεται τόσο μέσω μεταφραστικών μηχανισμών που μετατοπίζουν τα ριβοσώματα στο πλαίσιο ανάγνωσης +1, όσο και μέσω μεταφραστικής έναρξης σε εσωτερικά κωδικόνια του πλαισίου ανάγνωσης +1. Η ριβοσωμική αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και η εσωτερική έναρξη της μετάφρασης είναι στρατηγικές που διαθέτουν πολλοί RNA και κάποιοι DNA ιοί προκειμένου να αξιοποιήσουν το γονιδίωμά τους με το καλύτερο δυνατό τρόπο. Η έκφραση πρωτεϊνών στο πλαίσιο ανάγνωσης +1 θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

- α) ατελή σάρωση (leaky scanning) κατά την οποία παρατηρείται γραμμική μετανάστευση των ριβοσωμάτων που σαρώνουν μια κωδική αλληλουχία σε εσωτερικά κωδικόνια έναρξης. Απαντάται σε κοροναϊούς (coronaviruses)¹⁹⁸ και ιούς του θηλώματος (papillomaviruses)¹⁹⁹.
- β) ριβοσωμική μεταπήδηση (ribosome shunting) κατά την οποία το ριβοσωμικό προεναρκτήριο σύμπλοκο σάρωσης μετατοπίζεται σε εσωτερικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης παρακάμπτοντας μια εκτεταμένη δομή του μορίου RNA. Απαντάται σε αδενοϊούς (adenoviruses)²⁰⁰.
- γ) έναρξη μέσω εσωτερικής πρόσδεσης ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site Mediated Initiation) κατά την οποία τα ριβοσώματα προσδένονται απευθείας σε κάποια εσωτερική θέση στο RNA. Απαντάται στους φλαβοϊούς (flavoviruses).



ΕΙΚΟΝΑ 1.10: Σχηματική αναπαράσταση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης core+1 (ARFPs) ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπους 1a και 1b.

1.2.9. A. Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης core+1 σε ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο και ηπατοκυτταρικό καρκίνο

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA διαφόρων γονότυπων του ιού της ηπατίτιδας Γ, εντοπίζει αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης core+1 σε ορρούς ασθενών με χρόνια λοίμωξη. Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί ότι ανιχνεύθηκαν αντισώματα πρωτεΐνης core+1 έναντι επίτοπων στην περιοχή των κωδικόνιων 85 και 87, σε ασθενείς μολυσμένους με ιό ηπατίτιδας Γ. Η παραπάνω παρατήρηση καθιστά λειτουργικά τα εσωτερικά εναρκτήρια κωδικόνια (85 και 87) του πλαισίου ανάγνωσης +1 για την παραγωγή πρωτεΐνης core+1/S σε *in vivo* συνθήκες¹⁹⁰.

Επίσης, συγκρίσεις γονιδιωματικών αλληλουχιών του ιού σε ασθενείς με και χωρίς ηπατοκυτταρικό καρκίνο δείχνουν ότι η πρωτεΐνη core+1 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με κίρρωση, ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο ιογενούς αιτιολογίας²⁰². Επιπλέον, η υπεύθυνη κωδική αλληλουχία για την έκφραση της καψιδιάκης πρωτεΐνης core εμφανίζει αυξημένο αριθμό μεταλλαγών σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Μάλιστα σε αρκετές περιπτώσεις, οι μεταλλαγές εντοπίζονται σε θέσεις που σχετίζονται με τη μετάφραση της πρωτεΐνης core+1²⁰³.

1.2.9.B. Βιολογική σημασία πρωτεΐνης core+1

Η βιολογική σημασία των διαφόρων πρωτεϊνών που εκφράζονται από το πλαίσιο ανάγνωσης +1, παραμένουν άγνωστες. Εντούτοις, από διάφορες μελέτες προκύπτουν κάποιες «δειλές» ενδείξεις για τη βιολογική σημασία των πρωτεϊνών αυτών. Συγκεκριμένα, η επιστημονική ομάδα του Δρ. Wu σε επιμολύνσεις ηπατικών κυττάρων HepG2, έδειξε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1 αυξάνει τη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου *c-myc*, ενώ μειώνει τη μεταγραφή και μετάφραση του γονιδίου *p53*²⁰⁴. Παράλληλα ο Δρ. Ray έδειξε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1 μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου *p21*²⁰⁵. Επιπλέον, μόλυνση ανθρώπινων κυττάρων THP-1, δενδριτικών και μακροφάγων με αδενοϊό, που έφερε την κωδική αλληλουχία για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1, φανέρωσε ότι η πρωτεΐνη core+1 οδηγεί στην αύξηση ιντερλευκίνης 6 και 8, καθώς και χημοκινών MCP-1 και MIP-1β. Παράλληλα, όταν ηπατικά κύτταρα Huh-7 μολύνθηκαν με τον ίδιο αδενοϊό, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ιντερλευκίνης 8²⁰⁶. Πειράματα με τη μέθοδο του συστήματος των δύο υβριδίων (yeast two hybrid) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη core+1 μπορεί να αλληλεπιδρά με την κυτταρική πρωτεΐνη pefoldin 2, η οποία συμμετέχει δυναμικά στην οργάνωση του κυτταρικού σκελετού²⁰⁷. Επίσης, η πρωτεΐνη core+1 εμφανίστηκε να αλληλεπιδρά με άλλες 36 πρωτεΐνες, υπεύθυνες για διάφορες διεργασίες στο κύτταρο του ξενιστή, όπως μεταβολισμό λιπιδίων, σύνθεση και μεταφορά πρωτεϊνών, ανοσορύθμιση και διαφοροποίηση²⁰⁸. Επίσης, έρευνα έδειξε ότι υπάρχει διαφορά στην έκφραση της πρωτεΐνης core+1 μεταξύ κυτταροπλασματικού και πυρηνικού συστήματος

έκφρασης²⁰⁹. Τέλος, με τη χρήση ανάλυσης μικροσυστοιχίας παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη core+1 ρυθμίζει αρνητικά, ή θετικά την έκφραση 145 γονιδίων υπεύθυνων για την ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών. Βέβαια, τα αποτελέσματα ανάλυσης μικροσυστοιχίας πρέπει να επιβεβαιωθούν και με άλλες μεθόδους²¹⁰.

Συνοπτικά, η πρωτεΐνη core+1 είναι νεο-περιγραφείσα πρωτεΐνη με μικρές ενδείξεις σχετικά με τη βιολογική της σημασία. Θα πρέπει να διενεργηθούν εκτεταμένες έρευνες στα διάφορα συστήματα μελέτης του ιού της ηπατίτιδας Γ, προκειμένου να αντληθούν πληροφορίες για τη δράση της πρωτεΐνης core+1 στον κύκλο ζωής του ιού, στην ρυθμισή των ανοσολογικών αποκρίσεων του κυττάρου-ξενιστή από τον ιό, καθώς και στην καρκινογένεση. Τέτοιες μελέτες θα πρέπει να στραφούν τόσο στο επίπεδο της μετάφρασης, όσο και στο επίπεδο της μεταγραφής κυτταρικών γονιδίων, που είναι πιθανοί στόχοι ρυθμιστικού ελέγχου της πρωτεΐνης core+1.

1.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΗΠΑΤΙΚΟΙ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ

Η είσοδος του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Γ επιφέρει ουσιαστικές αλλαγές στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών γονιδίων στο κύτταρο του ξενιστή. Η ικανότητα του ιού της ηπατίτιδας Γ για μεταγραφική ρύθμιση οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης core και της πρωτεΐνης NS5A με κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται στους υποκινητές κυτταρικών γονιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι και η νέα πρωτεΐνη core+1 ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα κάποιων υποκινητών γονιδίων στο κύτταρο του ξενιστή (π.χ. τον υποκινητή του γονιδίου του p21)²⁰⁵. Για να γίνει πλήρως κατανοητή η παρούσα διδακτορική μελέτη για τη δράση των πρωτεϊνών core και core+1 στην ενεργότητα υποκινητών διαφόρων γονιδίων θα πρέπει να γίνει μία συνοπτική αναφορά στη διαδικασία της μεταγραφής και στα ηπατικά γονίδια που μελετήθηκαν.

1.3.1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

Η RNA πολυμεράση II είναι μία εκ των τριών RNA πολυμεράσεων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ευθύνεται για την μεταγραφή αγγελιοφόρου RNA (mRNA), όπως και των περισσότερων μικρών πυρηνικών RNA²¹¹.

Έκφραση γονιδίων από RNA πολυμεράση II είναι αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία που περιλαμβάνει αρκετά ρυθμιστικά στάδια όπως μεταγραφή του DNA σε mRNA, τροποποίηση και εξαγωγή mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και μετάφρασή του σε πρωτεΐνη. Επιπροσθέτως πρέπει να σημειωθεί ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επηρεάζεται και από

άλλες παραμέτρους όπως σταθερότητα mRNA και πρωτεΐνης. Είναι άκρως απαραίτητο η γονιδιακή έκφραση να είναι αυστηρά ελεγχόμενη καθώς ρυθμίζει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του οργανισμού, είναι το τερματικό σημείο πολλών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και μετασχηματίζει προσαρμοστικά το κύτταρο στις μεταβολικές ανάγκες και τα περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα²¹¹.

Γονιδιακή μεταγραφή από RNA πολυμεράση II εξαρτάται από την συντονισμένη αλληλεπίδραση συγκεκριμένων ρυθμιστικών πρωτεϊνών (ενεργών trans παραγόντων) με πολυάριθμα στοιχεία αλληλουχίας του DNA (ενεργοί cis παράγοντες). Τα στοιχεία αυτά της αλληλουχίας DNA συναντώνται συνήθως στην περιοχή 5' άνωθεν της μεταγραφικής εναρκτήριας περιοχής. Οι αλληλουχίες που εμπλέκονται, περιλαμβάνουν την περιοχή του υποκινητή που αποτελείται από την βασική περιοχή του υποκινητή, τα άνωθεν ρυθμιστικά στοιχεία, τον ενισχυτή και τις περιοχές ενίσχυσης και σίγασης της μεταγραφικής δυνατότητας του υποκινητή^{212,213}.

Ενεργοί trans παράγοντες, ή μεταγραφικοί παράγοντες δρουν μέσω σύνδεσης με ενεργούς cis παράγοντες και επηρεάζουν την μεταγραφή επιδρώντας άμεσα ή έμμεσα με την RNA πολυμεράση II. Γονιδιακή μεταγραφή από RNA πολυμεράση II υποστηρίζεται από ομάδα μεταγραφικών παραγόντων που συχνά ονομάζονται γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες προσδένονται στην βασική περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και προσελκύουν την RNA πολυμεράση II ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες μεταγραφής λειτουργούν μέσω πρόσδεσης των ενεργών cis παραγόντων που εντοπίζονται στην άνωθεν ή κάτωθεν περιοχή της βασικής περιοχής του υποκινητή και ελέγχουν την μεταγραφή^{212,214}.

1.3.2 RNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ II ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΟΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗΣ

Τα στοιχεία της βασικής περιοχής του υποκινητή έχουν χαρακτηριστεί ελάχιστα στοιχεία DNA, που είναι απαραίτητα για ακριβή μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II²¹² και περιέχουν την περιοχή έναρξης της μεταγραφής που περιλαμβάνει έως και 35 νουκλεοτίδια άνωθεν ή κάτωθεν της. Υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση των στοιχείων του DNA που συγκροτούν την βασική περιοχή του υποκινητή πολλών γονιδίων τάξης II. Η βασική περιοχή του υποκινητή ενδέχεται να περιέχει στοιχεία αναγνώρισης μεταγραφικών παραγόντων όπως, TFIIIB, BRE, Inr, DPE, κουτί TATA και λοιπά²¹¹.

1.3.3 ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η έναρξη της μεταγραφής γίνεται μέσω σύνδεσης της RNA πολυμεράσης II με την βασική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και με ταυτόχρονη μεσολάβηση τριών από τους παράγοντες μεταγραφής TFII-A, -B, -D, -E, -F και -H

1.3.4 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ CCAAT

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των C/EBP αναγνωρίστηκε από τον McKnight *et al*, το 1988²¹⁵. Η μελέτη έδειξε δύο διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, ο ένας από τους οποίους ήταν προσδεμένος σε *cis*-ενεργά στοιχεία που περιέχουν ένα μοτίβο CCAAT, κοινό σε πολλούς υποκινητές της RNA πολυμεράσης II, ενώ ο άλλος ήταν προσδεμένος σε κύρια στοιχεία ενισχυτών του υποκινητή του SV40²¹⁶. Τρία χρόνια αργότερα ο Δρ.Cao οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι και οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες ήταν στην ουσία η ίδια πρωτεΐνη, που ονομάστηκε C/EBPα²¹⁷. Επόμενες μελέτες έφεραν στο φως πέντε νέα μέλη της οικογένειας, που όλα περιείχαν μία συντηρημένη περιοχή bZIP στο καρβόξυ-τελικό τους άκρο. Η ανακάλυψη των μεταγραφικών αυτών παραγόντων οδήγησε σε λειτουργικές μελέτες που ανέδειξαν τα μέλη της οικογένειας σε ρυθμιστές κυτταρικών διεργασιών όπως ανάπτυξη, διαφοροποίηση, μεταβολισμό, ανοσία και άλλες²¹⁸⁻²²³.

Υπάρχουν έξι μέλη στην οικογένεια των C/EBP, που προσδιορίστηκαν από την επιστημονική κοινότητα ως C/EBPα, C/EBPβ, C/EBPγ, C/EBPδ, C/EBPε και C/EBPζ. Επειδή ιστορικά χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ονόματα ο Πίνακας 1.8 συνοψίζει εναλλακτικές ονοματολογίες των μελών της οικογένειας των C/EBP.

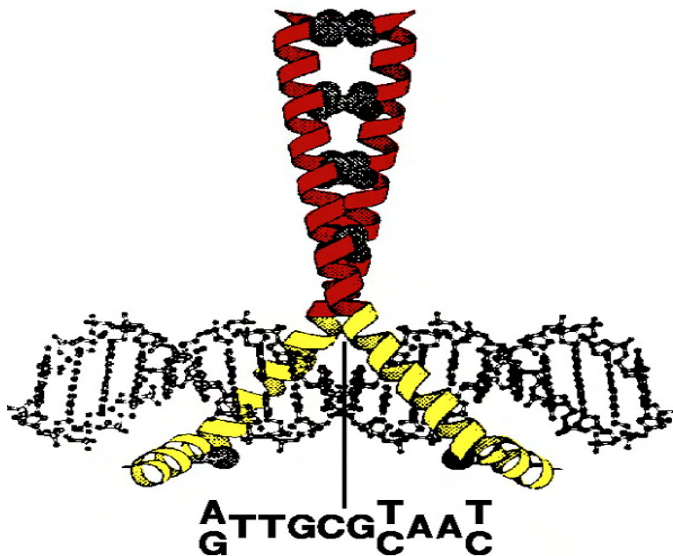
ΠΙΝΑΚΑΣ 1.8 : Εναλλακτικές ονομασίες μελών της οικογένειας C/EBP.

ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ	ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΝΑΚΑΛΥΦΘΗΚΕ
C/EBPα	C/EBP, R _c C/EBP-1	Landschulz <i>et al.</i> 1989 ²¹⁵
C/EBPβ	NF-IL6, IL-6DBP, LAP, CRP2, NF-M, AGP/EBP, ApC/EBP	Akira <i>et al.</i> 1990 ²¹⁸
C/EBPγ	Ig/EBP-1	Roman <i>et al.</i> 1990 ²²¹

C/EBPδ	NF-IL6β, CRP3, CELF, RαC/EBP2	Cao <i>et al.</i> 1991 ²¹⁸
C/EBPε	CRP-1	Williams <i>et al.</i> 1991 ²²²
C/EBPζ	CHOP-10, GADD153	Luethy <i>et al.</i> 1990 ²²⁴

1.3.4.A Δομικά χαρακτηριστικά των C/EBP

Το μόρφωμα πρόσδεσης στο DNA των μελών της οικογένειας bZIP είναι διμερές και αποτελείται από «φερμουάρ» λευκίνης και περιοχή πρόσδεσης στο DNA (ΕΙΚΟΝΑ 1.11). Η συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης των C/EBP έχει καθοριστεί ως **RTTGCGYAAΥ** (όπου **R=A** ή **G** και **Υ=C** ή **T**)²²⁵.



ΕΙΚΟΝΑ 1.11 Το διμερές μόριο της οικογένειας των παραγόντων C/EBP.

Όλες οι πρωτεΐνες C/EBP διαθέτουν μία περιοχή bZIP στο καρβοξυτελικό τους άκρο και μια αρνητική ή θετική ρυθμιστική περιοχή στο αμινοτελικό τους άκρο, με μόνη εξαίρεση τη πρωτεΐνη C/EBPγ. Το καρβοξυτελικό φερμουάρ λευκίνης αποτελείται από επτάδα λευκινών, που είναι κοινή δομή μεταξύ των δύο μονομερών του φερμουάρ. Τα δύο μέρη του φερμουάρ σχηματίζουν μία σπειροειδή δομή από α-έλικες. Οι ηλεκτροστατικές επιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων μαζί με τον διμερισμό θα προσδώσουν την ειδικότητα στον σχηματισμό του διμερούς στοιχείου. Έχει μεγάλη σημασία να τονιστεί, ότι ο διμερισμός είναι απαραίτητο κριτήριο για την πρόσδεση στο DNA. Στην πρόσδεση μεσολαβεί τάνυση είκοσι περίπου αμινοξέων, που βρίσκονται ακριβώς άνωθεν του φερμουάρ λευκίνης και υιοθετούν δομή α-έλικας. Επίσης, η ειδικότητα κάθε πρωτεΐνης C/EBP στο

DNA προσδιορίζεται από τρία αμινοξέα, που βρίσκονται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ πρωτεΐνης και DNA²²⁶⁻²²⁷. Η αλληλουχία μεταξύ βασικής περιοχής και περιοχής του φερμουάρ λευκίνης είναι αναγκαία για την πρόσδεση. Αλλαγές στην αλληλουχία οδηγούν σε ανικανότητα οιασδήποτε πρόσδεσης²²⁸. Σε αντίθεση με την συντηρητική περιοχή bZIP στο καρβοξυτελικό άκρο, το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών C/EBP εκτός από ιδιαίτερες περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί ως περιοχές ενεργοποίησης, εμφανίζει ομολογία μικρότερη του 20%^{229,230}. Ειδικότερα, οι περιοχές ενεργοποίησης αλληλεπιδρούν με διάφορα μέρη του βασικού μηχανισμού της μεταγραφής και διεγείρουν την μεταγραφική διαδικασία. Επιπλέον έχει προταθεί, ότι τα αμινοτελικά άκρα της οικογενείας των C/EBP περιέχουν αρνητικές ρυθμιστικές περιοχές, που σε μερικές περιπτώσεις ενδέχεται να είναι στόχος σουμουλίωσης²³¹⁻²³³.

1.3.4.B Όμοιο- και ετεροδιμερισμός C/EBP και αλληλεπιδράσεις με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες bZIP.

Ο αριθμός των μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν στοιχείο C/EBP διαφέρει σημαντικά σε διαφορετικούς ιστούς ή τύπους κυττάρων. Υπάρχει πλήθος παραγόντων που επιτρέπει την εμφάνιση και ποικιλότητα του φαινομένου αυτού στους διάφορους οργανισμούς. Αρχικά, το φαινόμενο αυτό παρατηρείται διότι κάποιες πρωτεΐνες C/EBP εμφανίζονται σε διάφορες ισομορφές, όπως στην περίπτωση του C/EBP α , C/EBP β και C/EBP ϵ . Η πρωτεΐνη C/EBP α μπορεί να υπάρχει σε δύο ισομορφές μεγέθους 42 και 30kDa, με την πρώτη να διαθέτει υψηλότερο δυναμικό ενεργότητας σε σχέση με την μικρότερη πρωτεΐνη των 30kDa^{234,235}. Παρομοίως, η C/EBP β μπορεί να υπάρχει σε τρεις διαφορετικές ισομορφές με μεγέθη 38kDa (LAP*-liver enriched transcriptional activation protein, ηπατική πρωτεΐνη εμπλουτισμένης μεταγραφικής ενεργότητας), 35kDa (LAP) και 20kDa (LIP-liver enriched inhibitory protein, ηπατική πρωτεΐνη εμπλουτισμένης περιοριστικής ενεργότητας). Η ισομορφή LAP διαθέτει την περιοχή bZIP, καθώς και περιοχές ενεργότητας, ενώ η ισομορφή LIP διαθέτει μόνο τη περιοχή bZIP^{236,237}. Η πρωτεΐνη C/EBP ϵ απαντά σε τέσσερις διαφορετικές ισομορφές (32kDa, 30kDa, 27kDa και 14kDa) με την πρωτεΐνη 32kDa να έχει μεγαλύτερο δυναμικό σε σχέση με την αντίστοιχη ισομορφή 30kDa, ενώ η μικρότερη ισομορφή μεγέθους 14kDa δεν διαθέτει περιοχή ενεργότητας²³⁸.

Επιπλέον, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες C/EBP πρέπει να διμεριστούν προκειμένου να ρυθμίσουν τη μεταγραφή του γονιδίου, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι μπορούν να σχηματίσουν ένδο-οικογενή διμερή όλων των πιθανών συνδυασμών. Ένα πλήθος συνδυασμών δημιουργείται μεταξύ των μελών της οικογενείας με διαφορετικές δυνατότητες πρόσδεσης DNA και μεταγραφικής ενεργότητας^{218-223,239}. Για παράδειγμα η C/EBP γ και η ισομορφή LIP της C/EBP β

δρουν μέσω έτερο-διμερισμού ως κυρίαρχοι-αρνητικοί αναστολείς της λειτουργίας των πρωτεΐνων C/EBP²⁴⁰⁻²⁴¹. Πράγματι, και οι δύο πρωτεΐνες C/EBP διαθέτουν μία λειτουργική περιοχή bZIP, που καθίστα ικανό τον έτερο-διμερισμό των δύο μορίων, ενώ είναι ελλιπείς στην ύπαρξη κάποιας *trans*-περιοχής ενεργότητας. Έτσι, έτερο-διμερή που αποτελούνται από τις δυο αυτές ισομορφές αν και προσδένονται σε κάποιον υποκινητή, δεν επιδρούν θετικά στη μεταγραφή του συγκεκριμένου γονιδίου. Παρόλα αυτά, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το αναφερόμενο έτερο-διμερές σε συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (C/EBPγ και LIP C/EBPβ) επιφέρει θετική ρύθμιση στη μεταγραφή ιντερλευκίνης 6 και 8²⁴².

Η πρωτεΐνη C/EBPζ διαθέτει δύο προλίνες στη βασική περιοχή του bZIP, οι οποίες καταλύουν την κανονική δομή α-έλικας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πρωτεΐνη C/EBPζ να διμερίζεται με επιτυχία με άλλες πρωτεΐνες της οικογενείας των C/EBP αφού διαθέτει ακέραια την περιοχή bZIP. Το σχηματιζόμενο διμερές δεν είναι ικανό να προσδεθεί στις αντίστοιχες θέσεις ενός υποκινητή²²³. Ωστόσο, έτερο-διμερή C/EBPζ/C/EBP προσδένονται σε μία εναλλακτική γενικά ομόλογη αλληλουχία [PuPuPuTGCAAT(A/C)CCC, όπου Pu είναι πουρίνη] υποκινητών γονιδίων, τα οποία ενεργοποιούνται κάτω από ορισμένες συνθήκες κυτταρικής δυσανεξίας. Έτσι, η πρωτεΐνη C/EBPζ μπορεί να δράσει θετικά ή αρνητικά στην μεταγραφή ενός γονιδίου, πάντα εξαρτημένη από την κατάσταση του κυττάρου²⁴⁵.

Η πρωτεΐνη C/EBPδ έτερο-διμερίζεται με τα μέλη C/EBPα και C/EBPβ^{217,246}. Η πρωτεΐνη C/EBPδ έχει παρόμοια ενεργότητα *trans* με τα παραπάνω μέλη. Επιπλέον, η πρωτεΐνη C/EBPε σχηματίζει έτερο-διμερή με τις πρωτεΐνες C/EBPδ και C/EBPε αντίστοιχα²⁴⁷.

Τέλος, μέλη της οικογένειας των C/EBP σχηματίζουν έτερο-διμερή με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που διαθέτουν περιοχή bZIP. Η ύπαρξη έτερο-διμερών μελών της οικογενείας των C/EBP και της οικογενείας των CREB/ATF έχει περιγραφεί σε διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα οι C/EBPγ και C/EBPε διμερίζονται με την πρωτεΐνη ATF4 και παράλληλα οι C/EBPα και C/EBPβ μπορούν να διμεριστούν με την πρωτεΐνη C/ATF^{249,250}. Έχει επίσης περιγραφεί έτερο-διμερισμός μεταξύ μελών C/EBP και μελών της οικογενείας Fos/Jun που περιέχουν περιοχή bZIP. Συγκεκριμένα ο διμερισμός της πρωτεΐνης C/EBPβ με τη πρωτεΐνη Fos ή Jun προσανατολίζει την πρόσδεση του διμερούς μορίου προς AP-1 *cis* περιοχή και όχι πάνω σε C/EBP *cis* περιοχή²⁵¹. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ C/EBPβ και c-Jun είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου TNF-α (tumor necrosis factor-α) σε κύτταρα μυελού²⁵².

1.3.4.Γ Αλληλεπιδράσεις C/EBP με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που δεν περιέχουν περιοχή bZIP.

Οι πρωτεΐνες C/EBP αλληλεπιδρούν με μεγάλο αριθμό μεταγραφικών παραγόντων που είναι ελλιπείς για την περιοχή bZIP. Για παράδειγμα η ομάδα του Tahirov έδειξε ότι το προϊόν του πρώτο-ογκογονιδίου *c-myb* (*c-Myb*) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη C/EBPβ διεγείροντας την μεταγραφική διαδικασία και επηρεάζοντας συνεπώς τον κυτταρικό κύκλο²⁵³. Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλιο ψευδαργύρου GATA-2 και GATA-3 φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες C/EBPα και β, αντίστοιχα²⁵⁴. Αυτή η συνεργασία μεταξύ των συγκεκριμένων μορίων είναι καίρια για την έμμεση καταστολή GATA κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων του λιπώδους ιστού. Τέλος, ο φυσικός συσχετισμός του όγκο-καταστολέα p53 με την πρωτεΐνη C/EBPβ είναι απαραίτητος για την αρνητική ρύθμιση της ενδοεπικοινωνίας μεταξύ των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων κατά την διαφοροποίηση των στρωματικών κυττάρων του ενδομητρίου²⁵⁵.

1.3.5 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPα

Το ανθρώπινο γονίδιο C/EBPα έχει μοναδικό αντίγραφο, δεν φέρει εσώνιο και βρίσκεται στη ζώνη q13.1 στο χρωμόσωμα 19²⁵⁶. Το πρότυπο έκφρασης του είναι παρόμοιο σε ιστούς και κυτταρικούς τύπους ανθρώπου και ποντικού, με μετρήσιμα επίπεδα σε ήπαρ, λιπώδη ιστό, λεπτό έντερο, πνεύμονες, επινεφρίδιο, μονοκύτταρα περιφερικά κύτταρα και πλακούντα^{217,222,257}. Στο ήπαρ και τον λιπώδη ιστό τα επίπεδα C/EBPα mRNA είναι ιδιαίτερα αυξημένα στα διαφοροποιημένα κύτταρα²⁵⁸. Πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου C/EBPα και η αυτορρύθμισή του είναι απαραίτητη για την εναρμόνιση της έκφρασής του²⁵⁹⁻²⁶¹. Πράγματι, η πρωτεΐνη C/EBPα και σε μικρότερο βαθμό η πρωτεΐνη C/EBPβ εμπλέκονται στην αυτορρύθμιση του γονιδίου C/EBPα του ποντικού. Ένας μηχανισμός έμμεσης αυτο-ενεργοποίησης προτάθηκε για την ρύθμιση του ανθρώπινου γονιδίου C/EBPα. Ο υποκινητής του ανθρώπινου γονιδίου C/EBPα σε αντίθεση με τον υποκινητή του γονιδίου C/EBPα στον ποντικό δεν περιέχει κανένα *cis* ενεργό στοιχείο C/EBP²⁶⁰. Αντίθετα, η πρωτεΐνη C/EBPα διεγείρει πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα USF στο αντίστοιχο *cis* ενεργό στοιχείο του υποκινητή C/EBPα και ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου. Έτσι, το ανθρώπινο C/EBPα ελέγχει έμμεσα την έκφρασή του μέσω πρόσληψης του μεταγραφικού παράγοντα USF. Θα πρέπει επιπλέον να επισημανθεί ότι το γονίδιο C/EBPα του *Xenopus laevis*, υπόκειται σε άμεση αυτορρύθμιση²⁶¹.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πρωτεΐνη C/EBPα υπάρχει σε δύο ισομορφές που παράγονται από ένα mRNA με μηχανισμό leaky ribosomal scanning. Το πλήρες μέγεθος της πρωτεΐνης είναι

42kDa. Ωστόσο, ένα μέρος των ριβοσωμάτων είναι ανίκανα να αναγνωρίσουν τα δυο πρώτα κωδικόνια AUG του mRNA και η μετάφραση αρχίζει από το τρίτο κωδικόνιο AUG, που βρίσκεται 352 νουκλεοτίδια κάτωθεν των κωδικών έναρξης. Έτσι, παράγεται πρωτεΐνη 30kDa, με ικανότητα διμερισμού που διαθέτει ακέραιη περιοχή πρόσδεσης DNA, αλλά φέρει μικρότερο αμινοτελικό άκρο σε σχέση με την αντίστοιχη πρωτεΐνη 42kDa^{234,235,262}.

1.3.6 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPβ

Τα ανθρώπινα γονίδια C/EBPβ και C/EBPα απαντούν στο χρωμόσωμα 20 μεταξύ των ζωνών q12 και q13.1 και στερούνται εσωνίου²⁵⁶. Η έκφραση του γονιδίου C/EBPβ είναι υψηλότερη στο ήπαρ, το έντερο, τους πνεύμονες το λιπώδη ιστό και οριακά ανιχνεύσιμη στους νεφρούς, την καρδιά και τον σπλήνα^{217,236, 258}.

Ο μεταγραφικός έλεγχος του γονιδίου C/EBPβ έχει περιγραφεί και ένας από τους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την ρύθμισή του είναι η πρωτεΐνη CREB²⁶³. Το C/EBPβ του ποντικού υπόκειται σε άμεση αυτορύθμιση κατά την διάρκεια της οξείας φάσης απόκρισης του οργανισμού²⁶⁴. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης C/EBPβ και μελών της οικογενείας CREB ή NF-κB ενισχύουν την αυτορύθμιση του γονιδίου C/EBPβ κατά την απόκριση του κυττάρου σε διάφορα ερεθίσματα²⁶⁵. Επίσης, περιγράφηκε αυτορύθμιση του γονιδίου και σε άλλους οργανισμούς όπως όρνιθες και *Xenopus laevis*^{266,267}. Ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 (signal transducers and activators of transcription-3) (μεταγωγός σήματος και ενεργοποίησης της 3-μεταγραφής) ρυθμίζει τη μεταγραφή του γονιδίου C/EBPβ κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε ερέθισμα ή στρες, μέσω ιντερλευκίνης 6²⁶⁸. Επίσης, η μεταγραφή του γονιδίου C/EBPβ στον άνθρωπο, ρυθμίζεται από ένα ενισχυτή, που βρίσκεται 3' κάτωθεν της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου²⁶⁹.

Η πρωτεΐνη C/EBPβ μεταφράζεται από ένα μοναδικό mRNA και έχει τρεις ισομορφές που παράγονται από εναλλακτικούς κωδικούς έναρξης. Η έναρξη της μετάφρασης στο πρώτο AUG, οδηγεί στην παραγωγή των αντίστοιχων ισομορφών LAP* και LAP, που περιέχουν τη περιοχή bZIP²⁷⁰. Η ισομορφή LIP μεταφράζεται από ένα τρίτο κωδικόνιο AUG στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και περιέχει μόνο τη περιοχή bZIP²³⁷. Επίσης, έχει περιγραφεί πρωτεολυτικό μάτισμα της ολικής πρωτεΐνης C/EBPβ, που ενδέχεται να παράγει και άλλες ισομορφές²⁷¹.

Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι το γονίδιο C/EBPβ ρυθμίζεται μετά-μεταγραφικά και μετά-μεταφραστικά. Πράγματι, η 5' περιοχή του mRNA του γονιδίου C/EBPβ έχει περιγραφεί να ρυθμίζει την μετάφραση της ισομορφής LIP, μέσω της δράσης πρωτεϊνών που προσδένουν στην αλληλουχία RNA. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες, η CUGBP-1 (πρωτεΐνη που προσδένεται σε

συνεχόμενα CUG κωδικόνια) αλληλεπιδρά ισχυρά με την 5' περιοχή του C/EBPβ mRNA. Η πρόσδεση της πρωτεΐνης CUGBP-1 πραγματοποιείται κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε ερέθισμα ή στρες, κατόπιν παρουσίας αυξημένης ποσότητας LPS σε ήπαρ ποντικού και ακολουθείται ισχυρή πρόσδεση της πρωτεΐνης σε λιπιδώματα. Μέσω του συγκεκριμένου μηχανισμού αυξάνει η παραγωγή της ισομορφής LIP που οδηγεί σε σημαντική μείωση της μεταγραφής του γονιδίου C/EBPα κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε ερέθισμα ή στρες²⁷². Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μετα-μεταφραστική ρύθμιση του γονιδίου C/EBPβ γίνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως φωσφορυλίωση, αυτο-φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση και ακετυλίωση²⁷³.

1.3.7 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPγ

Το γονίδιο C/EBPγ είναι μικρό σε μέγεθος, δεν διαθέτει εσώνια και το mRNA απαντά σε όλους τους ιστούς. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται σε μη-διαφοροποιημένα πρόδρομα κύτταρα. Η πρωτεΐνη C/EBPγ έχει μέγεθος 16.4kDa και διαθέτει ακέραια διμερή περιοχή πρόσδεσης στο DNA, αλλά δεν διαθέτει *trans*-ενεργή περιοχή²⁴⁵.

1.3.8 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPδ

Το γονίδιο C/EBPδ του ποντικού βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16²⁷⁴, ενώ το αντίστοιχο γονίδιο στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 8 και τη ζώνη q11²⁷⁵. Ο υποκινητής του γονιδίου του C/EBPδ διαθέτει σημεία πρόσδεσης ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως AP-2, USF, Sp1, STAT, NF-κB και CREB^{276,277}. Όπως, άλλα μέλη της οικογενείας των C/EBP, έτσι και το γονίδιο C/EBPδ δεν έχει εσώνιο²⁷⁸. Η έκφραση του γονιδίου C/EBPδ ανιχνεύτηκε στους πνεύμονες, το λιπώδη ιστό, το έντερο, τον σπλήνα και σε χαμηλότερα επίπεδα στο ήπαρ και τον εγκέφαλο^{218,278,279}.

Η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου C/EBPδ είναι αρκετά μελετημένη. Ο παράγοντας Runt (Runx-2) εμπλέκεται στην μεταγραφή του γονιδίου C/EBPδ στους οστεοβλάστες. Μεταλαγή του σημείου πρόσδεσης του Runx-2 στον υποκινητή του γονιδίου C/EBPδ στον αρουραίο έδειξε δραματική μείωση της ενεργότητας του υποκινητή²⁸⁰. Επιπλέον, πρόσφατα πειράματα σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη NF-κB κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου C/EBPδ^{281,282}.

1.3.9 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPε

Στον άνθρωπο το γονίδιο C/EBPε βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14q11.2 και διαθέτει δύο εσώνια, δύο εξώνια και πέντε εναρκτήριους κωδικούς AUG²⁸³. Οι ισομορφές του προέρχονται από συνδυασμό εναλλακτικών υποκινητών με διαφορετικό μάτισμα mRNA. Το γονίδιο C/EBPε εκφράζεται σε κύτταρα μυελού και λεμφικού συστήματος. Οι ισομορφές της πρωτεΐνης C/EBPε μεταφράζονται σε 4 τουλάχιστον πρωτεΐνες (32kDa, 30kDa, 27kDa και 14kDa), που διαθέτουν πανομοιότυπη περιοχή bZIP, αλλά διαφορετική trans ενεργή περιοχή^{284,285}. Η μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου C/EBPε ελέγχεται από δύο διαφορετικούς υποκινητές α και β ²⁸⁶. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένοι υποκινητές δεν διαθέτουν κουτί TATA, αλλά διαθέτουν πλήθος πολυ-πουρινών, καθοριστικών για την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας Ets²⁸⁷.

1.3.10 ΠΡΩΤΕΪΝΗ C/EBPζ

Κλωνοποιήθηκε εξ αρχής σε σειριακούς χρυσούς κρικετομύς (χάμστερ), σαν ένα γονίδιο που προκαλούσε ζημιά στο DNA και οδηγούσε σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Ονομάστηκε GADD153²⁸⁸ και εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 12q13.1-q13.2²⁸⁹. Το γονίδιο διαθέτει 4 εξώνια και εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου έδειξε ότι είναι σχετικά πλούσια σε γουανίνη και κυτοσίνη και συμπεριλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης πρωτεϊνών πρόσδεσης σε στοιχεία TATA και CAAT, έξι θέσεις πρόσδεσης SP-1, μία περιοχή αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα AP-1 καθώς και τέσσερις θέσεις πρόσδεσης ιντερλευκίνης 6²⁸⁹.

Η έκφραση του γονιδίου C/EBPζ επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, που έχουν σχέση με οξειδωτικό στρές, βλάβη στο DNA και φραγή της συνέχισης του κυτταρικού κύκλου. Η δράση του υποκινητή του γονιδίου C/EBPζ ενισχύεται σημαντικά από υπεριώδη ακτινοβολία και υπεροξειδάση υδρογόνου²²⁴. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου C/EBPζ, καθώς και τα επίπεδα mRNA του, επηρεάζονται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης²⁹⁰.

1.3.11 ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

Η πρωτεΐνη αλβουμίνη (στα λατινικά άλμπους σημαίνει λευκό) είναι μία πρωτεΐνη με μέτρια διαλυτότητα σε συμπυκνωμένα διαλύματα αλάτων. Όργανικά συστατικά που περιέχουν αλβουμίνη, όπως το ασπράδι των αυγών, αποκαλούνται αλβουμινοειδή. Η πρωτεΐνη αλβουμίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος. Προσδένει σε μόρια νερού, κατιόντα (όπως Ca^{2+} , Na^+ και K^+), λιπίδια, ορμόνες και η κύρια λειτουργία της είναι η ρύθμιση της οσμωτικής πίεσης του αίματος. Ο βιολογικός

ρόλος της α-αλβουμίνης (αφαμίνη) δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Ο πιο γνωστός τύπος αλβουμίνης είναι η αλβουμίνη του ορρού. Όπως υποδηλώνει και το όνομά της συναντάται πιο συχνά σε αίμα ή ορρό, αλλά και σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η αλβουμίνη παράγεται στο ήπαρ και αποτελεί το 60% των συνολικών πρωτεϊνών του πλάσματος⁹².

Η παθολόγος κατάσταση που χαρακτηρίζεται από χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης της αλβουμίνης στο πλάσμα (υποαλβουμιναιμία) μπορεί να προκληθεί από ηπατική βλάβη, νεφροτικό σύνδρομο, έγκαυμα, εντεροπάθεια, υποσιτισμό και καθυστερημένη εγκυμοσύνη. Αντίθετα, η παθολόγος κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση αλβουμίνης στο πλάσμα (υπεραλβουμιναιμία) προκαλείται από αφυδάτωση. Σε μερικές περιπτώσεις ανεπάρκειας ρετινόλης (βιταμίνη Α) τα επίπεδα αλβουμίνης ανεβαίνουν πάνω από τις φυσιολογικές τιμές. Η φυσιολογική τιμή αλβουμίνης κυμαίνεται μεταξύ 3,5 και 5 g/dL σε ανθρώπους άνω των τριών ετών. Σε ηλικίες κάτω των τριών ετών οι φυσιολογικές τιμές αλβουμίνης κυμαίνονται μεταξύ 2,5 και 5,5 g/dL⁹³. Σε ασθενείς που πάσχουν από ηπατική στεάτωση/ίνωση/κίρρωση, ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο από μόλυνση με ιό ηπατίτιδας Γ παρατηρείται υποαλβουμιναιμία²⁹¹.

1.3.12 A1- ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗ

Η πρωτεΐνη της α1-αντιτρυψίνης είναι μέλος των αναστολέων των πρωτεασών σερίνης, της υπεροικογένειας των σερπινών. Μέλη της υπεροικογένειας ελέγχουν πολλά μονοπάτια μηχανισμών φλεγμονής, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης τους με άλλες πρωτεάσες. Η πρωτεΐνη της α1-αντιτρυψίνης αναστέλει αρκετές πρωτεάσες σερίνης που εντοπίζονται στους πνεύμονες. Ο πρωταρχικός στόχος ανασταλτικής δράσης της α1-αντιτρυψίνης είναι το λεύκωμα ελαστάσης²⁹²⁻²⁹⁴. Το γονίδιο α1-αντιτρυψίνης εκφράζεται κυρίως στα ηπατοκύτταρα και η πρωτεΐνη εκκρίνεται στην κυκλοφορία. Μονοκύτταρα φαγοκύτταρα και εντεροκύτταρα εμφανίζουν ελάχιστη έκφραση πρωτεΐνης α1-αντιτρυψίνης²⁹⁵⁻²⁹⁷.

Θνησιγόνος μεταλλαγή στο γονίδιο της α1-αντιτρυψίνης, γνωστή και ως ανεπάρκεια της α1-αντιτρυψίνης, χαρακτηρίζεται από πολύ σοβαρή μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης στο πλάσμα. Η ανεπάρκεια της α1-αντιτρυψίνης συνδέεται με πνευμονικό εμφύσημα και ηπατική κίρρωση²⁹⁸⁻³⁰⁰.

Άμεσος συσχετισμός μόλυνσης με ιό ηπατίτιδας Γ και ανεπάρκειας α1-αντιτρυψίνης δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί. Έχει αναφερθεί ότι το ποσοστό μόλυνσης με ιό ηπατίτιδας Γ ήταν υψηλότερο σε ενήλικες που έπασχαν από ανεπάρκεια α1-αντιτρυψίνης³⁰¹. Αντίθετα, άλλη επιδημιολογική έρευνα δεν επιβεβαίωσε άμεσο συσχετισμό μεταξύ περιοδικότητας μόλυνσης με ιό ηπατίτιδας Γ και ανεπάρκειας α1-αντιτρυψίνης³⁰². Ανεξαρτήτως όλων αυτών, τα επίπεδα α1-αντιτρυψίνης είναι πολύ μειωμένα σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με κίρρωση ήπατος, από μόλυνση με ιό ηπατίτιδας Γ³⁰³.

1.3.13 ΑΠΟΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΗ Β

Η απολιποπρωτεΐνη Β (ΑpoB) είναι η κύρια απολιποπρωτεΐνη των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), που ευθύνεται για την μεταφορά χοληστερόλης στους ιστούς. Συνδέει τις LDL με υποδοχείς που εντοπίζονται σε κύτταρα διαφόρων ιστών του οργανισμού. Τα υψηλά επίπεδα απολιποπρωτεΐνης Β οδηγούν στην διαμόρφωση αθηρωματικών πλακών που προκαλούν αγγειακή ασθένεια (αθηροσκλήρωση) και κατ' επέκταση καρδιακή βλάβη, με άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό⁹¹. Βρέθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης της απολιποπρωτεΐνης Β είναι πολύ μειωμένα σε ασθενείς που μολύνθηκαν με ιό ηπατίτιδας Γ³⁰⁴. Επίσης οι γλυκοπρωτεΐνες E1 και E2 του ιού της ηπατίτιδας Γ χρησιμοποιούν την πρωτεϊνική σύνθεση της απολιποπρωτεΐνης Β στο σχηματισμό του ιϊκού φακέλου³⁰⁵.

1.3.14 ΕΨΙΔΙΝΗ

Η εψιδίνη είναι πεπτίδιο με αντιμικροβιακή δράση. Διαθέτει μεγάλο αριθμό κυστεϊνών συντίθεται στο ήπαρ και εκκρίνεται στο πλάσμα. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από τα επίπεδα σιδήρου, τη φλεγμονή και την υποξία και ελέγχει την ομοίωση σιδήρου στον οργανισμό. Η εψιδίνη εμπλέκεται σε πρωτογενείς και δευτερογενείς διαταραχές αύξησης της συγκέντρωσης σιδήρου, όπως θαλασσαιμίες και κληρονομική αιμοχρωμάτωση. Σε ασθενείς με χρόνια αναιμία, τα επίπεδα εψιδίνης αυξάνουν δραματικά⁹³.

Επιπλέον, η έκφραση εψιδίνης είναι σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί με ιό ηπατίτιδας Γ³⁰⁶. Τέλος, η παρουσία της καψιδιακής πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας Γ και ελεύθερων ριζών οξυγόνου μειώνουν την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της εψιδίνης, μέσω ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων C/EBPα και STAT3^{307,308}.

1.3.15 ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ 6

Το γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 είναι μέλος της οικογένειας των αλκοολικών αφυδρογονασών. Μέλη της οικογένειας μεταβολίζουν πλήθους οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων, όπως αιθανόλη, ρετινόλη, λοιπές αλειφατικές αλκοόλες, υδροξυστεροειδή και προϊόντα οξειδωσης λιπιδίων³⁰⁹⁻³¹¹. Η έκφραση του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 πραγματοποιείται στο στομάχι και το ήπαρ³¹². Στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή περιέχεται κωδική αλληλουχία για την αναγνώριση και πρόσδεση της στεροειδούς ορμόνης κορτιζόλης. Επιπλέον η αλληλουχία του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 εμφανίζει μεγάλη συντηρητικότητα (άνω του 60%) με τα άλλα μέλη των αλκοολικών αφυδρογονασών^{311,314,315}.

Μελέτες στον υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 έδειξαν την πρόσδεση ποικίλων μεταγραφικών παράγοντων που προσδίδουν την ηπατική ιστοειδικότητα του γονιδίου και ενισχύουν την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή. Επίσης πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες που προσδέονται στον υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6, ενεργοποιούνται στην οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού στο στρες (π.χ. υπάρχουν τρεις περιοχές πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP)^{313,316}. Τέλος, δεν έχει δημοσιευτεί καμία έρευνα σχετικά με πιθανή εμπλοκή της πρωτεΐνης της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 με κάποια από τις ιϊκές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ.

1.4 ΣΤΟΧΟΙ-ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Το 2001, τρία εργαστήρια, προσδιόρισαν ανεξάρτητα σύνθεση πολυπεπτιδίου 14-17kDa περίπου από εναλλακτικό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) που επικαλύπτει την κωδική αλληλουχία core κατά +1 νουκλεοτίδιο^{189,190,191}.

Γενικός στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανάλυση της λειτουργίας της κωδικής περιοχής core+1 του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Γ. Ειδικότερα, διερευνήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα, που περιελάμβαναν συνδιαμολύνσεις ηπατικών κυτταρικών σειρών με πλασμίδια που φέρουν τον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης και πλασμίδια που φέρουν τις ιϊκές πρωτεΐνες core, core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα ενδογενή επίπεδα mRNA: α) ηπατικών κυττάρων συνδιαμολυσμένων με πλασμίδια με τον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης και τις ιϊκές πρωτεΐνες core, core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ και β) βιοψιών ήπατος ασθενών μολυσμένων με τον ιό. Κατασκευάστηκαν πλασμίδια που έφεραν μεταλλαγμένα στελέχη του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, προκειμένου να αναγνωριστεί η περιοχή του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την επίδραση της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ στον υποκινητή. Προσδιορίστηκε με πειράματα χημικής κινητικής μετατόπισης και ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ο μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης.

Ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία με αυτή του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης, διερευνήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ στον υποκινητή άλλων ηπατικών γονιδίων, όπως της αλβουμίνης.

Επόμενος στόχος ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που να εκφράζουν ανεξάρτητα τις πρωτεΐνες core και core+1 στο ήπαρ, ώστε να συγκριθεί η ογκογόνος δράση και η

ρυθμιστική τους λειτουργία στα ηπατικά κύτταρα *in vivo*. Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος πλασμιδιακός φορέας για την σωστή ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε ηπατικό υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης του ποντικού. Στη συνέχεια ωάρια ιδρυτικών ποντικών C57/Bl6-CBA εμβολιάστηκαν με το διαγονίδιο core, ή core+1 και ακολούθησε έλεγχος της ενσωμάτωσής του στο γενετικό υλικό του ποντικού και μεταβίβασή του σε επόμενες γενιές, προκειμένου να δημιουργηθεί σταθερή διαγονιδιακή σειρά.

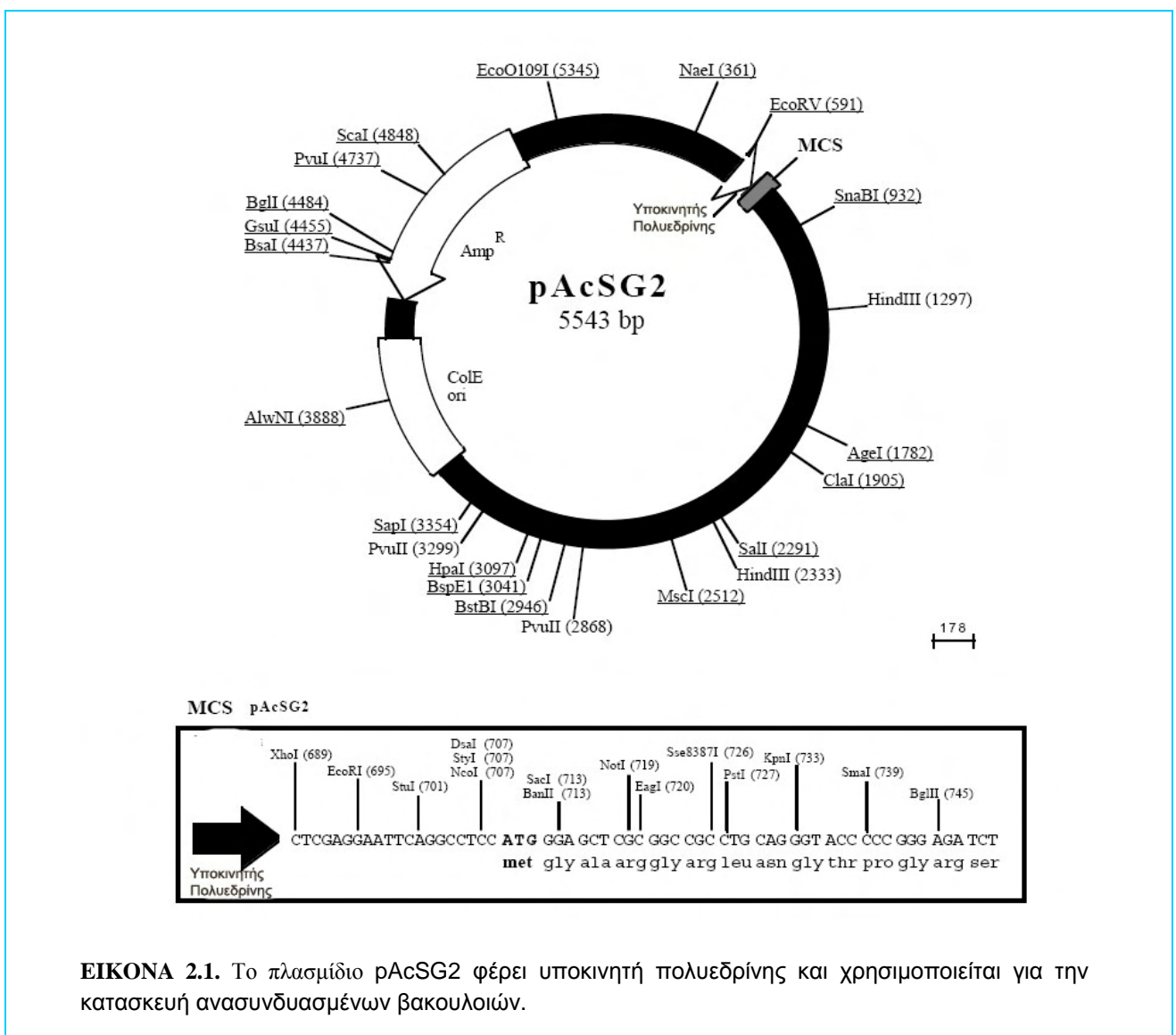
Τέλος στα πλαίσια διερεύνησης της επίδρασης της πρωτεΐνης core+1 σε υποκινητές ηπατικών γονιδίων και στην προσπάθεια κατασκευής συστημάτων μελέτης των ιικών πρωτεϊνών του ιού, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού με τον ευκαρυωτικό υποκινητή EF-1α για την παρασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που έφεραν κωδικές αλληλουχίες για την έκφραση πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ. Ο σκοπός της σειράς αυτής των

+ειραμάτων ήταν η σύγκριση της έκφρασης ενός ποσοτικοποιήσιμου εσωτερικού γονιδίου κάτω από τον έλεγχο των υποκινητών CMV ή EF-1α. Η διαπίστωση πιθανών διαφορών μεταγραφικής ενεργότητας των δύο υποκινητών θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στη μελέτη έκφρασης ενός γονιδίου σε διαφορετικά συστήματα *in vitro*.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

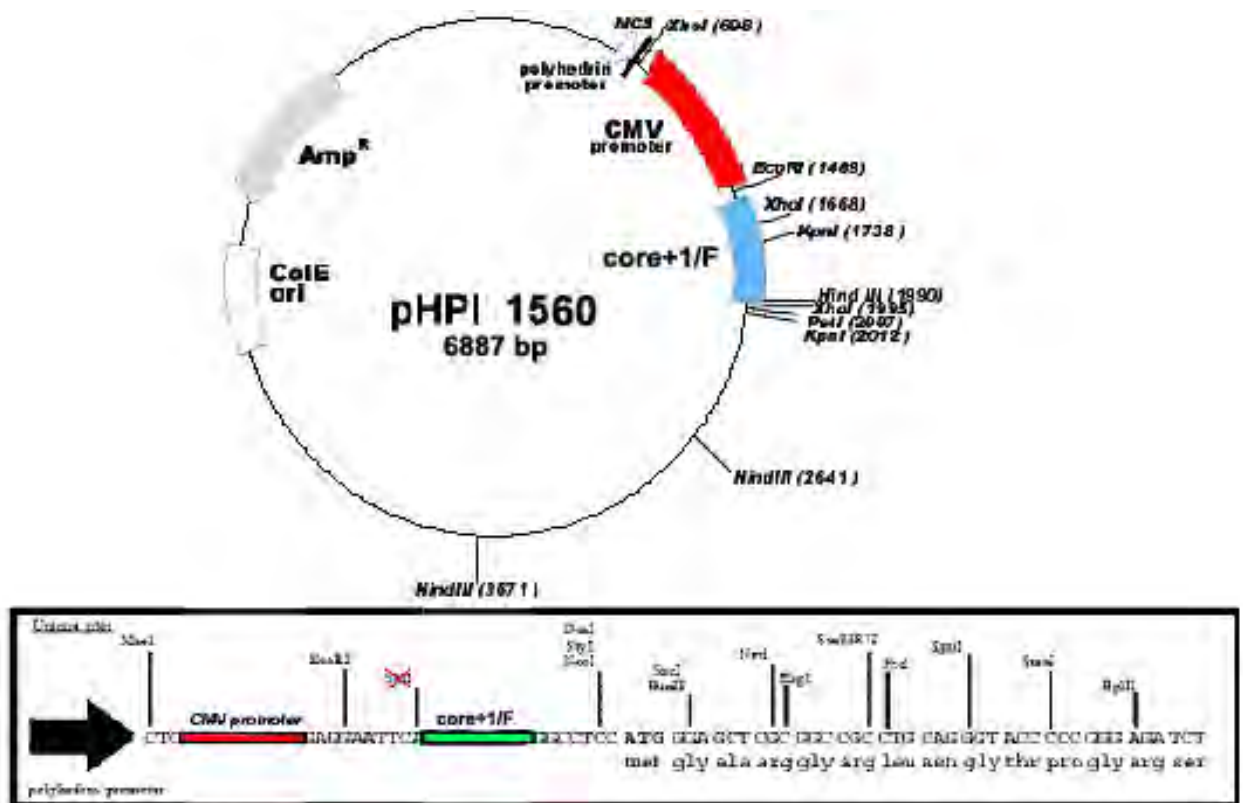
pAcSG2 (BD PharMingen): Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας προτιμάται για την έκφραση υψηλών επιπέδων πρωτεϊνών από τον υποκινητή της πολυεδρίνης του εντόμου *Autographa californica*. Ο συγκεκριμένος φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών. Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της πολυεδρίνης έχει αντικατασταθεί από τον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (MCS), που επιτρέπει την κλωνοποίηση αλληλουχιών. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες μπορούν πλέον, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, να μεταφερθούν στη θέση της πολυεδρίνης, στο DNA του βακουλοϊού. Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (ΕΙΚΟΝΑ 2.1).



ΕΙΚΟΝΑ 2.1. Το πλασμίδιο pAcSG2 φέρει υποκινητή πολυεδρίνης και χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών.

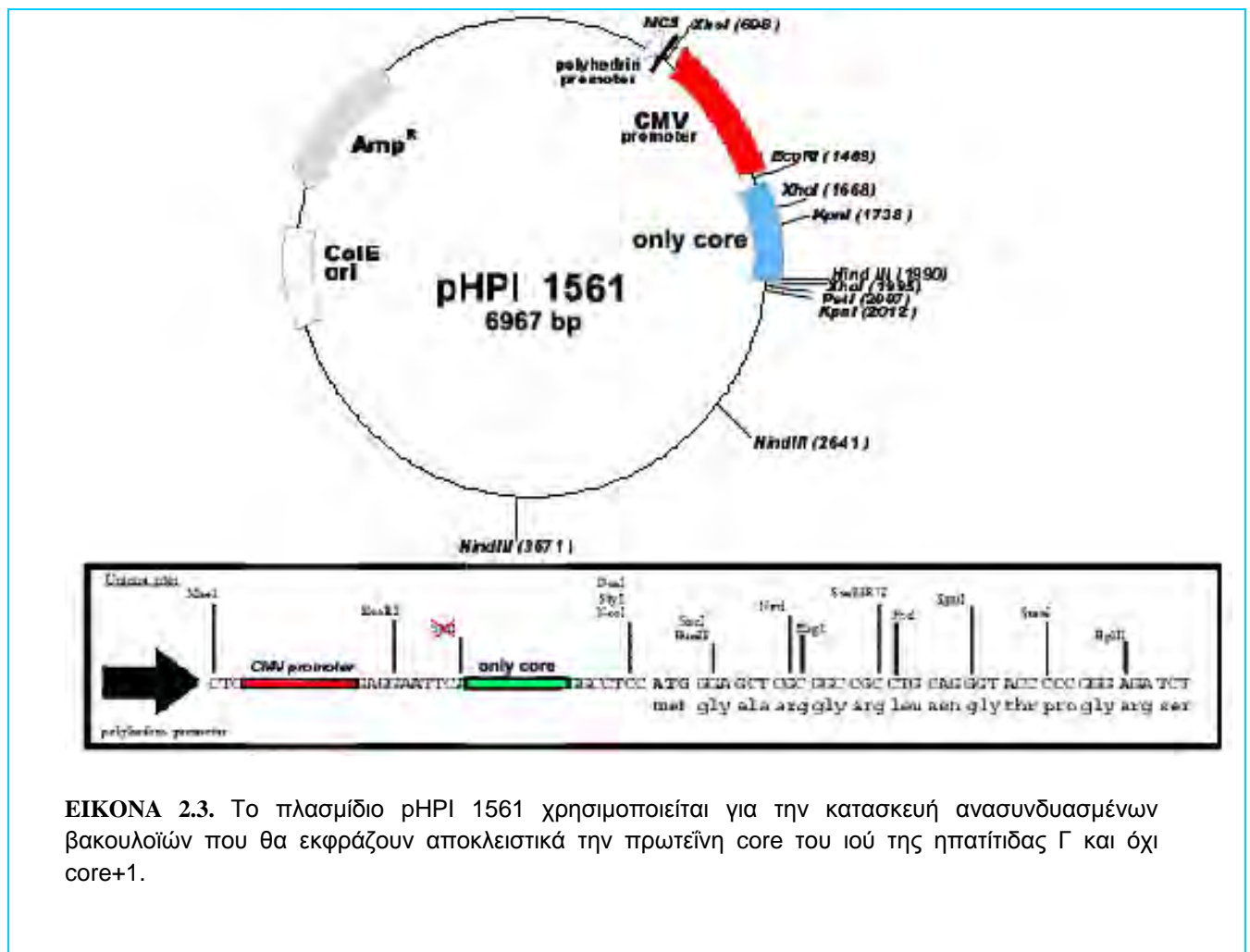
MTS-1 (Prof. Bernard Roizman, Chicago): Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας είναι μία παραλλαγή του αρχικού πλασμιδίου pAcSG2, κατα την οποία ανάμεσα απο τα ένζυμα περιορισμού XhoI και EcoRI του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, έχει κλωνοποιηθεί ο υποκινητής CMV. Ο συγκεκριμένος φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών και χάρη στον υποκινητή CMV το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε στην διαμόλυνση κυττάρων θηλαστικών. Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και είναι μια ευγενική δωρεά του Καθ. Bernard Roizman

pHPI 1560/ MTS-1 & core+1/F (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα MTS-1 και εκφράζει την πρωτεΐνη core+1/F του ιού της ηπατίτιδας Γ. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/F, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1493 (*NheI* & *NotI*). Ο κυκλικός πλασμιδιακός φορέας MTS-1 ευθυγραμμίστηκε με την ενδονουκλεάση περιορισμού *StuI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.2).



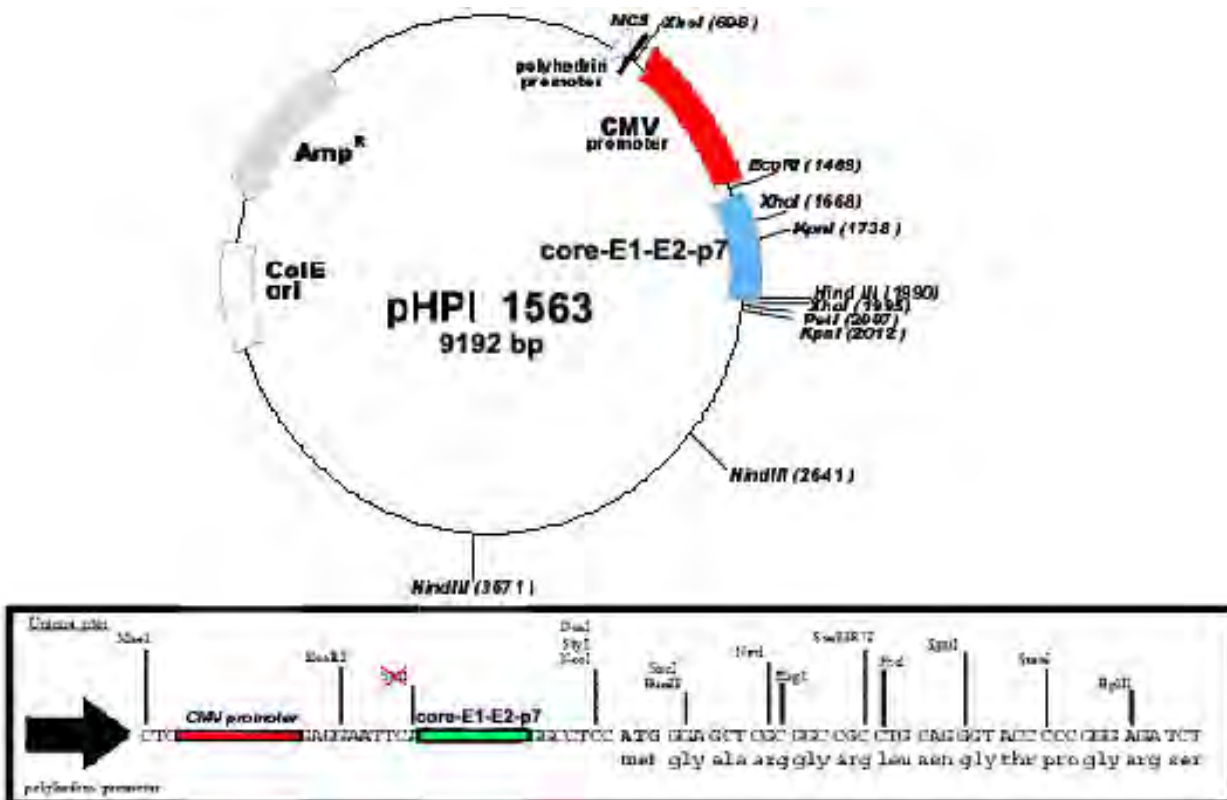
ΕΙΚΟΝΑ 2.2. Το πλασμίδιο pHPI 1560 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν την πρωτεΐνη core+1/F του ιού της ηπατίτιδας Γ.

ρΗΠΙ 1561/ MTS-1 & only core (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα MTS-1 και εκφράζει την πρωτεΐνη only core του του ιού της ηπατίτιδας Γ (δεν είναι δυνατή η έκφραση πρωτεΐνης core+1 αφού η αλληλουχία φέρει κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο αναγνώσης +1). Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης only core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα ρΗΠΙ 1500 (*Nde*I). Ο πλασμιδιακός φορέας MTS-1 ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *Stu*I (ΕΙΚΟΝΑ 2.3).



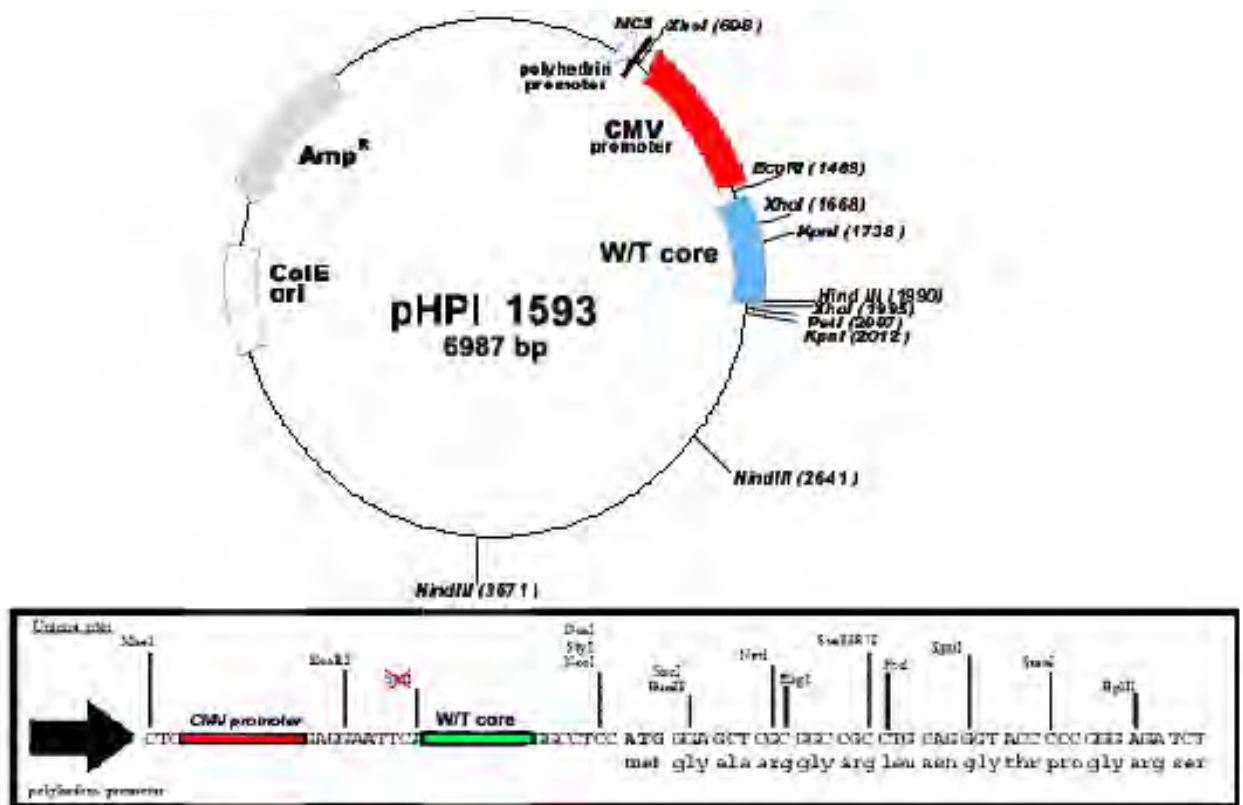
ΕΙΚΟΝΑ 2.3. Το πλασμίδιο ρΗΠΙ 1561 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν αποκλειστικά την πρωτεΐνη core του ιού της ηπατίτιδας Γ και όχι core+1.

pHPI 1563/MTS-1 & core-E1-E2-p7 (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα MTS-1 και εκφράζει τις δομικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ, core-E1-E2-p7. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση των δομικών πρωτεϊνών, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 771 (*StuI* & *NotI*). Ο πλασμιδιακός φορέας MTS-1 ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *StuI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.4).



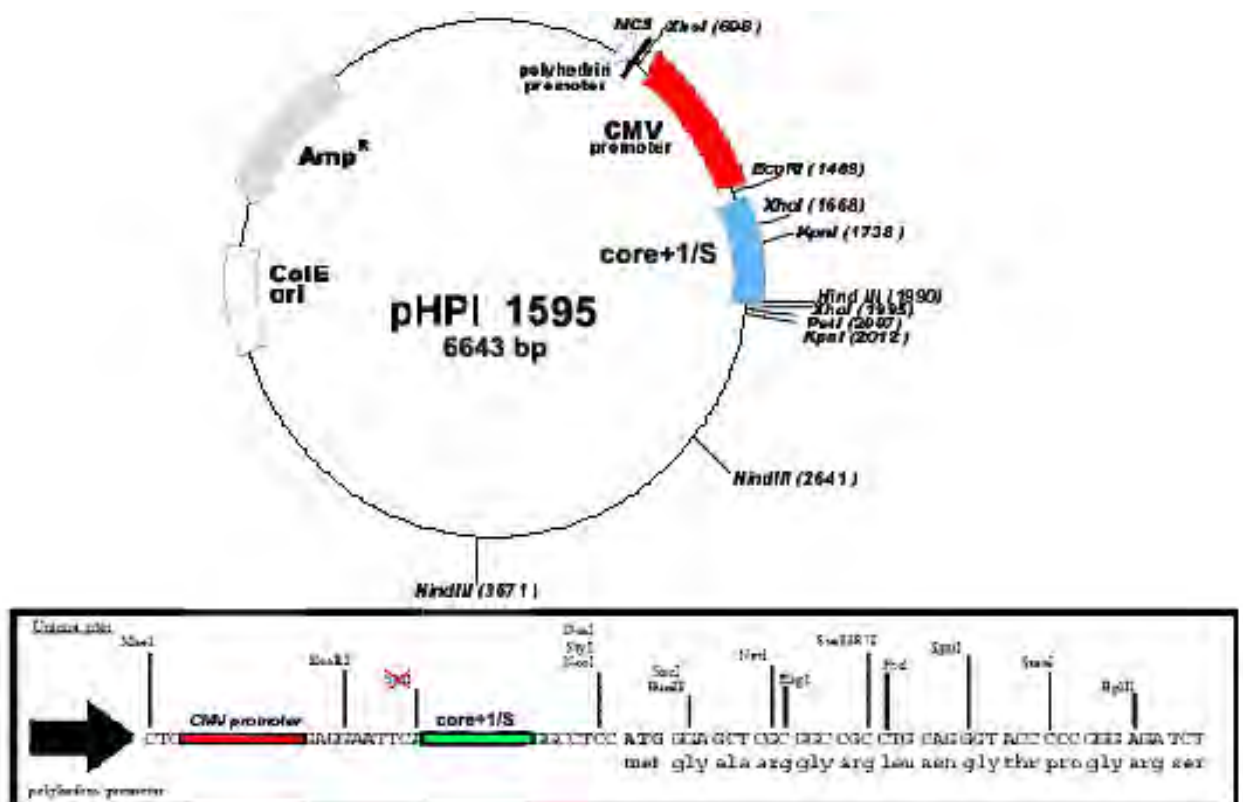
ΕΙΚΟΝΑ 2.4. Το πλασμίδιο pHPI 1563 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ.

pHPI 1593/ MTS-1 & W/Tcore (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα MTS-1 και εκφράζει την W/T core πρωτεΐνη του HCV-1a. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης W/T core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 773 (*EcoRI*). Ο πλασμιδιακός φορέας MTS-1 ευθυγραμμίστηκε μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού *StuI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.5).



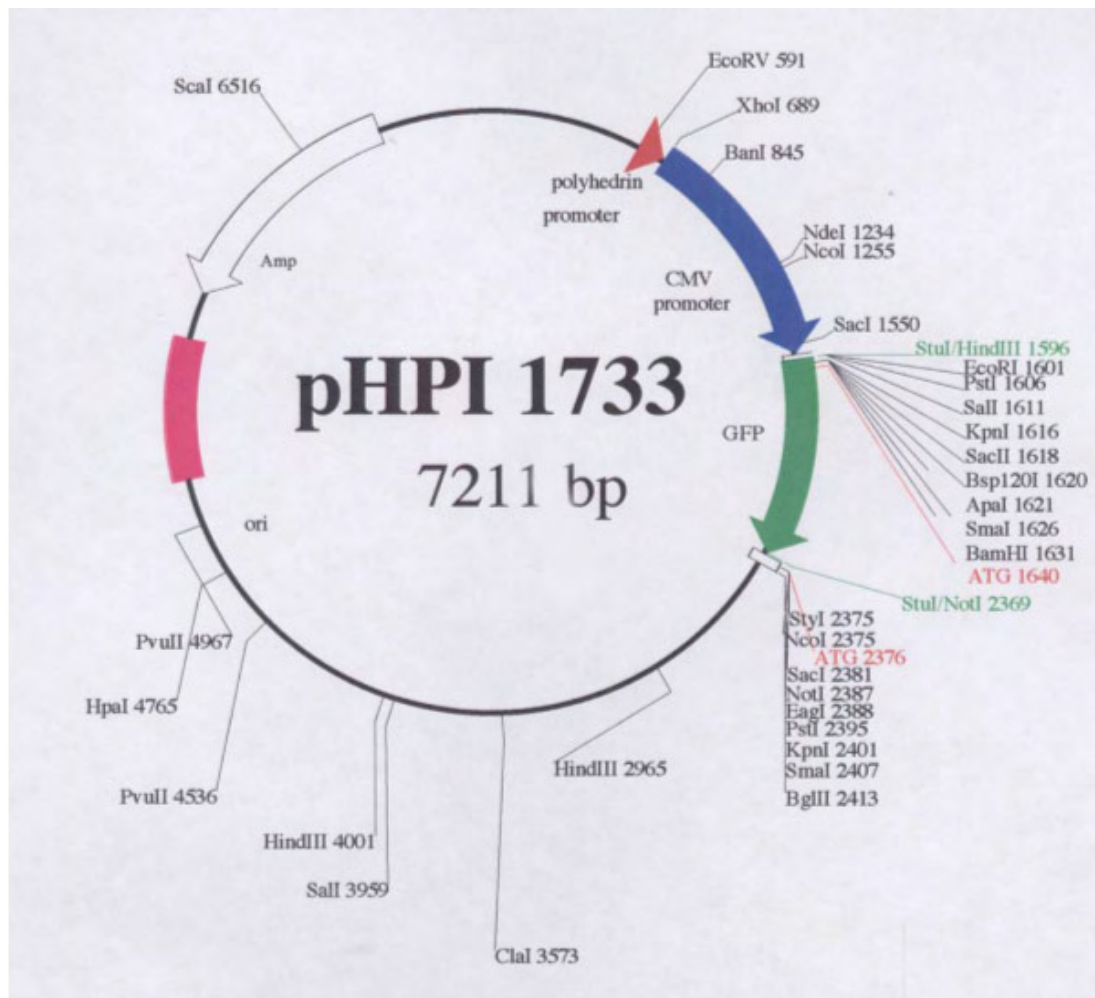
ΕΙΚΟΝΑ 2.5. Το πλασμίδιο pHPI 1593 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν την πρωτεΐνη W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ.

pHPI 1595/ MTS-1 & core+1/S (Πίσσας Γ.): Το πλασμιδίο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα MTS-1 και εκφράζει την πρωτεΐνη core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/S, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1580 (*NotI* & *NheI*). Ο πλασμιδιακός φορέας MTS-1 με ενδονουκλεάση περιορισμού *StuI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.6).



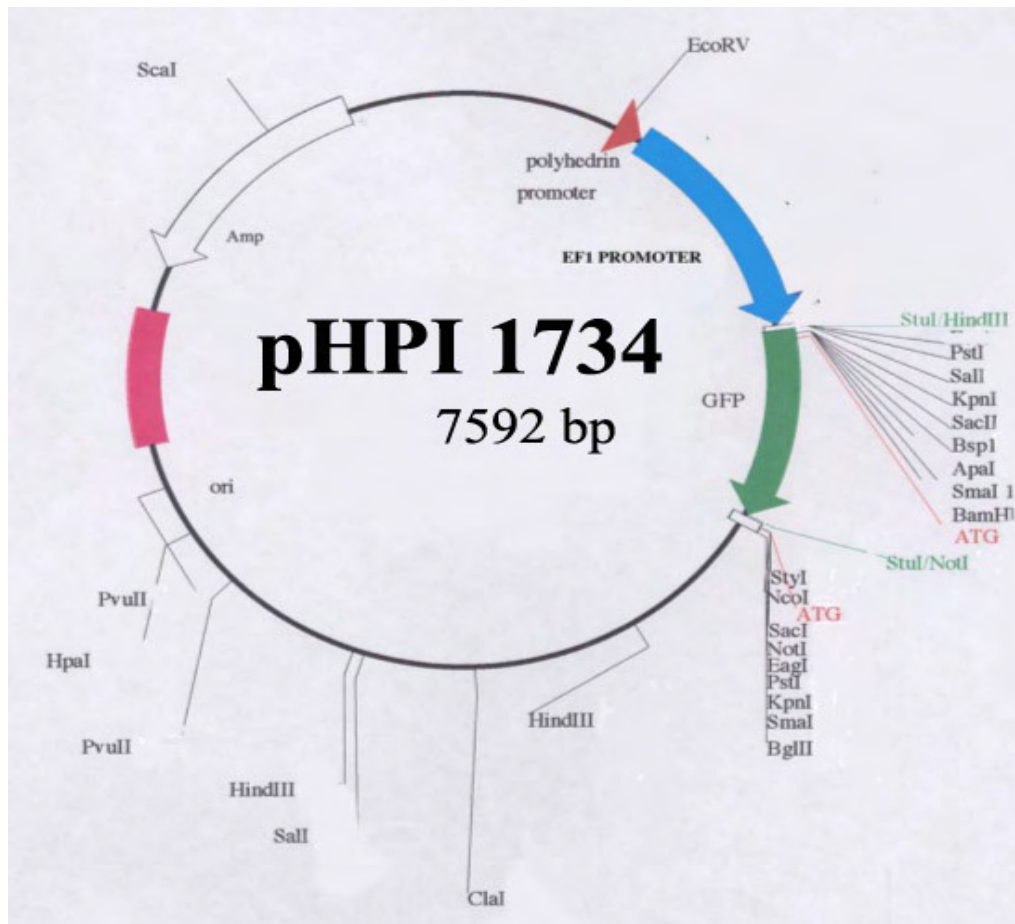
ΕΙΚΟΝΑ 2.6. Το πλασμιδίο pHPI 1595 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν την πρωτεΐνη core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ.

ρΗΠΙ 1733/ MTS-1 & GFP (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμδιακό φορέα MTS-1 και φέρει εσωτερικό γονίδιο αναφοράς της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP), κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CMV. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για το εσωτερικό γονίδιο αναφοράς απομονώθηκε από το πλασμίδιο ρEGFP-N3 (*HindIII* & *NotI*). Ο πλασμδιακός φορέας MTS-1 ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *StuI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.8).



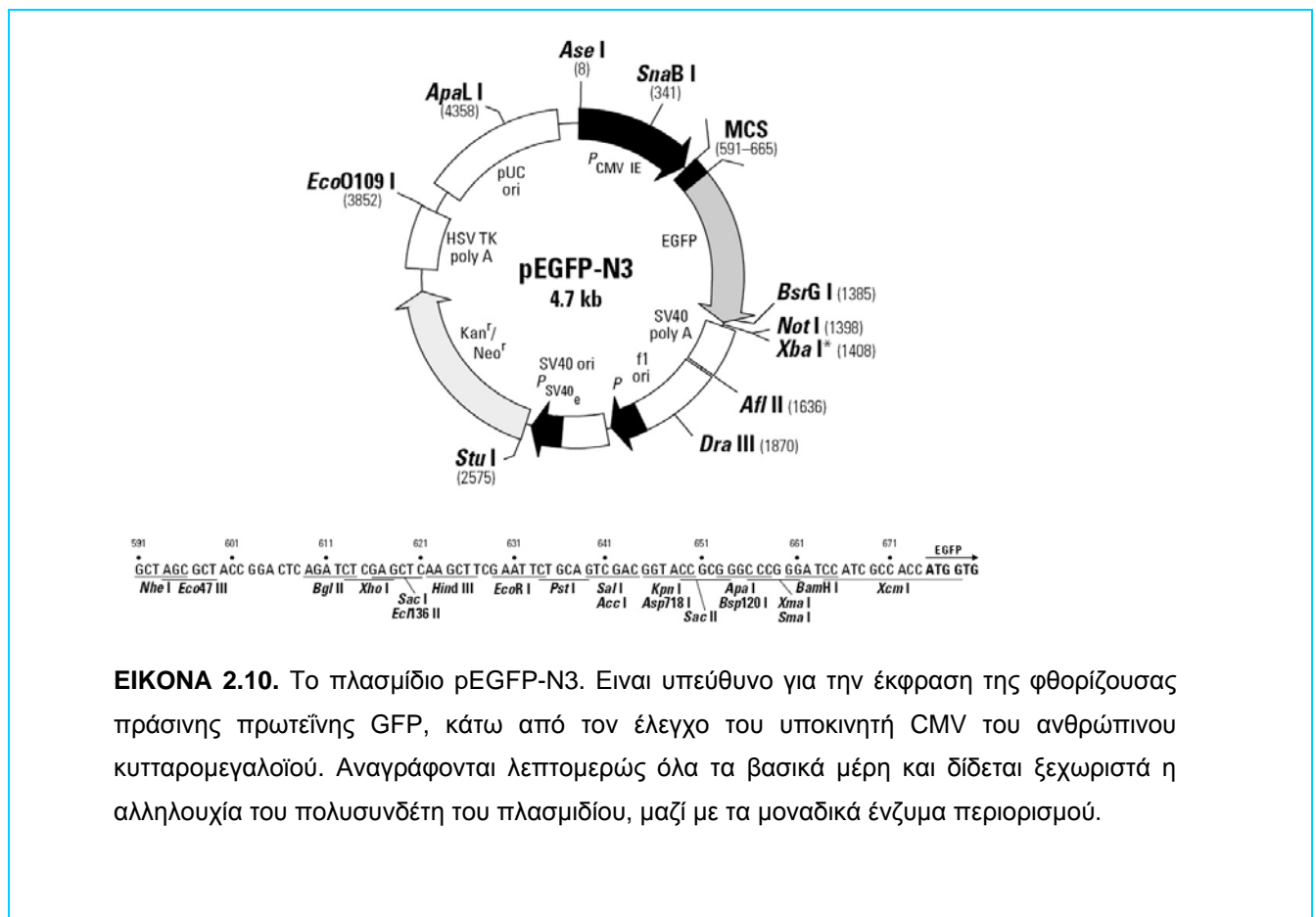
ΕΙΚΟΝΑ 2.8. Το πλασμίδιο ρΗΠΙ 1733 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν το εσωτερικό γονίδιο αναφοράς της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CVM.

ρΗΠΙ 1734/ MTS-1 –CMV+EF-1α&GFP (Κοχλιός Ε.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στο πλασμιδιακό φορέα ρΗΠΙ 1733 και φέρει διαγραφή του υποκινητή CMV. Ο υποκινητής CMV αφαιρέθηκε με ενζυμική πέψη (*XhoI* & *EcoRI*) και αντικαταστάθηκε από τον ευκαρυωτικό υποκινητή του Elongation Factor-1α (EF-1α). Ο υποκινητής του EF-1α απομονώθηκε από το πλασμίδιο ρΗΠΙ 8100 ο υποκινητής EF-1α έχει κλωνοποιηθεί σε ρGL3 Basic πατρικό όχημα) με ενζυμικήπέψη (*XbaI*) (ΕΙΚΟΝΑ 2.9).

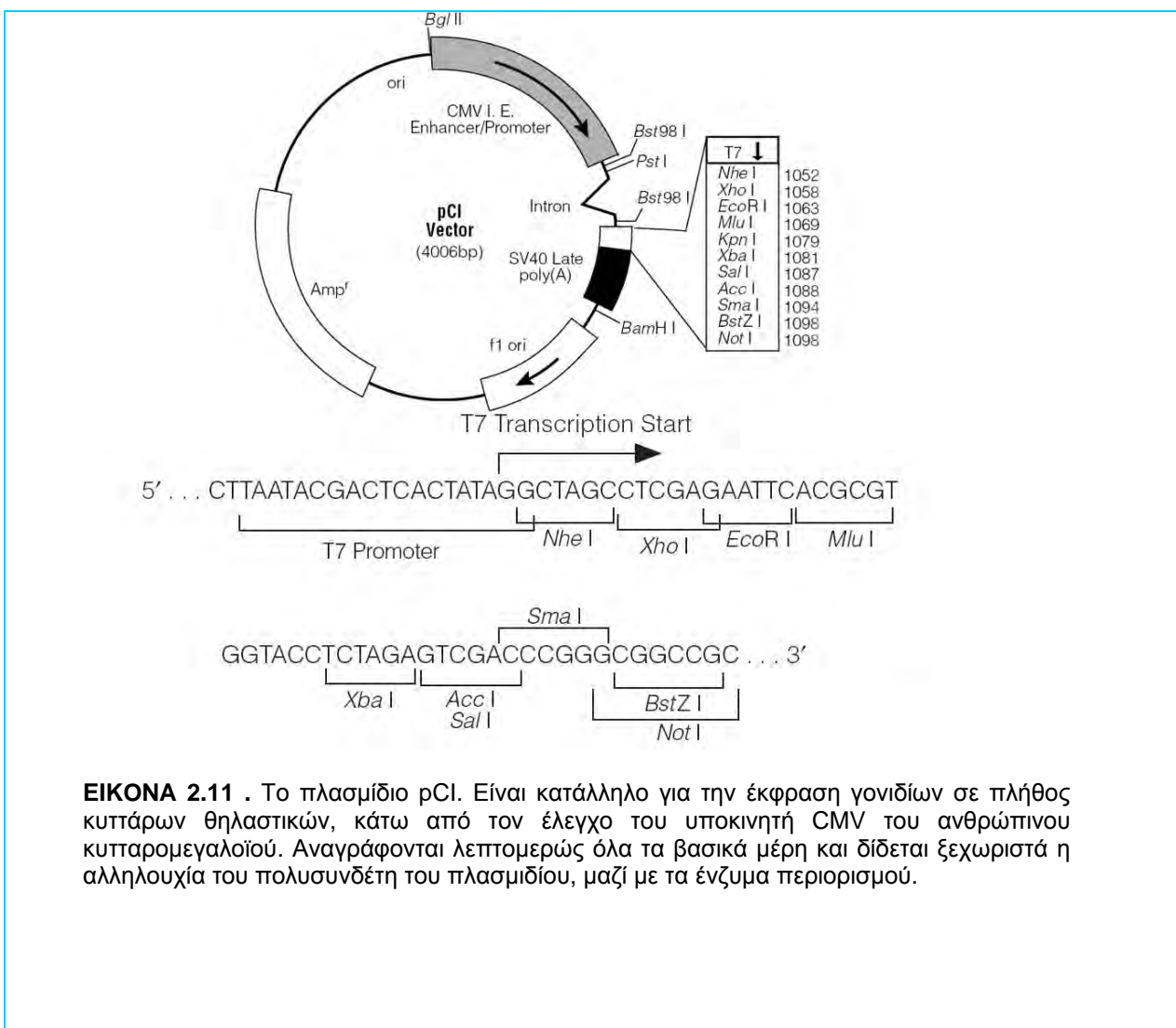


ΕΙΚΟΝΑ 2.9. Το πλασμίδιο ρΗΠΙ 1733 χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που θα εκφράζουν το εσωτερικό γονίδιο αναφοράς της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή EF-1α.

pEGFP-N3 (Clonetechn): Το εμπορικά διαθέσιμο πλασμίδιο pEGFP-N3 φέρει την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP. Σε αντίθεση με προηγούμενα στελέχη πλασμιδιακών φορέων που έφεραν την κωδική αλληλουχία για την έκφραση της φθορίζουσας πρωτεΐνης, το πλασμίδιο pEGFP-N3 φέρει ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, το GFPmut1, το οποίο περιέχει δύο μεταλλαγές Phe-64 σε Leu και Ser65 σε Thr. Οι μεταλλαγές προσδίδουν στο πλασμιδιακό προϊόν πιο έντονη φωτεινότητα της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP και επάγουν την έκφρασή της σε κύτταρα θηλαστικών. Η σύντηξη γονιδίων με το γονίδιο της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP για την παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται αρκετά εύκολα, μιας και ο πολυσυνδέτης του πλασμιδίου, περιέχει αλληλουχίες από πρόγονο πλασμιδιακό φορέα pUC. Η έκφραση της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης γίνεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού και το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (ΕΙΚΟΝΑ 2.10).

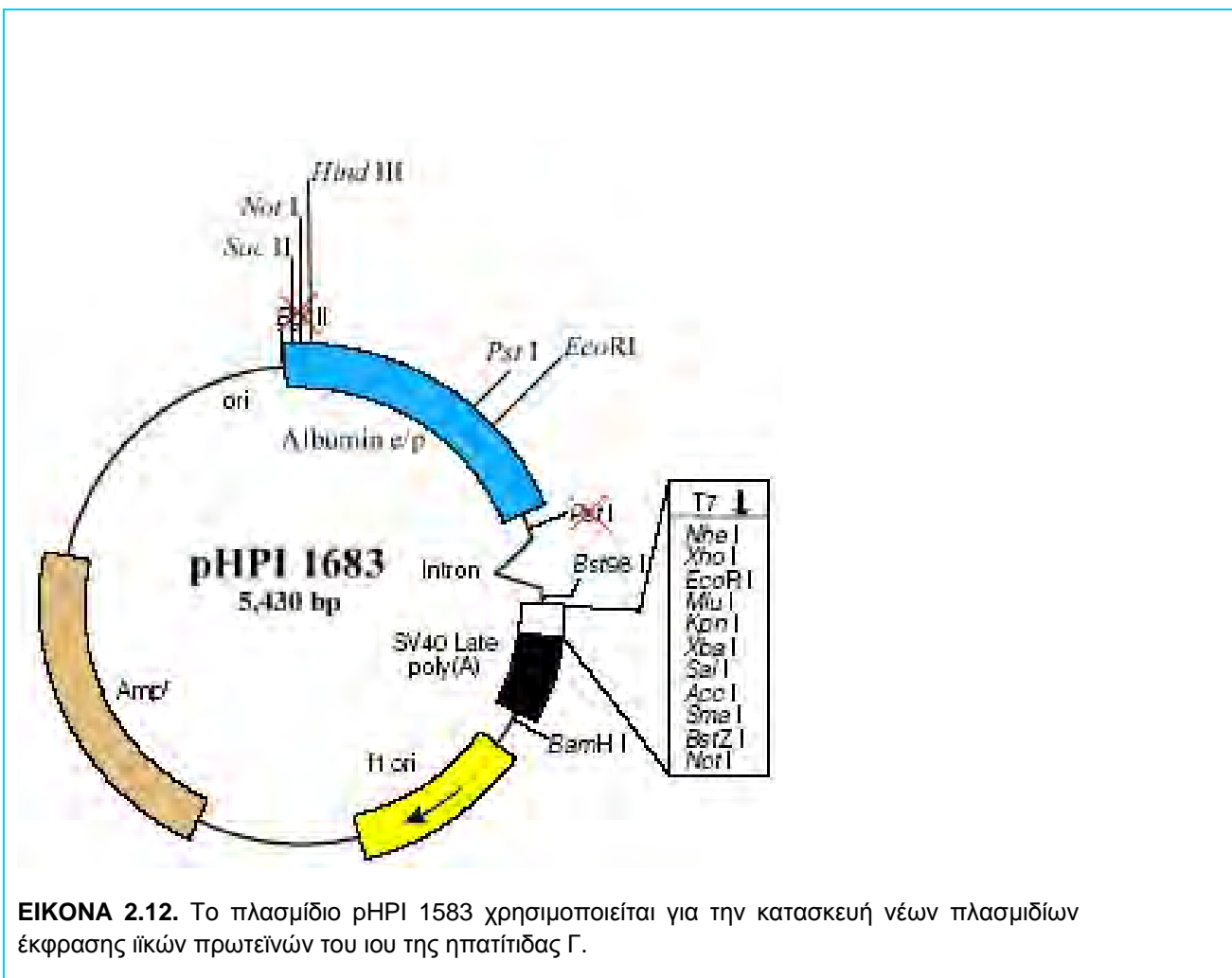


pCI (Promega): Το εμπορικά διαθέσιμο πλασμίδιο pCI είναι αρκετά δημοφιλές για την έκφραση μικρών ή μεγάλων πρωτεϊνών στα περισσότερα κύτταρα θηλαστικών. Η παρουσία εσώνιου του ανθρώπινου γονιδίου της β-σφαιρίνης, αμέσως μετά την αλληλουχία του υποκινητή, σταθεροποιεί το παραγόμενο RNA, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται υψηλή έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου. Επιπλέον η ύπαρξη του υποκινητή T7 αμέσως μετά το εσώνιο και πριν από τον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, επιτρέπει σύνθεση RNA μεταγράφων *in vitro* με T7 RNA πολυμεράση. Η έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου γίνεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή/ενισχυτή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού και το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (ΕΙΚΟΝΑ 2.11).

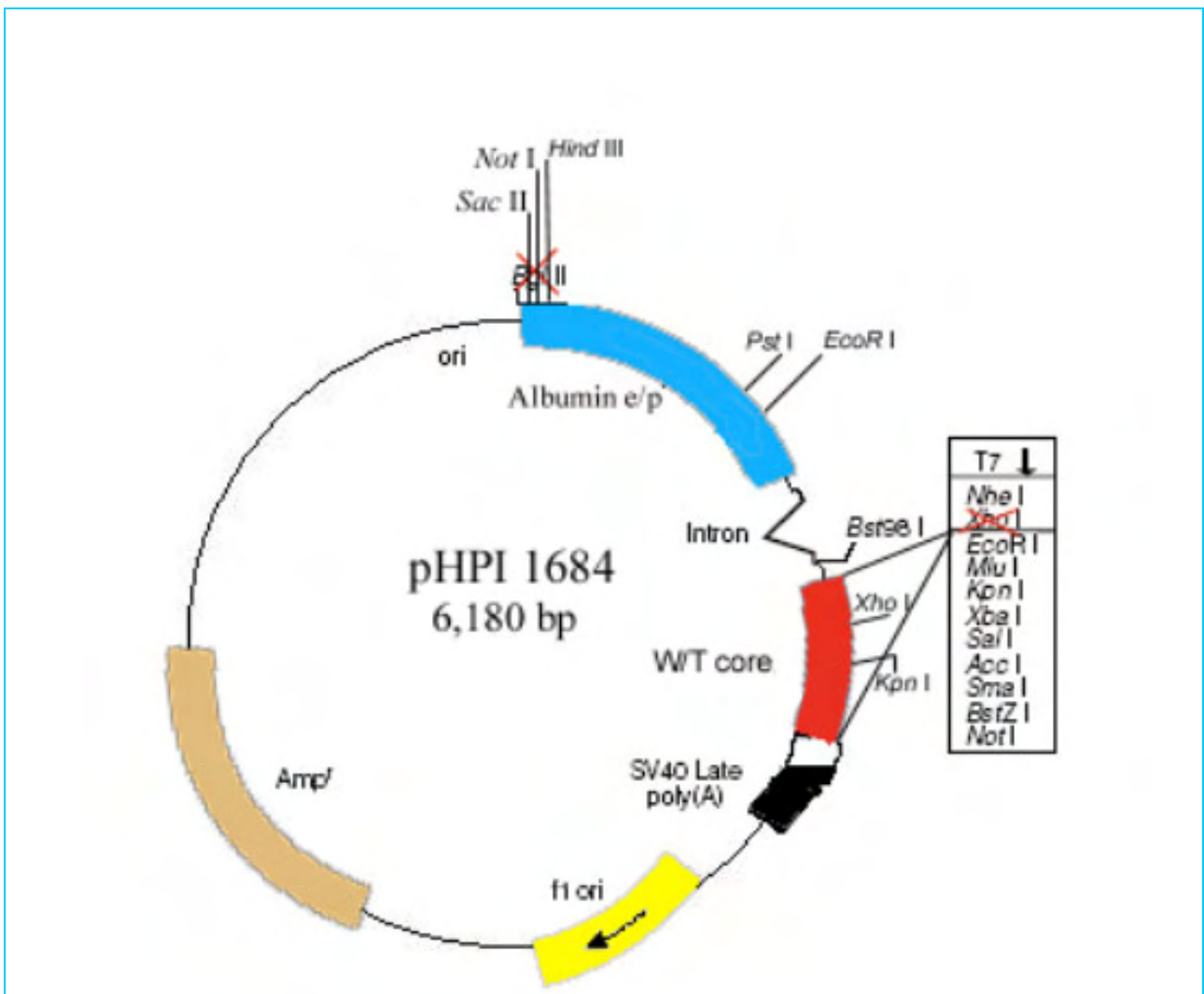


ΕΙΚΟΝΑ 2.11 . Το πλασμίδιο pCI. Είναι κατάλληλο για την έκφραση γονιδίων σε πλήθος κυττάρων θηλαστικών, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού. Αναγράφονται λεπτομερώς όλα τα βασικά μέρη και δίδεται ξεχωριστά η αλληλουχία του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, μαζί με τα ένζυμα περιορισμού.

pHPI 1683/ pCI – pCMV+ e/pAlb (Πίσσας Γ.): Προέρχεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCI με διαγραφή του υποκινητή CMV. Ο υποκινητής CMV αφαιρέθηκε με ενζυμική πέψη (*Bgl*I & *Pst*I) και αντικαταστάθηκε από τον υποκινητή/ενισχυτή της αλβουμίνης του C57/Bl6 ποντικού. Ο υποκινητής/ενισχυτής της αλβουμίνης απομονώθηκε από το πλασμίδιο *Albe/p* (μία ευγενική προσφορά του Δρ. Thorgeisson) με ενζυμική πέψη (*Sac*I & *Bam*HI). Το πλασμίδιο θα χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα για την υποκλωνοποίηση ιικών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ. Τα παραγόμενα πλασμίδια θα χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή διαγονιδιακών σειρών ποντικών για την μελέτη των ιικών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ (ΕΙΚΟΝΑ 2.12).

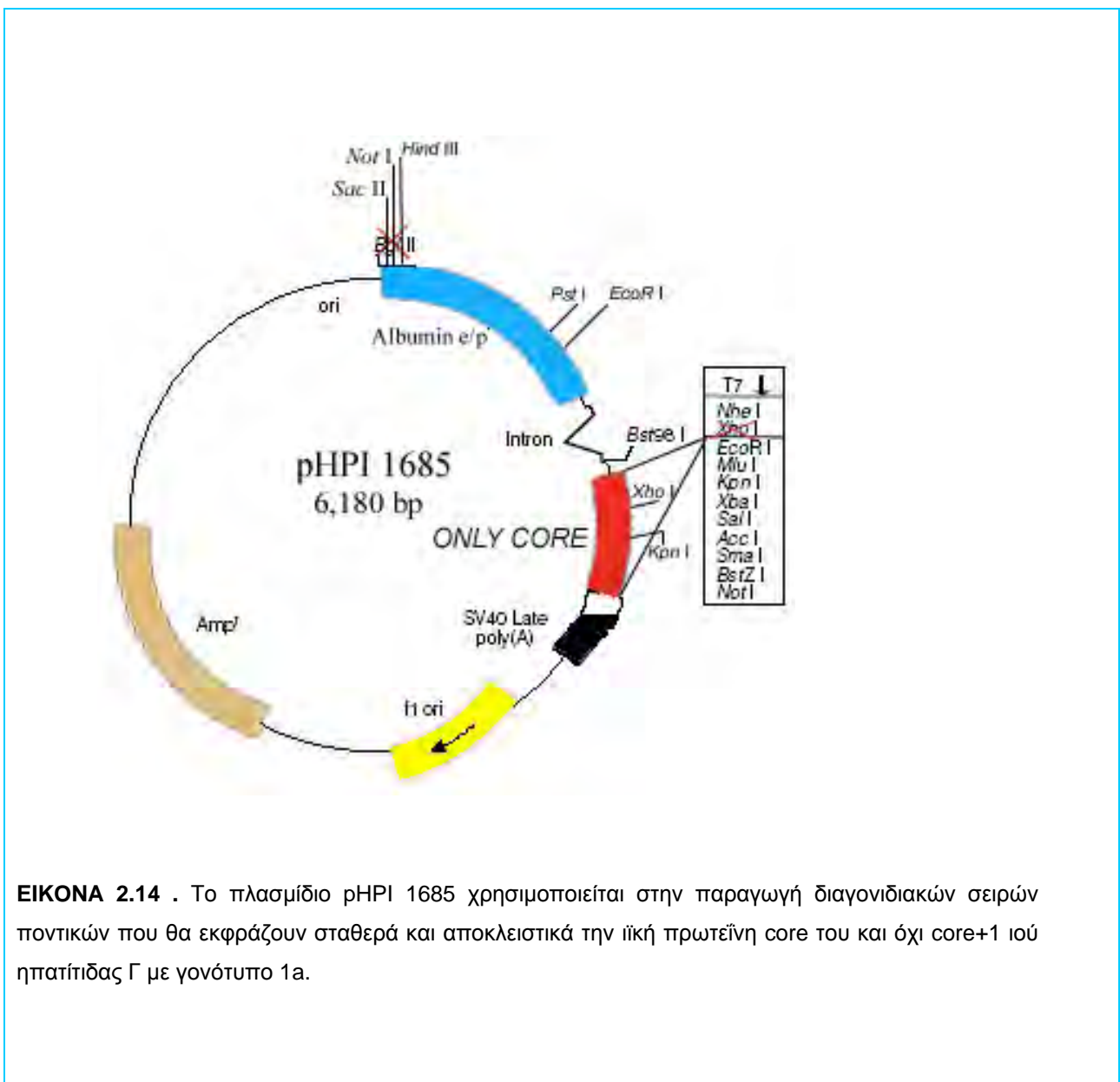


pHPI 1684/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη W/T core του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης W/T core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 773 (*EcoRI*). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *XhoI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.13).

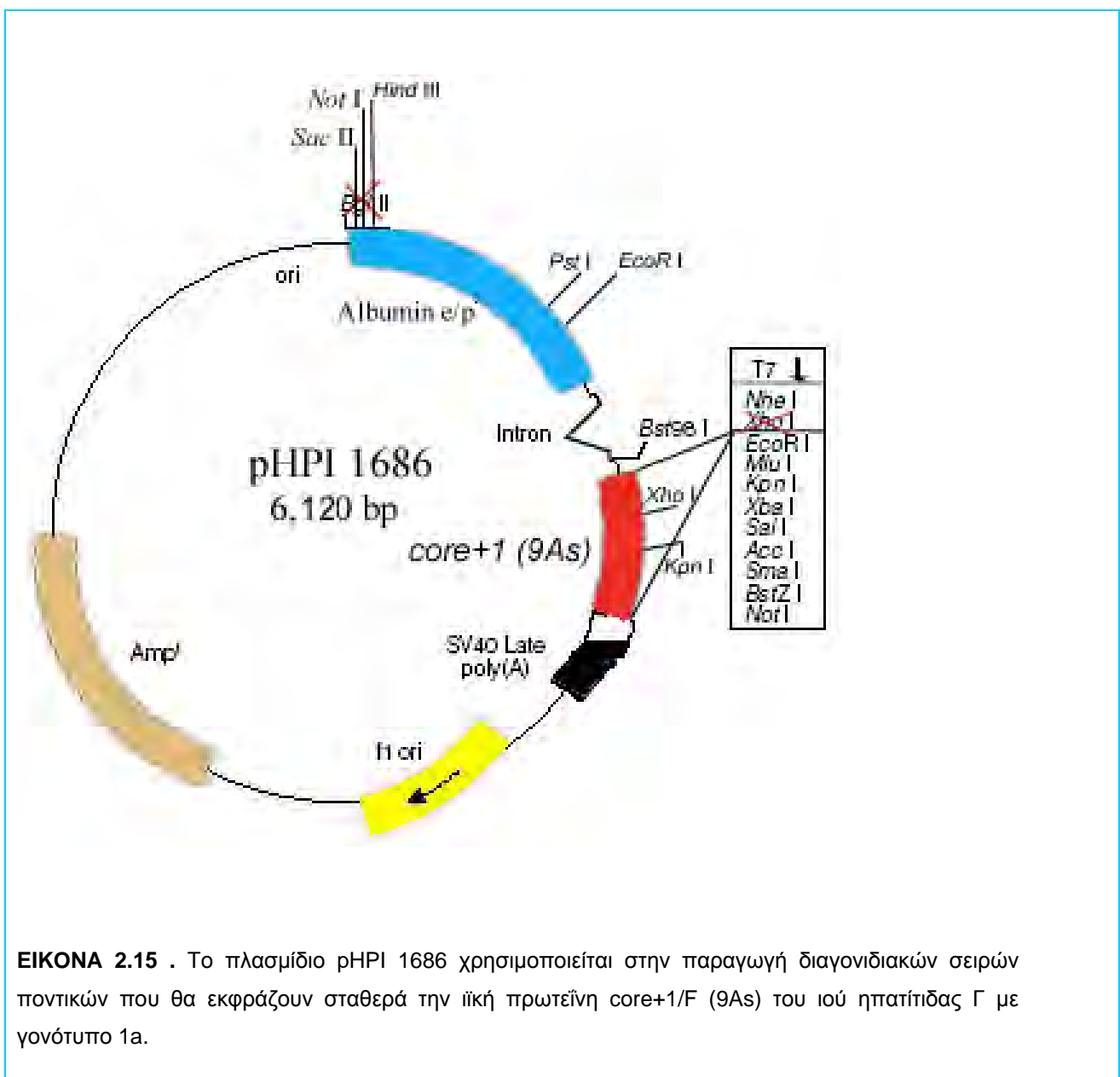


ΕΙΚΟΝΑ 2.13 . Το πλασμίδιο pHPI 1684 χρησιμοποιείται στην παραγωγή διαγονιδιακών σειρών ποντικών που θα εκφράζουν σταθερά την ιική πρωτεΐνη W/T core του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.

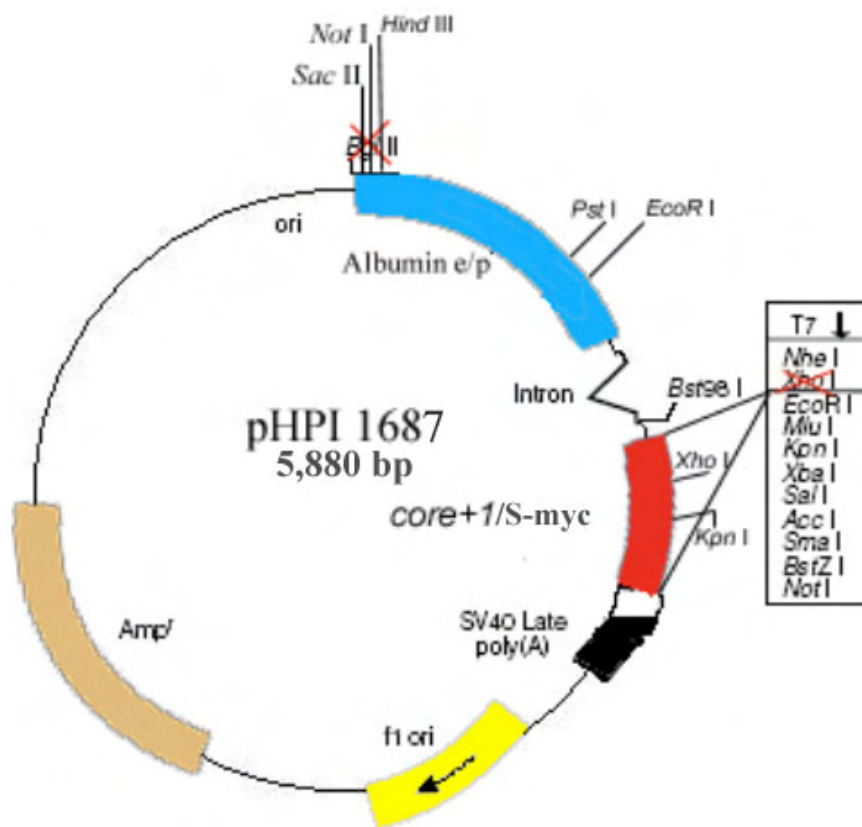
pHPI 1685/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ only core (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη only core του του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a (δεν είναι δυνατή η έκφραση πρωτεΐνης core+1, αφού η αλληλουχία φέρει κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης +1). Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης only core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1500 (*Nde*I). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε από με ενδονουκλεάση περιορισμού *Xho*I (ΕΙΚΟΝΑ 2.14).



pHPI 1686/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ core+1/F (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη core+1/F(9As) του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/F(9As), απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1493 (*NheI* & *NotI*). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *XhoI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.15).

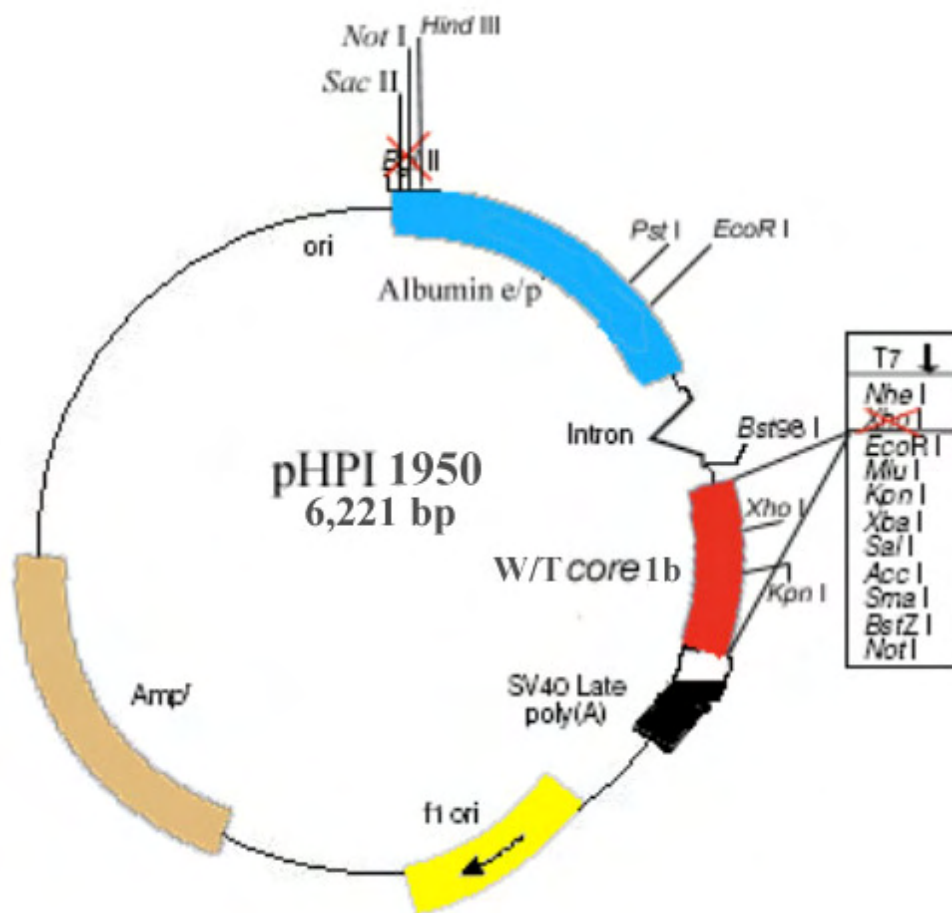


pHPI 1687/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ core+1/S-myc (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη core+1/S του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a, συζευγμένη με τον επίτοπο myc. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/S-myc, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1579 (*NotI* & *NheI*). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *XhoI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.16).



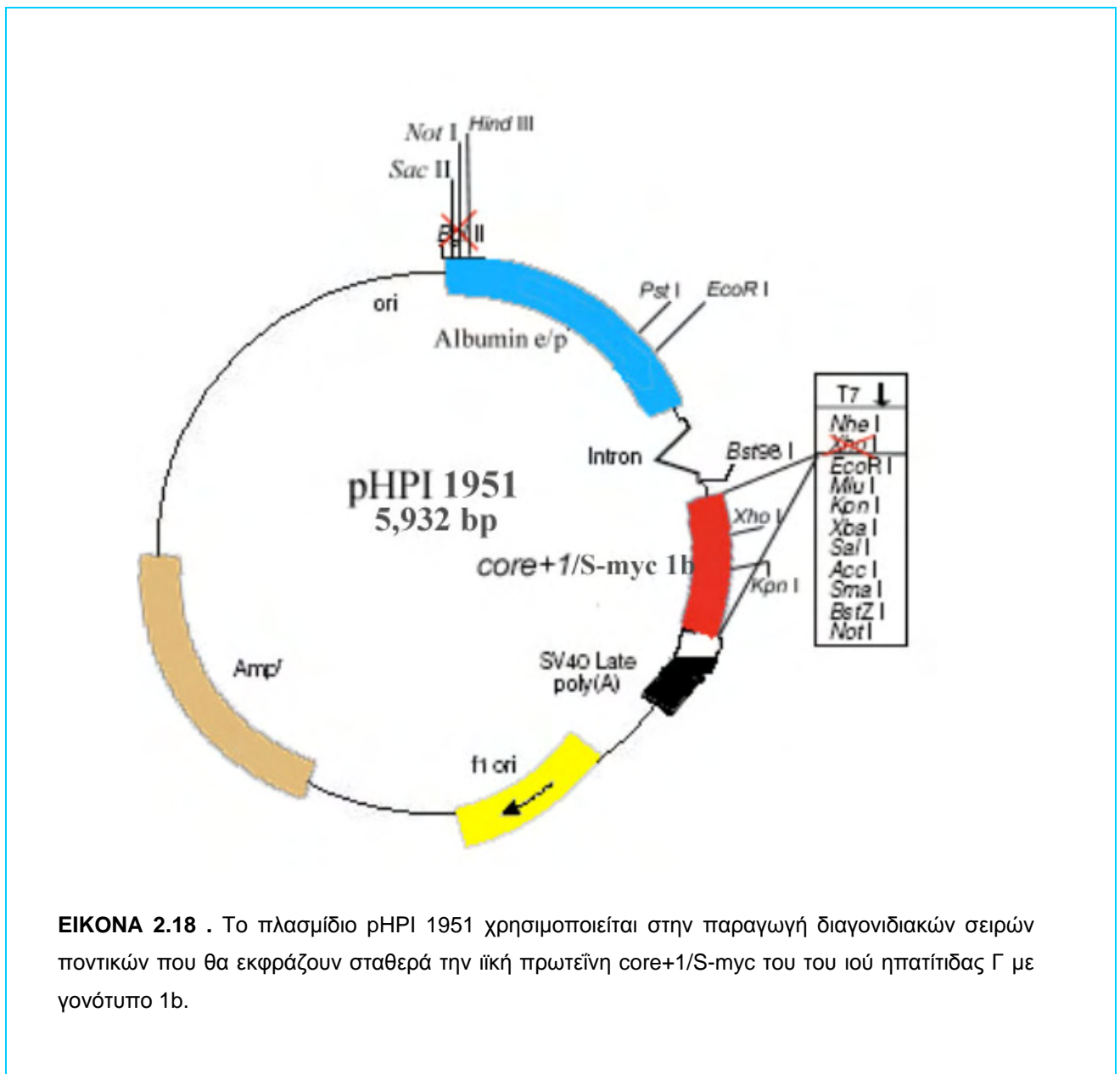
ΕΙΚΟΝΑ 2.16. Το πλασμίδιο pHPI 1687 χρησιμοποιείται στην παραγωγή διαγονιδιακών σειρών ποντικών που θα εκφράζουν σταθερά την ιική πρωτεΐνη core+1/S-myc του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.

pHPI 1950/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core 1b (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη W/T core του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης W/T core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα Core 1b BT (ευγενική προσφορά Δρ. Brechot) με ενζυμική πέψη (*EcoRI* & *XbaI*). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *XhoI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.17).

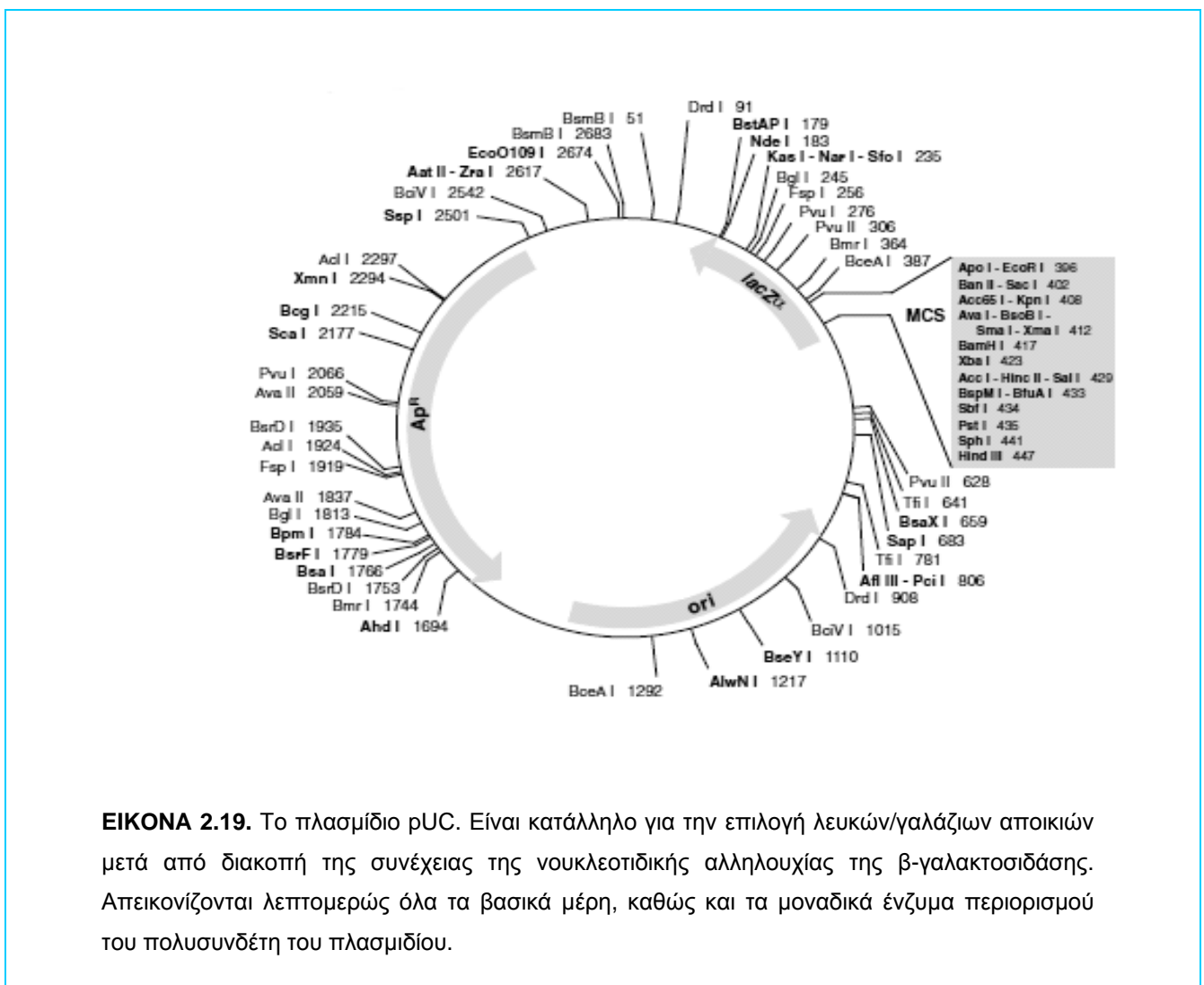


ΕΙΚΟΝΑ 2.17. Το πλασμίδιο pHPI 1950 χρησιμοποιείται στην παραγωγή διαγονιδιακών σειρών ποντικών που θα εκφράζουν σταθερά την ιϊκή πρωτεΐνη W/T core του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b.

pHPI 1951/ pCI – pCMV+ e/pAlb+ core+1/S-myc 1b (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683) και εκφράζει την πρωτεΐνη core+1/S του του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b, συζευγμένη με τον επίτοπο myc. Το τμήμα DNA που είναι υπεύθυνο για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/S 1b-myc, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα pHPI 1819 με ενζυμική πέψη (*PmeI* & *SmaI*). Ο πλασμιδιακός φορέας pCI – pCMV+ e/pAlb ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάση περιορισμού *XhoI* (ΕΙΚΟΝΑ 2.18).

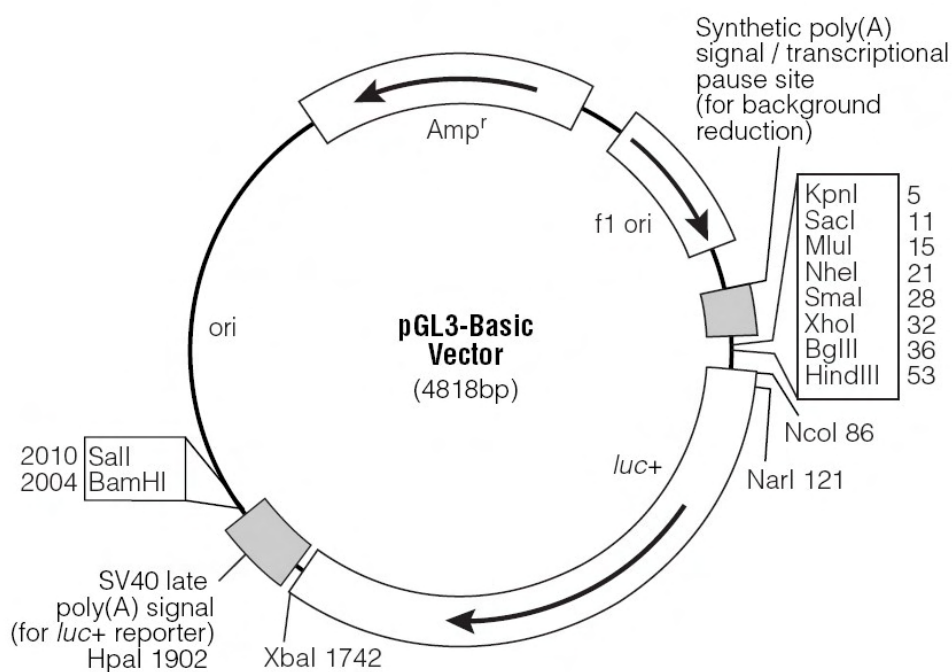


pUC19 (New England Biolabs): Χρησιμοποιήθηκε σαν ενδιάμεσος πλασμιδιακός φορέας για την υποκλωνοποίηση γονιδιακών προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Κατα την κλωνοποίηση ενός γονιδίου στο pUC 19 πλασμίδιο υπάρχει η δυνατότητα επιλογής λευκών/γαλάζιων αποικιών μετά από διακοπή της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της β-γαλακτοσιδάσης από την είσοδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου (ΕΙΚΟΝΑ 2.19).



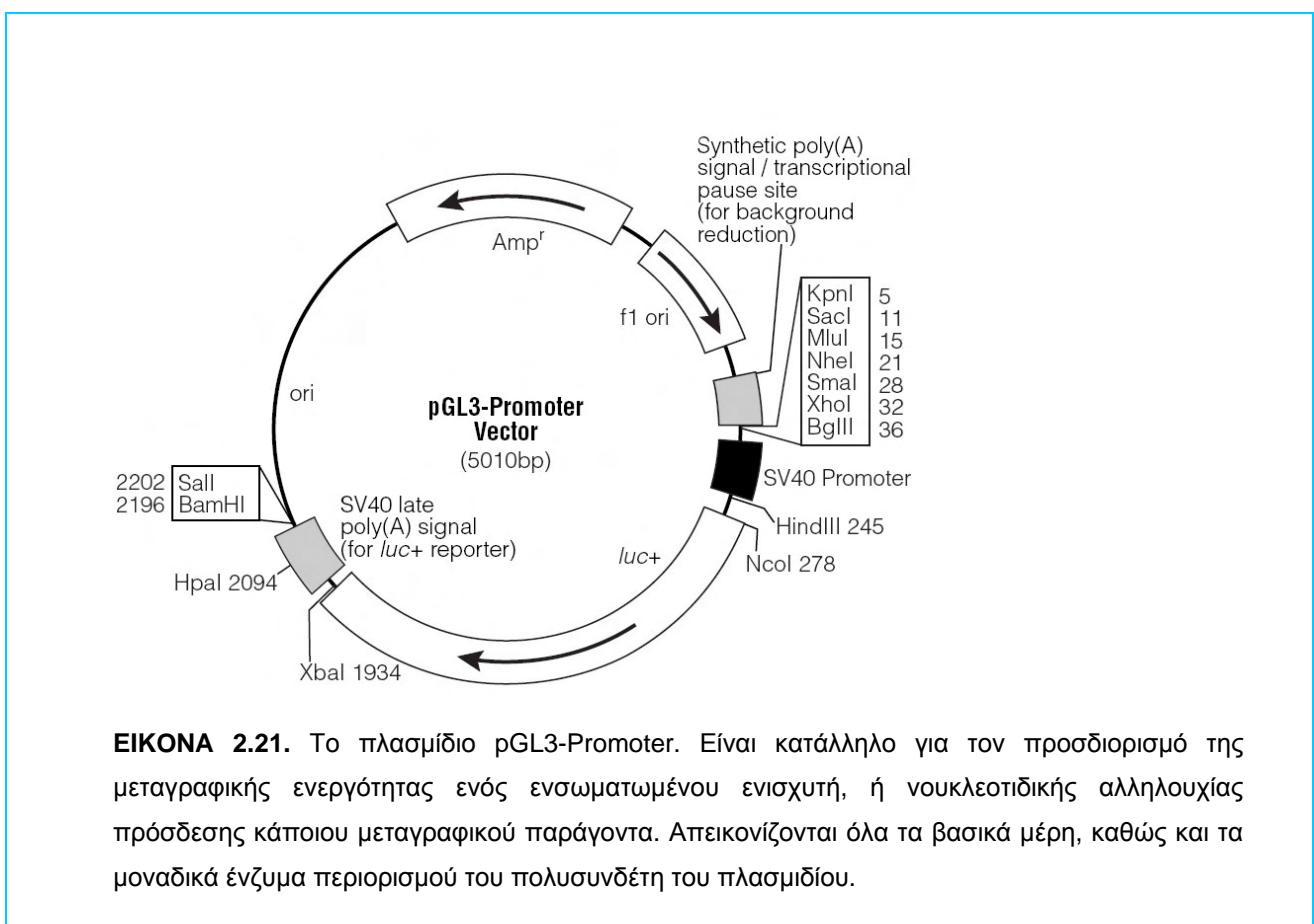
ΕΙΚΟΝΑ 2.19. Το πλασμίδιο pUC. Είναι κατάλληλο για την επιλογή λευκών/γαλάζιων αποικιών μετά από διακοπή της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της β-γαλακτοσιδάσης. Απεικονίζονται λεπτομερώς όλα τα βασικά μέρη, καθώς και τα μοναδικά ένζυμα περιορισμού του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου.

pGL3-Basic (Promega): Το πατρικό όχημα όλων των πλασμιδιακών φορέων της σειράς pGL, περιέχει τροποποιημένη κωδική αλληλουχία του γονιδίου της λουσιφεράσης του είδους *Photinus pyralis*, για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής ενεργότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Ειδικότερα ο πλασμιδιακός φορέας pGL3 Basic δεν διαθέτει κανένα ευκαρυωτικό υποκινητή ή ενισχυτή, επιτρέποντας μέγιστη δυνατότητα κλωνοποίησης αλληλουχιών ευκαρυωτικών υποκινητών. Η δυνατότητα έκφρασης της λουσιφεράσης σε κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο, εξαρτάται από την εισαγωγή και τον κατάλληλο προσανατολισμό ενός λειτουργικού υποκινητή αμέσως άνωθεν του γονιδίου της λουσιφεράσης (*luc+*). Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (ΕΙΚΟΝΑ 2.20).



ΕΙΚΟΝΑ 2.20. Το πλασμίδιο pGL3-Basic. Είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής ενεργότητας ενός ενσωματωμένου υποκινητή-ενισχυτή σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Απεικονίζονται όλα τα βασικά μέρη, καθώς και τα μοναδικά ένζυμα περιορισμού του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου.

pGL3-Promoter (Promega): Όπως και το παραπάνω πλασμίδιο, έτσι και το πλασμιδιακό όχημα pGL3-Promoter φέρει μια τροποποιημένη κωδική αλληλουχία του γονιδίου της λουσιφεράσης, για τον προσδιορισμό της μεταγραφικής ενεργότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Επίσης, το συγκεκριμένο πλασμίδιο διαθέτει υποκινητή SV40, άνωθεν του γονιδίου της λουσιφεράσης. Μπορεί να κλωνοποιηθούν κωδικές αλληλουχίες DNA που περιέχουν στοιχεία ενισχυτών, ή σημεία πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων είτε άνωθεν, είτε εκατέρωθεν του συμπλόκου λουσιφεράσης-υποκινητή SV40 (SV40promoter-luc+). Το πλασμίδιο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (ΕΙΚΟΝΑ 2.21).



pGL3-Basic+EalbpAT-1α (Δρ. Reuben F.A.): Κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα μέρος του ανθρώπινου υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης συζευγμένο με μέρος του ενισχυτή της αλβουμίνης του ποντικού pGL3-Basic. Για να δεχτεί τον χιμαιρικό ενισχυτή-υποκινητή, ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-Basic ευθυγραμμίστηκε με ενδονουκλεάσες περιορισμού *XhoI* και *HindIII*.

pGL3-Basic+ EIIpAT-1α (Δρ. Reuben F.A.): Το πλασμίδιο αυτό είναι παρόμοιο με το πλασμίδιο pGL3-Basic+ EalbpAT-1α, με μόνη διαφορά ότι ο υποκινητής της α1-αντιπρυψίνης είναι συζευγμένος με τον ενισχυτή EII της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού της ηπατίτιδας Β. Ο χιμαιρικός αυτός υποκινητής είναι μια ευγενική προσφορά του Δρ. Reuben.

pGL3-Basic+pAT-1α (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον χιμαιρικό υποκινητή EalbpAT-1α. Ο ενισχυτής της αλβουμίνης αποκόπηκε ενζυμικά από τις ενδονουκλεάσες *XhoI* και *BglII* και ο ευθυγραμμισμένος πλασμιδιακός φορέας pGL3-Basic+pAT-1α επανακυκλοποιήθηκε με τη βοήθεια της T4 DNA λιγάσης.

pGL3-Basic+pΔAT-1α (Πίσσας Γ.): Το πλασμίδιο αυτό βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα που φέρει με τον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης (pGL3-Basic + pAT-1α). Πολλαπλασιάστηκε ένα μέρος της κωδικής αλληλουχίας (από το -181 ως το +44) του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παρουσία ακόλουθων εκκινητών 5'-GGA AGC TGT ACA CTG CCC A-3' και 5'-ACT GTC CCA GGT CAG TGG TG-3'. Στη συνέχεια το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης κλωνοποιήθηκε στη θέση *SmaI* του πλασμιδιακού φορέα pGL3-Basic.

pGL3-Basic+pmAT-1α (Πίσσας Γ.) Το πλασμίδιο αυτό φέρει την ίδια αλληλουχία του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης όπως περιγράψαμε πριν, αλλά με δύο μεταλλαγές στις θέσεις -194 και -195 ($A^{-195} \rightarrow C$ και $A^{-194} \rightarrow C$) για την καταστροφή της θέσης πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP. Στη μεταλαξογέννεση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές: 5'-ACA ATG ACT CCT TT CGG TCC GTG CAG TGG AAG CTG-3' και 5'-CAG CTT CCA CTG CAC GGA CCG AAA GGA GTC ATT GT -3'.

pGL3-Promoter+4xC/EBP (Πίσσας Γ.) Το πλασμίδιο αυτό φέρει τέσσερα αντίγραφα της κωδικής αλληλουχίας του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης, όπου προσδένεται ο μεταγραφικός παράγοντας C/EBP. Η σύνθεση του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου έγινε ανάλογα με τη σήμανση ολιγονουκλεοτιδίου με κάποιο ραδιοϊσότοπο για τη μέθοδο χημικής κινητικής μετατόπισης (θα αναλυθεί λεπτομερώς αργότερα). Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων είναι οι ακόλουθες: 5'-CCG CTC GAG TCC TTT CGG TAA GTT CGG TAA GTT CGG TAA GTT CGG TAA GTG CAA GAT CT-3' και 5'-GGA AGA TCT TGC ACT TA C CGA ACT TAC CGA ACT TAC CGA ACT TAC CGA AAG GAC TCG AG-3'. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε τα ελεύθερα 5' άκρα τους, να επιτρέπουν άμεση κλωνοποίηση στο ευθυγραμμισμένο με ενδονουκλεάσες περιορισμού *XhoI* και *HindIII* πλασμιδιακό όχημα pGL3-Promoter.

pGL3-Basic+p1000Alb (Πίσσας Γ.): Μέρος του ανθρώπινου υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης (από το -978 ως το +11) κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGL3-basic. Ειδικότερα, γενωμικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα Huh-7 και υποβλήθηκε σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παρουσία εκκινητών 1000alb(5'-AGA ACC CGG GCC TTG GGT AGG GAA GGA-3') και 0alb(5'-CAA ACT CGA GCG CGG AGG GAA ATT AGC A-3') για τον πολλαπλασιασμό του αντίστοιχου υποκινητή της αλβουμίνης (p1000Alb). Το προϊόν της αντίδρασης επωάστηκε με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI* (φέρει ο εκκινητής που αντιστοιχεί στην οδηγό αλυσίδα DNA, 1000alb) και *XhoI* (φέρει ο εκκινητής που αντιστοιχεί στην συμπληρωματική αλυσίδα DNA, 0Alb) και εισήχθη στο πλασμιδιακό φορέα pGL3 Basic που είχε ευθυγραμμιστεί με ενδονουκλεάσες περιορισμού *SmaI* και *XhoI*.

pGL3-Basic+p500Alb (Πίσσας Γ.): Ανάλογη μεθοδολογία ακολουθήθηκε για την κλωνοποίηση του ανθρώπινου υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης (από το -475 ως το +11) στον φορέα pGL3-basic. Αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 500alb (5' CATGCCCGGGCGTGAGTACTTGTGTGT-3').

pGL3-Basic+pHEPC (Δρ.Σιμος Ι.) Ολόκληρος ο υποκινητής του γονιδίου της εφιδίνης -958/+141 κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic.

pGL3-Basic+pADH6 (Πίσσας Γ.) Πολυμερίστηκε τμήμα του υποκινητή του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6 με κατάλληλους εκκινητές. Το τμήμα που πολυμερίστηκε, κλωνοποιήθηκε στον ευθυγραμμισμένο με *XhoI* και *HindIII* πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές: 5'-CAA CAA GGG GCC TAC GTT CAG AAA CCT GAA AGA ATT -3' και 5'- GTA CTT TCT ACA GTG AAA GTT GCT ACA GGA TCT CCC -3'.

pGL3-Basic+pApoB (Πίσσας Γ.) Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για πολλαπλασιασμό τμήματος (-350/+11) του υποκινητή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης Β. Το εκμαγείο που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν απο πλασμίδιο που περιείχε όλη την κωδική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης Β. Το πλασμίδιο ήταν ευγενική χορηγία του Δρ. Καρδάση (1800pApoB). Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, κλωνοποιήθηκε στον ευθυγραμμισμένο με *XhoI* και *HindIII* πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές: 5'-GTC AGG GCA GGC TTC TCA GA-3' και 5'- AGC CGC CCC ACC GCA GCT-3'.

2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ)

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές ανθρώπου, θηλαστικών, καθώς και κύτταρα εντόμων συμβατών με το σύστημα βακουλοϊών. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν με φροντίδα, σε αυστηρά στείρες συνθήκες σύμφωνα με τις οδηγίες του ATCC. Όλες οι κυτταρικές διεργασίες έγιναν σύμφωνα με κρατικές και ευρωπαϊκές οδηγίες και με πιστή τήρηση του ISO/IEC 17025:2005. Ο ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 συνοψίζει όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1 Κατάλογος κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Όνομασία	Οργανισμός	Ιστός – Μορφολογία	Χρήση	Υλικό Καλλιέργειας
HepG2	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα – Επιθηλιακά	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS
Hep3B	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα – Επιθηλιακά	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS
Huh-7	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Ήπαρ, ηπάτωμα -	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS
WRL68	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Εμβρυικά επιθηλιακά κύτταρα ήπατος	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS

HeLa	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Ωοθήκη, αδενοκαρκίνωμα – Επιθηλιακά	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS
BHK-21	<i>Mesocricetus auratus</i> (συριακός χρυσός κρικετόμυς - κρίκητος)	Φυσιολογικό νεφρό από νεογέννητο, Ινοβλάστες	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS
Sf-9	<i>Spodoptera frugiperda</i> προνύμφη	Ωοθήκη, Επιθηλιακά	Παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλλοίων του είδους <i>Autographa Californica</i>	DMEM +5% FCS
RCC-10	<i>Homo sapiens</i> (άνθρωπος)	Καρκινικός νεφρός, Ινοβλάστες	Επιμόλυνση	DMEM +10% FCS

2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.4.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ DH-5A ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με κύτταρα *E.coli* του στελέχους DH-5a που διατηρούνται σε γλυκερόλη και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-20 ώρες.

II) Μία μοναδική αποικία από το τρυβλίο μεταφέρεται κάτω από στείρες συνθήκες σε 25ml υγρού θρεπτικού υλικού και επωάζεται με γρήγορη ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες

III) Εμβολιάζουμε την ως άνω υγρή καλλιέργεια σε 500ml θρεπτικού υλικού και αναδεύουμε στους 37°C μέχρι η πυκνότητα της καλλιέργειας να προσεγγίσει το 0,50 στα 600nm

IV) Μεταφέρουμε την υγρή καλλιέργεια σε πάγο και φυγοκεντρούμε σε 3000g (περίπου 5000 rpm) για 10 λεπτά.

V) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τους φυγοκεντρικούς σωλήνες ανεστραμμένους σε απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσουν 15 περιπού λεπτά.

VI) Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 125ml διαλύματος CaCl₂ 0,1M με ήπια ανάδευση και επωάζουμε στον πάγο για 20 λεπτά.

VII) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3000g (περίπου 5000rpm) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται και οι σωλήνες τοποθετούνται ανεστραμμένοι σε απορροφητικό χαρτί για να στεγνώσουν 15 περιπού λεπτά.

VIII) Αναδιαλύουμε το ίζημα σε 25ml διαλύματος CaCl₂ 0,1M και το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά.

X) Προσθέτουμε 7ml αποστειρωμένη γλυκερόλη 100% και μοιράζουμε τη βακτηριακή καλλιέργεια σε παγωμένα σωληνάκια τύπου errendorf, τα οποία ψύχονται σε υγρό άζωτο και στην συνέχεια φυλάσσονται στους -70°C έως και 4 χρόνια.

2.4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ DH5A

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Μεταφέρουμε σε πάγο δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a από τους -70°C, για να ξεπαγώσουν αργά στους 0°C

II) Τοποθετούμε 200μl κύτταρα σε σωλήνα προπυλενίου των 15ml και προσθέτουμε 20-200ng DNA περίπου. Ο όγκος του συνολικού DNA που προστίθεται δεν θα πρέπει να ξεπερνάει το 5 % του όγκου των δεκτικών κυττάρων. Όλη η πειραματική διαδικασία γίνεται κάτω από αυστηρά στείρες συνθήκες.

III) Αναμειγνύουμε ήπια το μείγμα και το επωάζουμε στον πάγο για 30min, με συχνές αναδεύσεις.

IV) Μεταφέρουμε το σωλήνα σε υδατόλουτρο 37⁰C για 2 ακριβώς λεπτά και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου 5-10 λεπτά, χωρίς να ανακινούμε το σωλήνα γιατί αυτό είναι το στάδιο εισόδου του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου στα κύτταρα.

V) Προσθέτουμε 1ml φρέσκου θρεπτικού διαλύματος LB χωρίς αντιβιοτικό.

VI) Το μείγμα επωάζεται στους 37⁰C για μία ώρα.

VIII) Αν έχουμε κάνει αντίδραση σύνδεσης μορίων πρέπει να φυγοκεντρήσουμε για 3 λεπτά σε 1500g και αφού απορρίψουμε περίπου 900ml από το υπερκείμενο θα πρέπει να αναδιαλύσουμε το ίζημα στον υπόλοιπο όγκο (περίπου 100ml).

IX) Επιστρώνουμε ~100ml σε τρυβλία LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζουμε το τρυβλίο ανεστραμμένο στους 37⁰C για 16 ώρες περίπου.

2.4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ BOILING LYSIS (MINIPREP)

Σε κάθε εργαστήριο οι μέθοδοι απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά στελέχη διαφέρουν τόσο στην τεχνική, όσο και στα αντιδραστήρια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Υγρή καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηρίων *E.coli* (1,5ml), που επωάστηκαν στους 37⁰C για 16 ώρες, μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf 1,5ml και η υγρή καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε 3000g για 5 λεπτά.

II) Αφαιρείται το υπερκείμενο και αναδιαλείεται το ίζημα σε 400ml διαλύματος STET.

III) Προσθέτουμε 30ml λυσοζύμης και αφήνουμε την αντίδραση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

IV) Τοποθετούμε το σωλήνα στους 100⁰C για 1 λεπτό ακριβώς για να επιτύχουμε το βρασμό του διαλύματος.

V) Κατόπιν φυγοκεντρούμε το σωλήνα σε 8000g και θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

VI) Με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας αφαιρούμε το αιωρούμενο ίζημα που έχει σχηματιστεί.

VII) Προστίθεται ίσος όγκος ισο-προπανόλης (περίπου 420μl) και ο σωλήνας ψύχεται στους -20°C για 20 λεπτά περίπου.

VIII) Φυγοκεντρούμε το σωλήνα σε μέγιστη ταχύτητα στους 4°C για 20 λεπτά.

IX) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ενυδατώνουμε το ίζημα σε 50μl TE (pH 8), ή υπερκαθαρό νερό.

2.4.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ NUCLEOBOND (MIDIPREP)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Nucleobond Plasmid DNA Purification της εταιρείας Macherey-Nagel. Η απόδοση του συστήματος αντιστοιχεί σε 500μg-2mg, από βακτηριακή καλλιέργεια 150ml.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια σε 4.500g και θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

II) Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml διάλυμα S1 (κυτταρική λύση). Χρησιμοποιώντας πλαστική πιπέτα επαναδιαλύουμε με αρκετή δύναμη το ίζημα, ώστε να μην υπάρχει ίχνος ιζήματος στο διάλυμα.

III) Προσθέτουμε 5ml διαλύματος S2 στο εναιώρημα και ανακατεύουμε ήπια. Το στάδιο της ανάδευσης πρέπει να γίνεται με προσοχή ώστε να μην απελευθερωθεί χρωμοσωμικό DNA και μολύνει το πλασμιδιακό DNA.

IV) Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.

V) Προσθέτουμε 5ml διαλύματος S3 στο εναιώρημα και ανακατεύουμε ήπια.

VI) Επωάζουμε το μίγμα στους 4°C για 5 λεπτά, ενώ παράλληλα ψύχουμε την φυγόκεντρο.

VII) Σταθεροποιούμε κάθετα την κολώνα Nucleobond στα ειδικά πλαστικά δαχτυλίδια που παρέχονται και ρυθμίζουμε το pH της, με την προσθήκη 2,5ml διαλύματος N2. Το υγρό που περνάει μέσα από το φίλτρο της κολώνας απορρίπτεται.

VIII) Το βακτηριακό λύμα του σταδίου VI φυγοκεντρείται σε 6.000g και 4°C για 20 λεπτά.

IX) Αδειάζουμε προσεκτικά το υπερκείμενο στην κολώνα που δεσμεύει το πλασμιδιακό DNA και απορρίπτουμε το υγρό που περνάει από το φίλτρο της κολώνας.

X) Πλένουμε την κολώνα δύο φορές με 10ml διαλύματος N3 και απορρίπτουμε το υγρό που περνάει από το φίλτρο της κολώνας.

XI) Το DNA αποδεσμεύεται από το φίλτρο της κολώνας με 5ml διάλυμα N5. Προσθέτουμε 3,5ml ισοπροπανόλη, ανακατεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε σε 3000g και 4°C για 25 λεπτά.

XII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 300μl TE.

2.4.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ – ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ PEG 8000 (MAXIPREP)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια (500ml) σε 4.500g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

II) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 5ml διάλυμα S1 (κυτταρική λύση). Επαναδιαλύουμε το ίζημα με αρκετή δύναμη.

III) Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 5 λεπτά.

IV) Προσθέτουμε 40ml διαλύματος S2 και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά.

V) Προσθέτουμε 45ml διαλύματος S3 και επωάζουμε στον πάγο για 30 λεπτά.

VI) Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 5000g και 4°C για 30 λεπτά.

VII) Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 60ml ισοπροπανόλης.

VIII) Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά.

IX) Φυγοκεντρούμε σε 4000g και θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.

X) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ενυδατώνουμε το ίζημα σε 3ml TE.

XI) Προσθέτουμε 3ml διαλύματος χλωριούχου λιθίου 5M (LiCl).

XII) Φυγοκεντρούμε σε 500g και 4°C για 20 λεπτά.

XIII) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπανόλη και φυγοκεντρούμε σε 500g και θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

XIV) Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε το ίζημα με αιθανόλη 70%.

XV) Κατόπιν το ίζημα ενυδατώνεται σε 500μl TE και μεταφέρεται σε σωλήνα Eppendorf, όπου προστίθενται 50μl ενζύμου RNase 10 mg/ml.

XVI) Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 λεπτά.

XVII) Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος PEG 8000, και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 8000g και 14°C για 15 λεπτά.

XVIII) Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα ενυδατώνεται σε 400μl TE.

XIX) Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, το μίγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται σε 14.000g και 14°C για 10 λεπτά.

XX) Η άνω φάση απομονώνεται και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιο και το μίγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται σε 8.000g και 14°C για 10 λεπτά.

XXI) Το προηγούμενο βήμα XX επαναλαμβάνεται.

XXII) Η άνω φάση απομονώνεται και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστίθεται 1ml αιθανόλη 100% και 50μl οξικό νάτριο 3M, pH 5,2.

XXIII) Το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 30λεπτά, ώστε το DNA που περιέχεται να κατακρημνιστεί πλήρως.

XXIV) Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 8000g και 4°C για 15 λεπτά.

XXV) Απορρίπτεται το υπερκείμενο, το ίζημα αποξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ενυδατώνεται σε 500μl TE.

2.4.6 ΚΑΤΑΤΜΗΣΗ DNA ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η πέψη μορίων DNA πραγματοποιήθηκε με περιοριστικές ενδονουκλεάσες από τις εταιρίες New England Biolabs ή Fermentas, σύμφωνα με τις οδηγίες που παρείχε η εταιρία για κάθε περιοριστικό ένζυμο. Η πέψη DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες γίνεται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, που παρέχει η εταιρία, με επώαση στην προτεινόμενη θερμοκρασία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης και η απαιτούμενη ποσότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης, είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA.

2.4.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Το μέγεθος και η ποιότητα δείγματος DNA ή RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Δείγματα μπορεί να είναι προϊόντα πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, μόρια πλασμιδιακού DNA μετά την απομόνωση από στήλη, προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ή ριβοσωμικό RNA. Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα 0,25% (β/ο) κυανού της βρωμοφαινόλης, 0,25% (β/ο) κυανού του ξυλενίου FF, 30% (ο/ο) γλυκερόλης, σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του κάθε δείγματος. Το πήκτωμα αγαρόζης έχει συνήθως πυκνότητα 1-2%, άλλα μπορεί να είναι και πυκνότερο στην περίπτωση που θα πρέπει να αναλυθούν αρκετά μικρά σε μέγεθος μόρια DNA. Το πήκτωμα περιέχει μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (περίπου 0,3 μg/ml), σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE ή TAE. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες σταθερής τάσης για κατάλληλο χρόνο παρατηρείται στο υπεριώδες μήκος κύματος.

2.4.8 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Τα κομμάτια DNA που διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να αφαιρεθούν με νυστέρι κάτω από υπεριώδες φως και το DNA που μας ενδιαφέρει να απομονωθεί με τους παρακάτω τρόπους.

(α) Με χρήση μικροδοκιμαστικού σωλήνα Spin-X (Corning, Costar).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ :

I) Η ζώνη του πηκτώματος ζυγίζεται και τοποθετείται στην υποδοχή πάνω από το φίλτρο του ειδικού μικροδοκιμαστικού σωλήνα Spin-X. Κάθε μικροδοκιμαστικός σωλήνας μπορεί να συγκρατήσει ως και 0,3gr πηκτώματος αγαρόζης.

II) Προστίθενται 200μl TE στην υποδοχή πάνω από το φίλτρο

III) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 8000g και θερμοκρασία δωματίου. Το DNA συλλέγεται σε σωλήνα Eppendorf.

IV) Επαναλαμβάνουμε τα στάδια II και III για να εξασφαλίσουμε συλλογή μέγιστης ποσότητας DNA από την αγαρόζη. Συνήθως η απώλεια ποσότητας του DNA αγγίζει το 20%.

V) Μεταφέρουμε σε δοκιμαστικό σωλήνα όλο το μίγμα που διέλευσε μέσα από το φίλτρο μικροδοκιμαστικού σωλήνα Spin-X, απορρίπτοντας το φίλτρο.

VI) Στο μίγμα προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλης 100% και 1/10 του αρχικού όγκου διάλυμα οξικού νατρίου και το μίγμα επωάζεται στους -80 °C για 20 λεπτά.

VII) Το μίγμα φυγοκεντρείται σε 8000g και 4°C για 15 λεπτά.

VIII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα αποξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ενυδατώνεται σε 50μl TE.

(β) Με χρήση αυτοσχέδιας στήλης από γάζα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Η ζώνη του πηκτώματος ζυγίζεται και εμποτίζεται σε διάλυμα οξικού νατρίου 3M, pH 5,2, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

II) Το μίγμα μεταφέρεται πάνω σε κωνοειδές αυτοσχέδιο φίλτρο κατασκευασμένο από πορώδη γάζα 0,2mm.

III) Το παραπάνω τοποθετείται σε σωλήνα Eppendorf 500μl, που έχει μια μικρή οπή από καρφίτσα στον πυθμένα του.

IV) Το παραπάνω αυτοσχέδιο σύστημα τοποθετείται σε σωλήνα Eppendorf 1500μl.

V) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 2000g και θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

VI) Απορρίπτουμε το σωλήνα Eppendorf 500μl με το φίλτρο και συλλέγουμε τον εξωτερικό σωλήνα Eppendorf 1,5ml που περιέχει το μίγμα που διήλθε μέσα από το αυτοσχέδιο φίλτρο.

VII) Προστίθεται διπλάσιος όγκος αιθανόλη 100% και 1/10 του αρχικού όγκου διάλυμα 3M οξικού νατρίου pH 5,2 και το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 20 λεπτά.

VIII) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 8000g και 4 °C για 15 λεπτά.

IX) Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα αποξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και ενυδατώνεται σε 50μl TE.

(γ) Με χρήση “QIAquick Gel Extraction Kit” της εταιρίας QIAGEN.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

- I) Η ζώνη του πηκτώματος ζυγίζεται και λαμβάνεται υπόψιν ότι βάρος 100mg αντιστοιχεί σε όγκο 100μl.
- II) Σε σωλήνα Eppendorf προσθέτουμε 300μl διάλυμα QG ανά 100mg πήκτωμα. Για εκείνα τα πηκτώματα αγαρόζης που έχουν 2% και άνω αγαρόζη, προστίθεται διπλάσιος όγκος διαλύματος QG.
- III) Το μίγμα επωάζεται στους 50°C για 10 λεπτά και αναδεύουμε με τη χρήση vortex κάθε 2 λεπτά.
- IV) Μετά την επώαση ελέγχουμε αν δεν υπάρχει κανένα ίχνος πηκτώματος αγαρόζης. Εάν υπάρχει ξαναεπωάζουμε το μίγμα. Στην συνέχεια ελέγχουμε το χρώμα του διαλύματος. Το χρώμα θα πρέπει να είναι κίτρινο, αν είναι πορτοκαλί ή βιολετί προστίθεται 10 μl οξικό νάτριο 3M, pH 5,2 και αναδεύεται το όλο μίγμα μέχρι να γίνει κίτρινο.
- V) Η στήλη εφαρμόζεται στο άνω μέρος του σωλήνα των 2ml, που παρέχει η εταιρία, προσθέτουμε το διάλυμα και φυγοκεντρούμε στα 8000g για 1 λεπτό. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να συγκρατήσει η στήλη είναι 750μl.
- VI) Το υγρό που πέρασε από τη στήλη αφαιρείται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο άνω μέρος του σωλήνα της εταιρίας.
- VII) Προστίθενται 750μl διάλυμα QG στη στήλη και φυγοκεντρούμε σε 9000g για 1 λεπτό.
- VIII) Το υγρό που πέρασε από τη στήλη αφαιρείται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο άνω μέρος του σωλήνα της εταιρίας.
- IX) Προστίθενται 750μl διάλυμα PE στη στήλη και φυγοκεντρούμε σε 9000g για 1 λεπτό.
- X) Το υγρό που πέρασε από τη στήλη αφαιρείται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο άνω μέρος του σωλήνα της εταιρίας.
- XI) Φυγοκεντρούμε σε 9000g για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη του διαλύματος PE

XII) Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προσθέτουμε 30μl διαλύματος EB στο κέντρο του φίλτρου της στήλης χωρίς να γδάρουμε το φίλτρο με την άκρη της πιπέτας και αφήνουμε να διαποτιστεί το φίλτρο για ένα περίπου λεπτό.

XIV) Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 9000g για 1 λεπτό

XV) Η στήλη αφαιρείται και το έκλουσμα DNA φυλάσσεται στους -20°C .

2.4.9 ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΚΡΩΝ ΤΟΥ DNA

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Χρησιμοποιούνται από 1 έως και 10μg DNA, διαλυμένο σε νερό, ή TE.

II) Στο DNA προστίθενται 5μl ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης.

III) Στη συνέχεια προστίθεται 1μl ενζύμου αλκαλικής φωσφατάσης (Fermentas, 1u/μl) και απεσταγμένο νερό, σε τελικό όγκο 50μl.

IV) Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

V) Το ένζυμο απενεργοποιείται στους 85°C για 15 λεπτά.

VI) Στο μίγμα προστίθενται 150μl νερό, αναμειγνύεται με 200μl φαινόλη και φυγοκεντρείται σε 8000 g και 14°C για 10 λεπτά.

VII) Η άνω φάση απομονώνεται και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf, προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιο και το μίγμα φυγοκεντρείται σε 8000g και 14°C για 10 λεπτά.

VIII) Το προηγούμενο βήμα VII επαναλαμβάνεται.

IX) Η άνω φάση απομονώνεται και μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προστίθενται 400 μl αιθανόλης 100% και 20 μl οξικού νατρίου 3M, pH 5,2.

XI) Το μίγμα επωάζεται στους -80°C για 30 λεπτά, για την κατακρήμνιση του DNA και το μίγμα φυγοκεντρείται σε 8000g και 4°C για 15 λεπτά.

XII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα αποξηραίνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ενυδατώνεται σε 50μl TE

2.4.10 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΚΛΕΝΩW / T4 ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΩΝ ΑΚΡΩΝ

Το ένζυμο Klenow χρησιμοποιείται για να “γεμίσει” τα ελεύθερα άκρα των μορίων DNA, για την κατασκευή κλώνων. Αντίστοιχα παρόμοια λειτουργία διαθέτει και το ένζυμο της T4 DNA πολυμεράσης, μόνο που η δράση του είναι μόνο 3'-5' εξωνουκλειϊκή, σε αντίθεση με το ένζυμο Klenow που η δράση του είναι και 3'-5', καθώς και 5'-3' εξωνουκλειϊκή. Το “γέμισμα” των ελεύθερων ακρών πραγματοποιείται με πληθώρα dNTPs που προστίθενται στο μίγμα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Χρησιμοποιούνται από 0,1 έως και 4μg DNA σε διάλυμα TE.

II) Στο DNA προστίθεται 2μl από το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (είτε Klenow, είτε T4 πολυμεράσης).

III) Στη συνέχεια προστίθεται 1μl ενζύμου Klenow, ή T4 πολυμεράσης (Fermentas, 5 u/μl), 0,5μl μίγματος 2mM νουκλεοτιδίων (dNTP mix) και απεσταγμένο νερό, σε τελικό όγκο μίγματος τα 20μl.

IV) Πραγματοποιείται επώαση στους 37°C για 30 λεπτά και ακολουθεί απενεργοποίηση του ενζύμου στους 85°C για 15 λεπτά

2.4.11 ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΞΕΝΟ ΤΜΗΜΑ DNA

Για να κατασκευαστεί ένα καινούριο πλασμίδιο (κλώνος) θα πρέπει να συνδεθεί το επιθυμητό τμήμα DNA με ένα πλασμιδιακό φορέα. Η σύνδεση αυτή περιλαμβάνει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στις φωσφορικές ομάδες στα 5' άκρα και στις υδροξυλομάδες στα 3' άκρα των δύο αυτών μορίων DNA. Σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών επιτυγχάνει, η T4 DNA λιγάση, που καταλύει σύνδεση μορίων DNA με συμπληρωματικά (sticky) ή τυφλά (blunt) άκρα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Τα δύο μόρια DNA προς σύνδεση, πλασμιδιακός φορέας και ξένο τμήμα, αναμειγνύονται σε ορισμένη αναλογία (1/2, 1/4, 1/8), ανάλογα με το μέγεθος των δύο μορίων.

II) Στο μίγμα των DNA προστίθενται 2μl ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (10x T4 DNA λιγάση, Fermentas) και συμπληρώνεται με υπερ-καθαρό νερό σε τελικό όγκο 20μl.

IV) Προστίθεται το ένζυμο T4 DNA λιγάση (Fermentas, 1u/μl). Για τη σύνδεση μορίων DNA με συμπληρωματικά άκρα απαιτούνται 2μl για την αντίδραση σύνδεσης, ενώ για την σύνδεση μορίων DNA με τυφλά άκρα απαιτούνται 4μl ενζύμου.

V) Το μίγμα επωάζεται στους 22°C για 16 ώρες περίπου.

VI) Ακολουθεί απενεργοποίηση της αντίδρασης στους 65°C για 10 λεπτά. Το μίγμα είναι έτοιμο προς μετασχηματισμό σε κατάλληλα βακτηριακά στελέχη.

2.4.12 ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Προσδιορισμό και ανάγνωση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA, είτε κατασκευασμένων πλασμιδίων, είτε προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, διενήργησαν οι εταιρίες Macrogen Inc (Κορέα) και Lark (Ηνωμένο Βασίλειο). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινήτες του εμπορίου (π.χ. TCR1 & TCR2 για τον πλασμιδιακό φορέα pCI, GL2 & RV3 για τον πλασμιδιακό φορέα pGL3) ή παρασκευασμένοι κατόπιν ειδικής παραγγελίας.

2.4.13 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ SDS ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.

Ανάλυση και διαχωρισμός πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχές αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης. Ανάλογα με το μέγεθος των προς διαχωρισμό πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν 8%, 10%, 12%, ή και 15% SDS πολυακρυλαμίδη, με 5% πήκτωμα επιστοιβαξης(ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2 Αντιδραστήρια παρασκευής πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 12%.

ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (12%)	ΠΗΚΤΩΜΑ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (5%):
→30ml	→10ml
12ml ακρυλαμίδης 29:1	1,66 ml ακρυλαμίδης 29:1
7,5ml Tris 1.5M, pH:8.8	1,26ml Tris 1.5M, pH:6.8
0,3ml SDS 10%	0,1 ml SDS 10%
0,3 ml Υπερθειικό αμμώνιο	0,1 ml Υπερθειικό αμμώνιο
0,012 ml TEMED	0,05 ml TEMED
9,9ml H ₂ O	6,8 ml H ₂ O

Μόλις προστεθεί στο διάλυμα TEMED (N,N,N,N-τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη) αρχίζει ο πολυμερισμός του πηκτώματος της πολυακρυλαμίδης, καταλύοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο. Το υπερθειικό αμμώνιο παρέχει στην αντίδραση τις ελεύθερες ρίζες, που είναι απαραίτητες για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Συνιστάται το TEMED να προστίθεται πάντα τελευταίο στην αντίδραση πολυμερισμού. Ο ρόλος της προσθήκης του SDS είναι διπλός. Αρχικά φορτίζει αρνητικά τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, καθώς προσδένεται σε αυτές. Επίσης το SDS σε συνδυασμό με την μερκαπτοαιθανόλη και τη θέρμανση διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και τις αποδιατάσσει.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Καθαρίζουμε επιμελώς τα τζάμια και τα υπόλοιπα μέρη της συσκευής όπου θα παρασκευάσει το αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια συναρμολογούμε τη συσκευή και ελέγχουμε με απεσταγμένο νερό τυχόν διαρροές.

II) Αναδιαλύουμε σε σωλήνα Falcon 50ml τα συστατικά του πίνακα και προσθέτουμε τελευταίο το TEMED ώστε να εκκινήσει η αντίδραση πολυμερισμού της πολυακρυλαμίδης.

III) Χύνουμε προσεκτικά το μίγμα πολυακρυλαμίδης ανάμεσα από τα τζάμια της συσκευής.

IV) Αφηνούμε ελεύθερη τη συσκευή σε θερμοκρασία δωματίου και προετοιμάζουμε το μίγμα για το πήκτωμα επιστοίβαξης.

V) Αναδιαλύουμε σε σωλήνα Falcon 15ml τα συστατικά του πίνακα και προθέτουμε τελευταίο το TEMED ώστε να εκκινήσει η αντίδραση πολυμερισμού της πολυακρυλαμίδης.

VI) Χύνουμε προσεκτικά το μίγμα για το πήκτωμα επιστοίβαξης πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού.

VII) Τοποθετούμε την πλαστική «χτένα» για την δημιουργία των απαραίτητων βοθρίων, όπου θα φορτωθούν τα κυτταρικά εκχυλίσματα.

VIII) Αφηνούμε ελεύθερη τη συσκευή σε θερμοκρασία δωματίου για τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης.

X) Το ρυθμιστικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών είναι 25mM Tris, 250mM γλυκίνη και 0.1% (β/ο) SDS.

XI) Στα κυτταρικά εκχυλίσματα προσθέτουμε 3-5μl μερκαπτοαιθανόλη και αναμιγνύουμε.

XII) Τα κυτταρικά εκχυλίσματα θερμαίνονται στους 100°C για 3 λεπτά.

XIII) Τα κυτταρικά εκχυλίσματα φορτώνονται στα βοηθία στο πήκτωμα επιστοιβάξης.

XIV) Ρυθμίζουμε την τάση του ρεύματος για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στα 120-150V για 3-6 ώρες.

2.4.14 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στο αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες πρέπει να μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, για να αναλυθούν περαιτέρω.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς παρασκευάζεται αναδιαλύοντας 39mM γλυκίνη, 48mM Tris, 0,037% (β/ο) SDS, 20% (ο/ο) μεθανόλη.

II) Η συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών αποσυναρμολογείται και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετείται ανάμεσα από χαρτιά Whattman και μεμβράνη Protran BA, 100% νιτροκυτταρίνης (Whatman–Schleicher and Schuell) με μέγεθος πόρου 0,2 - 0,45μm. Τόσο τα χαρτιά Whattman, όσο και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είναι ποτισμένα με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών.

III) Τοποθετούμε διαδοχικά δύο χαρτιά Whattman στη βάση, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τέλος άλλα δύο χαρτιά Whattman στην κορυφή, δημιουργώντας ένα «σάντουιτς».

IV) Στη συνέχεια το σάντουιτς τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς. Η νιτροκυτταρίνη πρέπει πάντα να είναι τοποθετημένη προς την άνοδο, μιας και οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες.

V) Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά στα 300mA για 3 ώρες.

VI) Μόλις ολοκληρωθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών στην νιτροκυτταρίνη ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau S για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Το σάντουιτς αποσυναρμολογείται και η νιτροκυτταρίνη τοποθετείται σε ένα πλαστικό δοχείο.

VII) Η νιτροκυτταρίνη διαβρέχεται από ελάχιστη ποσότητα Ponceau S (0,2% (β/ο) Ponceau S, 3% (β/ο) τριχλωροοξικό οξύ).

VIII) Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών για 2-3 λεπτά.

IX) Το Ponceau αφαιρείται από το πλαστικό δοχείο και πραγματοποιούμε επαναλαμβανόμενες πλύσεις με απιονισμένο νερό μέχρι να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της χρωστικής από την μεμβράνη.

2.4.15 ΑΝΟΣΟΣΤΥΠΩΣΗ ΤΥΠΟΥ WESTERN

Για την ανάλυση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανοσοσύπωσης τύπου WESTERN, (WESTERN BLOT). Η τεχνική μπορεί να επιμεριστεί στα ακόλουθα τέσσερα στάδια:

- α) Κορεσμός των μη ειδικών θέσεων αναγνώρισης του αντισώματος (βήμα I)
- β) Δέσμευση πρώτου αντισώματος (βήμα II-IV)
- γ) Δέσμευση δεύτερου αντισώματος (βήμα V-VII)
- δ) Ανίχνευση σήματος πρωτεΐνης μέσω χημειοφωταύγειας (βήμα VIII-IX)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Η νιτροκυτταρίνη επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα με συνεχή ανακίνηση σε διάλυμα δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (1x PBS, 0,01% (o/o) Tween και 5% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα). Για ορισμένα αντισώματα το 1x PBS αντικαθίσταται με 1x TBS.

II) Το διάλυμα κορεσμού αφαιρείται και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το αντίσωμα για 16-18 ώρες στους 4°C, υπό συνεχή ανακίνηση. Το αντίσωμα αναδιαλύεται σε διάλυμα που περιέχει 1x PBS, 0,02% (o/o) Tween και 1% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα. Για ορισμένα αντισώματα το 1% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα αντικαθίσταται με 1% (β/o) BSA. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό έναντι της προς ανίχνευση πρωτεΐνης.

III) Απομακρύνεται το διάλυμα με το πρώτο αντίσωμα και αποθηκεύεται στους 4°C ή -20°C, ανάλογα με τις συστάσεις της εταιρίας για κατάλληλη συντήρησή του.

IV) Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα έκπλυσης (1x PBS, 0,02% (o/o) Tween και 1% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα). Η κάθε έκπλυση γίνεται με συνεχόμενη ανακίνηση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη θα πρέπει να είναι πλήρως βυθισμένη στο διάλυμα έκπλυσης. Οι διαδοχικές πλύσεις είναι απαραίτητες για την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου αντισώματος.

V) Η νιτροκυτταρίνη επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση μέσα σε διάλυμα που περιέχει το δεύτερο αντίσωμα. Το αντίσωμα αναδιαλύεται σε διάλυμα που περιέχει 1x PBS, 0,02% (o/o) Tween και 1% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα. Για ορισμένα αντισώματα το 1% (β/o) άπαχο αφυδατωμένο γάλα αντικαθίσταται με 1% (β/o) BSA. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού, ή κουνελιού, ανάλογα με το είδος αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο στάδιο. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση του μαύρου ραπανιού και χρησιμοποιείται συνήθως σε αραίωση 1:1000.

VI) Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με τη χρήση διαλύματος έκπλυσης, όπως στο βήμα IV.

VII) Η νιτροκυτταρίνη πλένεται για τελευταία φορά σε διάλυμα που περιέχει μόνο 1xPBS, ή 1xTBS σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανακίνηση για 10 λεπτά.

VIII) Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται σε ειδικό διάλυμα ChemiLucent της εταιρίας Chemicon (Chemicon International – SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce), σε θερμοκρασία δωματίου για 3 λεπτά.

IX) Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε κασέττα εμφάνισης σκοτεινού θαλάμου ανάμεσα από δύο πλαστικές διαφάνειες. Η όλη διαδικασία εμφάνισης του φιλμ πραγματοποιείται αποκλειστικά σε σκοτεινό θάλαμο. Μέσα στον σκοτεινό θάλαμο τοποθετούμε το φιλμ ακριβώς πάνω από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το αφήνουμε για περίπου 30 δευτερόλεπτα για την αποτύπωση του σήματος. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ πάνω στην μεμβράνη εξαρτάται αποκλειστικά από την ένταση του σήματος της επιθυμητής πρωτεΐνης.

2.4.16 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Διαμόλυνση των διάφορων κυτταρικών σειρών θηλαστικών πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους.

α) Με χρήση λιποφεκταμίνης (Lipofectamine & Plus reagent, Invitrogen)

Το αντιδραστήριο της λιποφεκταμίνης είναι κατάλληλο για την επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με DNA. Είναι λιπόσωμα που περιλαμβάνει τρία μέρη πολυκατιονικού λιπιδίου DOPSA και ενός ουδέτερου λιπιδίου DOPE. Επίσης, η ικανότητα επιμόλυνσης της λιποφεκταμίνης μπορεί να ενισχυθεί αρκετά με την παρουσία του αντιδραστηρίου Plus, το οποίο βοηθάει στην καλύτερη ξεδίπλωση των προς επιμόλυνση μορίων DNA.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

(Η παρακάτω πειραματική διαδικασία αφορά τη χρήση κυτταρικών δοχείων με 12 βοθρία)

I) Μία μέρα πριν την επιμόλυνση, $1-3 \times 10^5$ κύτταρα τοποθετούνται σε κάθε βοθρίο διαλυμένα σε 1ml θρεπτικού υλικού DMEM με 10% ορρό και τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

II) Για κάθε δείγμα προς επιμόλυνση θα πρέπει να παρασκευαστούν δύο διαφορετικά μίγματα.

III) Στο μίγμα A αναμιγνύονται 0,2-1μg DNA σε 50μl DMEM χωρίς ορό. Αν είναι διαθέσιμο το Plus αντιδραστήριο τότε προσθετούμε 1μl στο μίγμα. Αναδεύουμε απαλά.

IV) Στο μίγμα Β αναμιγνύονται 1μl λιποφεκταμίνης σε 50μl DMEM χωρίς ορό. Αναδεύουμε απαλά.

V) Αναμιγνύουμε το μίγμα Α μαζί με το μίγμα Β. Ο όγκος του νέου μίγματος ανέρχεται σε 100μl περίπου.

VI) Το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να δημιουργηθεί σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης.

VII) Προσθέτουμε 300μl DMEM χωρίς ορό.

VIII) Αφαιρούμε όλο το θρεπτικό υλικό από τα βοθρία και προσθέτουμε 400μl φρέσκο DMEM χωρίς ορό.

IX) Σε κάθε βοθρίο προσθέτουμε το μίγμα που περιέχει το σύμπλοκο DNA-λιποφεκταμίνης και αναδεύουμε απαλά.

X) Τα κύτταρα επωάζονται για 5 ώρες στους 37°C.

XI) Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα βοθρία και προστίθενται 800μl φρέσκο θρεπτικό υλικό DMEM με ορό και αντιβιοτικά.

XII) Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος (6-48 ώρες).

β) Με χρήση jetPEI (*jetPEI reagent*, Polyplus)

Το αντιδραστήριο jetPEI είναι ένα κατιονικό πολυμερές, με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό και διαθέτει την ικανότητα να δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με αρνητικά φορτισμένο DNA. Τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν άμεσα με την κυτταρική μεμβράνη και έτσι επιτρέπεται η εισαγωγή του DNA στο εσωτερικό των κυττάρων. Είναι κατάλληλο για την επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων και ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην επιμόλυνση κυττάρων ηπατικής προέλευσης. Επιπλέον, το αντιδραστήριο jetPEI επιτρέπει επιμόλυνση κυττάρων με μεγάλη αρχική ποσότητα DNA, καθιστώντας εύκολες εκείνες τις συνεπιμολύνσεις που απαιτούν πολλαπλά δείγματα DNA σε διαφορετικές αναλογίες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

(Η παρακάτω πειραματική διαδικασία αφορά τη χρήση κυτταρικών δοχείων με 12 βοθρία)

- I) Μία μέρα πριν την επιμόλυνση, τοποθετούνται σε κάθε βοθρίο 2-3 $\times 10^5$ κύτταρα και 1ml θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό και με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Το αντιδραστήριο jetPEI είναι πιο αποτελεσματικό σε κύτταρα που καλύπτουν άνω του 70% της επιφάνειας του βοθρίου.
- II) Για κάθε δείγμα προς επιμόλυνση θα πρέπει να παρασκευαστούν δυο διαφορετικά μίγματα.
- III) Στο μίγμα A αναμιγνύονται 1-4,5μg DNA σε 100μl 150mM NaCl. Αναδεύουμε με χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- IV) Στο μίγμα B αναμιγνύονται 4μl jetPEI σε 100μl 150mM NaCl. Αναδεύουμε με χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- V) Το κάθε μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- VI) Αναμιγνύουμε το μίγμα A μαζί με το μίγμα B. Ο όγκος του νέου μίγματος ανέρχεται στα 200μl περίπου.
- VII) Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, ώστε να δημιουργηθεί συμπλοκο DNA-jetPEI. Αναδεύουμε με χρήση vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- VIII) Αφαιρούμε όλο το θρεπτικό υλικό από τα βοθρία και προσθέτουμε 500μl φρέσκο DMEM με ορό και αντιβιοτικά.
- IX) Σε κάθε βοθρίο προσθέτουμε το μίγμα που περιέχει το συμπλοκο DNA-jetPEI και αναδεύουμε απαλά.
- X) Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος (6-48 ώρες).

2.4.17 ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε δύο διαφορετικούς τρόπους.

α) Με χρήση τριπλού καθαριστικού (triple detergent)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε πειράματος, 6-48 ώρες μετά την επιμόλυνση το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα βοθρία ή τα πλαστικά κυτταρικά δοχεία (φλάσκες F-25, F75, F150).

II) Ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS ανακινώντας το κυτταρικό δοχείο απαλά για ένα λεπτό περίπου.

III) Επαναλαμβάνουμε το βήμα II.

IV) Προσθέτουμε 1 ml PBS πάνω στα κύτταρα και με τη βοήθεια μίας ξύστρας κυττάρων (cell scraper) αποκολλούμε τα κύτταρα από τον πυθμένα του βοθρίου ή του κυτταρικού δοχείου.

V) Συλλέγουμε σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf τα αναδιαλυμένα κύτταρα σε PBS.

VI) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3000g και 4°C για 10 λεπτά.

VII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο κυτταρικό ίζημα προσίθεται διάλυμα κυτταρικής λύσης, που περιέχει 200μl τριπλού καθαριστικού και 10μl PMSF (αναστολέας πρωτεασών).

VIII) Αναμιγνύουμε το μίγμα σε vortex και το επωάζουμε για 10 λεπτά στον πάγο.

IX) Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 9000g και 4°C για 15 λεπτά.

X) Το υπερκείμενο αφαιρείται και τοποθετείται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

XI) Το κυτταρικό εκχύλισμα διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

β) Με χρήση Passive Lysis Buffer (Promega)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε πειράματος, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα βοθρία, ή τα πλαστικά κυτταρικά δοχεία (φλάσκες F-25, F75, F150) 6-48 ώρες μετά την διαμόλυνση.

II) Ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS ανακινώντας το κυτταρικό δοχείο απαλά για ένα περίπου λεπτό.

III) Επαναλαμβάνουμε το βήμα II.

IV) Προσθέτουμε στα κύτταρα 1ml PBS και με τη βοήθεια ξύστρας κυττάρων (cell scraper) τα αποκολλούμε απο τον πυθμένα του βοθρίου ή του κυτταρικού δοχείου και τα συλλέγουμε σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf.

V) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3000g και 4°C για 10 λεπτά.

VI) Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο κυτταρικό ίζημα προσθέτουμε διάλυμα κυτταρικής λύσης, που περιέχει 120μl 1x Passive Lysis Buffer.

VII) Αναμιγνύουμε με χρήση vortex το μίγμα και το επωάζουμε για 20 λεπτά στον πάγο.

VIII) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 9000g και 4°C για 15 λεπτά.

X) Αφαιρείται το υπερκείμενο και τοποθετείται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

XI) Το κυτταρικό εκχύλισμα διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης, ή για τη μέθοδο Beta-Glo.

2.4.18 ΑΠΟΨΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΨΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Πολλές φορές απαιτείται να επαναψβριδοποιήσουμε μία μεμβράνη με άλλο αντίσωμα, για πιθανή σύγκριση με προηγούμενο αντίσωμα. Ο επαναψβριδισμός της μεμβράνης γίνεται μόλις αποψβριδιστεί πλήρως η νιτροκυτταρίνη από το προηγούμενο αντίσωμα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Πραγματοποιείται αποκόλληση των αντισωμάτων που έχουν προσδεθεί στην μεμβράνη κατά την πρώτη ανοσοσύτρωση τύπου Western, με εμβάπτιση της μεμβράνης σε διάλυμα 0,2M γλυκίνης pH 2,8 και 0,5M NaCl.

II) Η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανακίνηση.

III) Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα 1M Tris για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανακίνηση.

IV) Επαναλαμβάνεται το στάδιο III.

V) Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα 1xPBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχόμενη ανακίνηση.

VI) Η ανοσοσύτρωση τύπου Western με το καινούριο αντίσωμα μπορεί να ξεκινήσει.

2.4.19 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία σχετικά απλή μέθοδος πολλαπλασιασμού επιλεγμένης από τους εκκινητές αλληλουχίας DNA που καταλύεται από ειδικό ένζυμο, την θερμοάντοχη DNA πολυμεράση. Με την πάροδο των ετών αναπτύχθηκαν διάφορες παραλλαγές της τεχνικής, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής. Ο πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης DNA αλληλουχίας επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαφορετικών αντιδράσεων. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι πολλή ευαίσθητη τεχνική, αν λάβει κανείς υπ' όψιν ότι μετά από 30-40 κύκλους των τριών αντιδράσεων το τελικό προϊόν DNA ανέρχεται σε ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας. Κάθε κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελείται από τρεις διαδοχικές αντιδράσεις που διαφέρουν στη θερμοκρασία και στον χρόνο. Οι τρεις αντιδράσεις είναι:

- α) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- β) Υβριδισμός των εκκινητών με την επιθυμητή αλληλουχία DNA
- γ) Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων DNA με επέκταση των 3' άκρων των εκκινητών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

Ι) Σε σωλήνα Eppendorf 250μl προστίθεται το παρακάτω μίγμα αντίδρασης (ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3 Αντιδραστήρια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Τελική Συγκέντρωση
DNA εκμαγείο	10pg-1μg
Ρυθμιστικό διάλυμα (PCR) (x10)	5μl
Εκκινητής 1 (10μM)	1μl
Εκκινητής 2 (10μM)	1μl
dNTP μίγμα (2mM)	4μl
MgCl ₂ (25mM)	4μl
Taq πολυμεράση* (1u/μl)	1μl
H ₂ O	έως 50 μl τελικό όγκο

* Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν χρησιμοποιήθηκε μόνο η Taq πολυμεράση στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, άλλα αναφέρεται σαν συχνότερη πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που διενεργήθηκαν. Άλλες πολυμεράσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι η Vent (για πολλαπλασιασμό DNA αλληλουχιών με τυφλά άκρα, New England Biolabs), η *pfuTurbo* (για

μεταλλαξογένεση πλασμιδιακών φορέων, Stratagene), καθώς και η AmpliTaq (για τον πολλαπλασιασμό εξαιρετικής ποιότητας DNA αλληλουχίας που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή νέων πλασμιδίων, AB Applied Biosystems).

II) Τα δείγματα εισάγονται στη συσκευή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ρυθμίζουμε τη συσκευή ώστε να εκτελέσει ένα καθορισμένο πρόγραμμα (ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4).

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4 Ένα σύνηθες πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία
1. Αρχική αποδιάταξη	1-5 λεπτά	95°C
2. Αποδιάταξη	1-2 λεπτά	95°C
3. Υβριδισμός εκκινητών	1 λεπτό	56-63°C
4. Επέκταση 3' εκκινητών	1 λεπτό	72°C
5. Πίσω στο στάδιο 2	29-35 φορές	
6. Τελική επέκταση εκκινητών	10 λεπτά	72°C

III) Όταν το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ολοκληρωθεί, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία 4°C για βραχύ χρονικό διάστημα.

2.4.20 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Μεταλλαγμένοι πλασμιδιακοί φορείς, ή αλληλουχίες DNA προϊόντα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης θα πρέπει να καθαριστούν πριν να χρησιμοποιηθούν για κλωνοποίηση νέων πλασμιδίων. Ο ειδικός αυτός καθαρισμός των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματοποιείται μέσω του QIAquick PCR Purification Kit της εταιρείας Qiagen.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Πέντε όγκοι διαλύματος PB προστίθενται σε 1 όγκο δείγματος PCR αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και το μίγμα αναδεύεται ήπια.

II) Η στήλη εφαρμόζεται στο άνω μέρος του σωλήνα των 2ml, που παρέχει η εταιρία, εναποθέτουμε το διάλυμα και φυγοκεντρούμε σε 8000g για 1 λεπτό. Ο μέγιστος όγκος που μπορεί να συγκρατήσει η στήλη είναι μέχρι και 750μl.

III) Το υγρό που πέρασε από τη στήλη αφαιρείται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο άνω μέρος του σωλήνα της εταιρίας.

IV) Προσθέτουμε στη στήλη 750μl διάλυμα PE και φυγοκεντρούμε σε 9000g για 1 λεπτό.

V) Το υγρό που πέρασε από τη στήλη αφαιρείται και η στήλη τοποθετείται ξανά στο άνω μέρος του σωλήνα της εταιρίας.

VI) Φυγοκεντρήση σε 9000 g για 1 λεπτό προκειμένου να απομακρυνθεί η αιθανόλη του διαλύματος PE

VII) Η στήλη εφαρμόζεται σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και προσθέτουμε 50μl διάλυμα EB στο κέντρο του φίλτρου της στήλης χωρίς να γδάρουμε το φίλτρο με την άκρη της πιπέτας και αφήνουμε να διαποτιστεί το φίλτρο για ένα λεπτό περίπου.

VIII) Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 9000g για 1 λεπτό

IX) Η στήλη αφαιρείται και το έκλουσμα με το DNA φυλάσσεται στους -20°C .

2.4.21 ΔΕΙΚΤΕΣ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ως δείκτες στις ηλεκτροφορήσεις DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικά διαθέσιμοι δείκτες μοριακών μαζών 1 Kb DNA Ladder και 100bp DNA Ladder (Invitrogen). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένας άλλος δείκτης που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μετά από πέψη συγκεκριμένου πλασμιδιακού φορέα (p2017) με τις ενδονουκλεάσες *HindIII* και *XhoI*, αντίστοιχα. Ο δείκτης αυτός ονομάζεται 2017 και διαθέτει ζώνες μεγέθους από 8106 βάσεις ως και 508 βάσεις.

Ως δείκτες στις ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο εμπορικά διαθέσιμος δείκτης μοριακών μαζών SDS-7 (Sigma), που διαθέτει ζώνες μεγέθους 66, 45, 36, 29, 24, 20 και 14 kDa.

2.4.22 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

Η ενεργότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης (πυγολαμπίδας, firefly luciferase, LUC) μπορεί να μετρηθεί από την αντίδραση οξειδωσης του υποστρώματος της λουσιφερίνης παρουσία ενέργειας, κατά την οποία εκλύεται ένα φωτόνιο για κάθε μόριο υποστρώματος λουσιφερίνης που οξειδώνεται. Η έκλυση φωτονίων μετράται από ειδικά φίλτρα απορρόφησης ακτινοβολίας, τα οποία βρίσκονται σε ειδικούς μετρητές φωταύγειας. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του

ενζύμου της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε ο μετρητής φωταύγειας Glomax 20/20 της εταιρίας Promega.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Τοποθετούμε σε σωλήνα Eppendorf 20μl κυτταρικό εκχύλισμα σε 1 x Passive Lysis Buffer (Promega).

II) Προσθέτουμε 100μl αντιδραστηρίου λουσιφερίνης (Luciferase assay reagent) της εταιρίας Promega. Όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να έχουν επωαστεί για τουλάχιστον 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση οξειδωσης του υποστρώματος της λουσιφερίνης πραγματοποιείται αποκλειστικά σε θερμοκρασία δωματίου.

III) Το μείγμα τοποθετείται στην ειδική θέση μέσα στον μετρητή φωταύγειας Glomax 20/20 και αμέσως μετράται η ποσότητα της φωταύγειας.

2.4.23 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΑ ΟΥΡΑΣ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Χρησιμοποιήθηκε βιοψία ουράς ποντικού 10-12 ημερών για γρήγορη ταυτοποίηση ενσωματωμένου DNA σε διαγονιδιακά ποντίκια.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Βιοψία ουράς μήκους 0,5 -1cm τοποθετήθηκε σε σωλήνα Eppendorf που περιείχε 600μl ρυθμιστικού διαλύματος [10mM Tris (pH 7,5) , 400mM NaCl, 100mM EDTA και 0.6% SDS].

II) Στο παραπάνω μείγμα προστέθηκαν 30μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml) και αναδεύτηκε ήπια.

III) Το μείγμα επώαστηκε στους 50°C για 16 ώρες.

IV) Στο μείγμα προστέθηκαν 166,7μl 6MNaCl και αναδεύτηκε σε συσκευή vortex για 20 δευτερόλεπτα

V) Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 8000g και θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

VI) Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα Eppendorf και προστέθηκε ίσος όγκος κρύας αιθανόλης 100%.

VII) Το DNA που κατακρυμνίζεται περιτυλίγεται στο άκρο κλειστής γυάλινης πιπέτας Παστέρ.

VIII) Το DNA πάνω στην γυάλινη πιπέτα Παστέρ, ξεπλένεται με αιθανόλη 70% και αποξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

IX) Η γυάλινη πιπέτα Παστέρ τοποθετείται μέσα σε νέο σωλήνα Eppendorf και το DNA ενυδατώνεται με 200μl TE (pH 8).

2.4.24 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

I) Ανάλογα με τις απαιτήσεις κάθε πειράματος, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα βοθρία, ή τα πλαστικά κυτταρικά δοχεία (φλάσκες F-25, F75, F150).

II) Ξεπλένουμε τα κύτταρα με PBS ανακινώντας απαλά το δοχείο για ένα λεπτό περίπου.

III) Επαναλαμβάνουμε το βήμα II.

IV) Προσθέτουμε στα κύτταρα 1ml PBS και με βοήθεια ξύστρας κυττάρων (cell scraper) τα αποκολλούμε από τον πυθμένα του βοθρίου ή του δοχείου.

V) Συλλέγουμε σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf τα αναδιαλυμένα κύτταρα σε PBS.

VI) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 3000g και 4°C για 10 λεπτά.

VII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα διαλύεται σε 500μl διαλύματος που περιέχει [10mM Tris (pH 7,5) , 400mM NaCl, 100mM EDTA και 0.1% SDS], προσθέτουμε 30μl πρωτεΐνάση K (10mg/ml) με ήπια ανάδευση και επωάζουμε στους 50°C για 16 ώρες

VIII) Προσθέτουμε 140μl 6MNaCl και αναδεύουμε σε συσκευή vortex για 20 δευτερόλεπτα.

IX) Ακολουθεί φυγοκέντρηση του σε 8000g και θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

X) Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωλήνα Eppendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο κρύας ισοπροπανόλης.

XI) Το διάλυμα επωάζεται στους -20°C για 20 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 8000g και 4°C για 10 λεπτά.

XII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα αποξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και επαναδιαλύεται σε 50μl TE (pH 8).

2.4.25 ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ

Η μέθοδος ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης (EMSA – Electrophoretic Mobility Shift Assay) βοηθά στην ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνικών παραγόντων που δεσμεύονται στο DNA ή RNA, καθώς και των αντίστοιχων αλληλουχιών αναγνώρισης του DNA ή RNA, τόσο σε ποιοτικό, όσο και σε ποσοτικό επίπεδο. Πρόκειται για *in vitro* μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την αναγνώριση και προσδιορισμό ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που προσδένονται σε νουκλεοτιδική αλληλουχία κάποιου υποκινητή. Κατά την μέθοδο ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης δημιουργούνται σύμπλοκα μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τα οποία κινούνται, ή καλύτερα μεταναστεύουν πιο αργά απ' ότι οι μη δεσμευμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμιδής ή αγαρόζης. Τα επιλεγμένα DNA ή RNA νουκλεοτίδια σημαίνονται ραδιενεργά με ³²P και επωάζονται με καθαρές πρωτεΐνες, ή με κυτταροπλασματικά, πυρηνικά ή ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στην αντίδραση προστίθενται μη ειδικοί ανταγωνιστές όπως poly(dI/dC), ή σπερμιδίνη σολωμού, για να να περιοριστεί η πρόσδεση μη ειδικών πρωτεϊνών στο ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή DNA ή RNA.

Η ειδικότητα της πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή DNA ή RNA μπορεί να πιστοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος χρησιμοποιεί περίσσεια (200x-400x) μη ραδιενεργά σημασμένο ανιχνευτή DNA ή RNA, κατάλληλη να εξουδετερώσει αποτελεσματικά το σήμα που θα δώσει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-σημασμένου ανιχνευτή. Ο δεύτερος τρόπος απαιτεί την σύνθεση ενός νέου ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή DNA ή RNA, που θα φέρει κάποια αλλαγή σε μία, ή και περισσότερες νουκλεοτιδικές βάσεις. Επώαση σημασμένου μεταλλαγμένου ανιχνευτή με κυτταρικά εκχυλίσματα δε θα πρέπει να δημιουργεί παρόμοια σύμπλοκα μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, όπως στην περίπτωση του αρχικού αυθεντικού ανιχνευτή.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

Παρασκευή μη αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμιδής.4%.

I) Σε σωλήνα Falcon 50 ml προσθέτουμε τα αντιδραστήρια του ΠΙΝΑΚΑ 2.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.5 Αντιδραστήρια για την παραγωγή πηκτώματος πολυακρυαμίδης 4%.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
30% ακρυλαμίδης (29:1)	6,8ml
10xTBE	5ml
10% Υπερθειικό αμμώνιο	0,3ml
TEMED	0,06ml
dH ₂ O	37,84ml
Τελικός όγκος	50ml

II) Χύνουμε προσεκτικά το μίγμα πολυακρυλαμίδης ανάμεσα απο τα τζάμια της συσκευής, που θα πρέπει να έχουν κενό μεταξύ τους 1,5mm.

III) Τοποθετούμε πλαστικό οδηγό θέσεων (χτένα) για σχηματισμό βοθρίων.

IV) Το πήκτωμα πολυμερίζεται για 1 ώρα και ηλεκτροφορεύεται στα 200 Volt για 1 ώρα περίπου σε 0,5x TBE και παράλληλα φορτώνουμε σε ένα βοθρίο μικρή ποσότητα χρωστικής μαζί με γλυκερίνη για να μπορούμε να προσδιορίσουμε αργότερα το μέτωπο του «κρύου» ανιχνευτή. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προσθέτουμε φικόλη αντί για χρωστική που ίσως καταστρέψει πιθανά σχηματισμένα σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης.

Σύνθεση ραδιενεργά σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων

Τα ολιγονουκλεοτίδια σχεδιάσθηκαν ώστε να είναι συμπληρωματικά της υπό μελέτη αλληλουχίας και να φέρουν 5' ελεύθερα άκρα, τα οποία θα συμπληρωθούν με την αντίδραση του ενζύμου Klenow κατά τη ράδιο-σήμανσή τους.

I) Αναμιγνύονται 200pmoles από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο με 10μl ρυθμιστικό διάλυμα 3 (Buffer 3, New England Biolabs) και προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100μl.

II) Το μίγμα θερμαίνεται στους 95°C για 10 λεπτά και αφήνεται να ψυχθεί αργά σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστούν δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια.

III) Στη συνέχεια προστίθενται τα αντιδραστήρια του ΠΙΝΑΚΑ 2.6:

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.6 Αντιδραστήρια για την ραδιοσήμανση του ολιγονουκλεοτιδίου «ανιχνευτή».

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
dCTP (5mM)	2,5μl
dTTP (5mM)	2,5μl
dGTP (5mM)	2,5μl
[α- ³² P] dATP	7,5μl
Όλιγο (2pmole/μl)	5μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Klenow 10x	5μl
Ένζυμο Klenow	1μl
dH ₂ O	24μl
Τελικός όγκος	50μl

IV) Το μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, αραιώνεται μέχρι τελικό όγκο 100μl και διέρχεται από στήλη Sephadex G25 (Amersham, Microspin TM G-25 columns), για να απομακρυνθούν τα ραδιοσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια από τα μη ενσωματωμένα δεοξυριβονουκλεοτίδια.

V) 2μl ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου απορροφόνται σε κομμάτι χαρτιού Whatmann 5mm x 5mm, που τοποθετείται σε ειδικό πλαστικό σωλήνα.

VI) Ο πλαστικός σωλήνας τοποθετείται στη βάση μέτρησης ακτινοβολίας στον ανιχνευτή Perkin-Elmer C384V00 και προσδιορίζεται ο αριθμός κρούσεων πυρηνών ανα λεπτό

Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 4%.

I) Τα δείγματα τοποθετούνται στα βοθρία του πηκτώματος και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 150 Volt σε θερμοκρασία 4°C για 5 ώρες.

II) Το πήκτωμα μεταφέρεται σε διπλό χαρτί Whatman 3mm, καλύπτεται με πλαστική μεμβράνη (Saran wrap) και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

2.4.26 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης είναι μία αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Κατά την πειραματική διαδικασία ακέραια κύτταρα σταθεροποιούνται σε φορμαλδεΰδη, που διασυνδέει και μονιμοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA. Στη συνέχεια το DNA κομματιάζεται σε μικρά κομμάτια με ενζυμική πέψη. Τα ειδικά σύμπλοκα πρωτεΐνης/DNA ανοσοκατακρημνίζονται με ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που προσδένεται στην επιθυμητή αλληλουχία DNA. Μετά την ανοσοκατακρήμνιση αναστρέφεται η σύνδεση μεταξύ πρωτεΐνης και DNA, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με πρωτεϊνάση K και το DNA πολλαπλασιάζεται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, για προσδιορισμό των κομματιών DNA που είχαν προσδεθεί με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος.

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης είναι αρκετά χρήσιμη στη μελέτη της χρωματίνης και τη ρύθμιση της μεταγραφής, εφ' όσον επιτρέπει εντοπισμό πρωτεϊνών χρωματίνης, τροποποιημένες ιστόνες και μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες περιοχές DNA και συγκεκριμένα είδη κυττάρων. Επιπλέον, επειδή οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και DNA σταθεροποιούνται σε ένα ενδογενές, χρωμοσωμικό περιβάλλον, η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης απεικονίζει πλήρως και πιστά την επίδραση της χρωμοσωμικής τοπολογίας και τη δράση των πρωτεϊνών ρύθμισης του κυττάρου. Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, σε αντίθεση με την μέθοδο ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης, είναι μία *in vivo* πειραματική μέθοδος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

Η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης είναι μία τεχνικά απαιτητική πειραματική διεργασία. Για μεγαλύτερη διευκόλυνση και κατανόηση θα αναπτυχθεί στα παρακάτω έξι στάδια. Η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του ChIP-IT Express (Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit, Active Motif)

Στάδιο Α – Χρήση φορμαλδεΰδης σε κύτταρα

Ι) Όταν τα κύτταρα έχουν 70-80% πυκνότητα σε φλάσκα F150 ή πλάκα 15cm διαμέτρου, αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και παράλληλα ετοιμάζουμε τα ακόλουθα τέσσερα διαλύματα.

α) Διάλυμα κυτταρικής σταθεροποίησης: 0,54ml 37% φορμαλδεΰδης σε 20ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορρό. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου.

β) 1xPBS. Επωάζεται στον πάγο.

γ) Διάλυμα γλυκίνης: Ανάμειξη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης, 1ml 10xPBS και 8ml νερό. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου.

δ) Διάλυμα ξύσιμου κυττάρων : Σε 1,8ml νερό προστίθενται 200μl 10xPBS και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο. Αμέσως πριν το βήμα VI προστίθενται 10μl 100mM PMSF.

II) Προσθέτουμε 20ml διαλύματος κυτταρικής σταθεροποίησης και ανακινούμε σταθερά τη φλάσκα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

III) Απορρίπτουμε το διάλυμα κυτταρικής σταθεροποίησης και πλένουμε τα κύτταρα για 10 λεπτά με 10ml κρύου 1xPBS.

IV) Προσθέτουμε 10ml από το διάλυμα γλυκίνης και ανακινούμε σταθερά τη φλάσκα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

V) Απορρίπτουμε το διάλυμα γλυκίνης και πλένουμε τα κύτταρα για 10 λεπτά με 10ml κρύου 1xPBS.

VI) Προσθέτουμε 10μl 100mM PMSF στο διάλυμα ξύσιμου κυττάρων. Το διάλυμα χύνεται στα κύτταρα και με τη βοήθεια μίας μεγάλης πλαστικής ξύστρας κυττάρων, συλλέγουμε τα κύτταρα σε σωλήνα Falcon 15ml.

VII) Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 1000g και 4°C για 10λεπτά.

VIII) Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα μπορεί να διατηρηθεί στους -80 °C.

Στάδιο Β – Διάτμηση χρωματίνης με ενζυμική πέψη

I) Τα κύτταρα του ιζήματος αναδιαλύονται σε 1ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης κυττάρων (Lysis Buffer), το οποίο παρέχει η εταιρία.

II) Τα κύτταρα μεταφέρονται σε κρύο ομογενοποιητή και με 10 ελαφριά χτυπήματα απελευθερώνονται οι κυτταρικοί πυρήνες.

III) Το μίγμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf 1,5ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 2400g και 4°C για 10λεπτά.

IV) Απορρίπτεται προσεκτικά το υπερκείμενο. Το ίζημα που περιέχει τους πυρήνες αναδιαλύεται σε 350μl διάλυμα πέψης (Digestion Buffer), που παρέχεται από την εταιρεία και το μίγμα

επωάζεται στους 37°C για 5 λεπτά, παρουσία 1,75μl αναστολέων πρωτεασών (PIC) και 1,75μl PMSF.

V) Προσθέτουμε 17μl διάλυμα ενζυμικής διάτμησης (Enzymatic Shearing Cocktail 200U/μl), αναδεύουμε σε συσκευή vortex και επωάζουμε στους 37°C για 12 λεπτά ακριβώς με συχνή ανάδευση κατά το χρόνο επώασης.

VI) Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση, σταματάμε την αντίδραση ενζυμικής διάτμησης, προσθέτουμε 7μl κρύου 0,5M EDTA και το μείγμα επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά.

VII) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 9000g και 4 °C για 10 λεπτά.

VIII) Συλλέγεται το υπερκείμενο που περιέχει όλη τη χρωματίνη και μεταφέρουμε 50μl απο το διάλυμα σε νέο σωλήνα Eppendorf και φυλάσσεται ως ποιοτικός έλεγχος της μεθόδου. Το συγκεκριμένο δείγμα δε θα ανοσοκατακρημνιστεί με κάποιο αντίσωμα και θα ονομαστεί input DNA. Το υπόλοιπο διάλυμα της κατακερματισμένης χρωματίνης (350μl) φυλάσσεται στους -80 °C

Στάδιο Γ – Ανοσοκατακρήμνιση

I) Αναδιαλύονται τα ακόλουθα αντιδραστήρια(ΠΙΝΑΚΑΣ 2.7)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.7 Αντιδραστήρια για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Μαγνητικά Σφαιρίδια πρωτεΐνης G	25μl
Διάλυμα ChIP 1	10μl
Χρωματίνη	20-60μl
Αναστολείς πρωτεασών (PIC)	1μl
dH ₂ O	έως τελικού όγκου 100μl
Αντίσωμα	3μg
Τελικός όγκος	100μl

Το αντίσωμα προστίθεται πάντα στο τέλος

II) Το μείγμα τοποθετείται πάνω σε αυτόματο περιστρεφόμενο τροχό και επωάζεται για 4 ώρες σε θερμοκρασία 4°C

III) Γρήγορη φυγοκέντρηση του μείγματος.

IV) Ο σωλήνας τοποθετείται πάνω σε μαγνήτη για να κατακρημνιστούν τα μαγνητικά σφαιρίδια.

V) Αφαιρείται προσεκτικά το υπερκείμενο.

Στάδιο Δ – Πλύση μαγνητικών σφαιριδίων

I) Τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται με 800μl διαλύματος ChIP 1.

II) Τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται με 800μl διαλύματος ChIP 2.

III) Τα μαγνητικά σφαιρίδια πλένονται ξανά με 800μl διαλύματος ChIP 2.

IV) Απορρίπτουμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο, χωρίς να διαταράξουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια.

Στάδιο Ε – Έκλουση χρωματίνης

I) Τα μαγνητικά σφαιρίδια αναδιαλύονται σε 50μl διαλύματος έκλουσης AM2 (Elution Buffer AM2).

II) Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

III) Γρήγορη φυγοκέντρηση του μείγματος.

IV) Στο μείγμα προστίθενται 50μl διαλύματος αναστρέψιμης διασύνδεσης (Reverse Cross-Linking Buffer) και αμέσως ο σωλήνας τοποθετείται πάνω σε μαγνήτη για να κατακρημνιστούν τα μαγνητικά σφαιρίδια.

V) Αφαιρούμε προσεκτικά όλο το υπερκείμενο, χωρίς να διαταράξουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια. Το υπερκείμενο περιέχει όλη τη χρωματίνη και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα Eppendorf.

VI) Χρησιμοποιούμε 10μl από το input DNA και προσθέτουμε σε αυτό, 88μl διαλύματος ChIP 2 και 2μl 5M NaCl, αντίστοιχα.

VII) Η ανοσοκατακρημνισμένη χρωματίνη και το input DNA επωάζονται στους 95°C για 15 λεπτά. .

VIII) Το μίγματα αφήνονται να ψυχθούν αργά σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 2μl πρωτεΐνωση K και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για μία ώρα.

IX) Τα μίγματα αφήνονται να ψυχθούν αργά μέχρι θερμοκρασίας δωματίου και με την πρόσθεση 2μl διαλύματος Proteinase K Stop, διακόπτεται η ενζυματική ενεργότητα της πρωτεΐνάσης K.

X) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε ψηλές στροφές.

XI) Τα δυο μίγματα DNA είναι έτοιμα για PCR, ή μπορούν να διατηρηθούν στους -20 °C.

Στάδιο ΣΤ – Ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

I) Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης τόσο στα δείγματα της ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης, όσο και στο δείγμα input DNA.

Συνιστάται ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης να είναι 25μl και να αραιωθεί το input DNA τουλάχιστον 1000 φορές πριν χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο για την αντίδραση.

II) Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σχεδιάζεται και εκτελείται κανονικά, όπως σε όλες τις άλλες πειραματικές διεργασίες, προσέχοντας πάντα τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με την χρωματίνη (DNA).

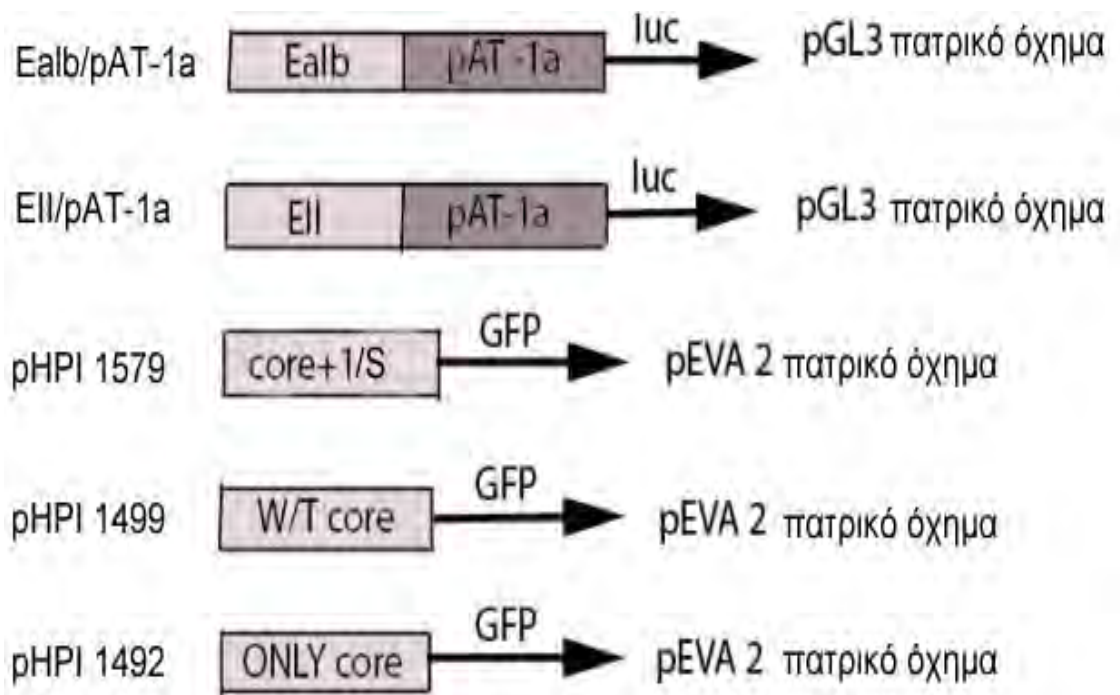
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE/CORE+1 ΜΕ ΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.

3.1.1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΜΕ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΕΣ.

Μελετήθηκε η άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση των ιϊκών πρωτεϊνών core και core+1 της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a με ηπατικούς χιμαιρικούς υποκινητές για να προσδιοριστεί ο πιθανός ρόλος τους σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο χιμαιρικούς ενισχυτές/υποκινητές, ο υποκινητής της α1-αντιτρυψίνης συνδεδεμένος με ενισχυτές αλβουμίνης ποντικού και ηπατίτιδας Β (ΕΙΚΟΝΑ 3.1), που είναι ενσωματωμένοι σε πλασμίδιο pGL3-Basic πριν από το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης για κατάλληλη και εύκολη ανίχνευση αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης σε ευθεία συνάρτηση με τη συγκέντρωση των ιϊκών πρωτεϊνών (χορηγία Δρ. Reuben Fernandez- Alcoceba, στα πλαίσια συνεργασίας σε μεγάλο ευρωπαϊκό πρόγραμμα Thonlen). Διαμολύνθηκαν διάφορες ηπατικές και μη κυτταρικές σειρές (Hep3B, Huh-7, HepG2, BHK-21). Οι ιϊκές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η W/T core, η only core και η core+1/S. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο των πλασμιδίων η πρωτεΐνη only core είναι μία μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης core. Η κωδική αλληλουχία της φέρει κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης +1, με συνέπεια να έχουμε έκφραση μόνο της καψιδιακής core και να είναι αδύνατη η παραγωγή της πρωτεΐνης core+1. Οι κωδικές αλληλουχίες υπεύθυνες για την έκφρασή τους είναι ενσωματωμένες σε πλασμίδιο pEUA2. Το πατρικό όχημα pEUA2 επιλέχτηκε διότι φέρει εσωτερικό γονίδιο αναφοράς της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP, που διευκολύνει τον έλεγχο των επιμολύνσεων.



ΕΙΚΟΝΑ 3.1. Χιμαιρικοί ενισχυτές/υποκινητές και πλασμίδια έκφρασης ιικών πρωτεϊνών.

Στις συνδιαμολύνσεις που πραγματοποιήθηκαν τα επίπεδα συγκέντρωσης DNA των χιμαιρικών υποκινητών διατηρήθηκαν σταθερά, ενώ τα επίπεδα συγκεντρώσεων DNA των πλασμιδίων έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών μεταβάλλονταν, αλλά πάντα σε σταθερή αναλογία με τις συγκεντρώσεις των πρώτων. Σχεδόν όλες οι συνεπιμολύνσεις των κυττάρων έγιναν με χρήση jetPEI (Polyplus) και στις αρχικές πειραματικές διεργασίες με λιποφεκταμίνη (Invitrogen).

Ακολουθεί η αναφορά των συγκεντρώσεων και των αναλογιών των ιικών πλασμιδίων ως προς τα πλασμίδια των υποκινητών σε όλες τις συνεπιμολύνσεις στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές (ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1). Στις γραφικές παραστάσεις που θα ακολουθήσουν για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λουσιφεράσης, στο κάτω μέρος κάθε δείγματος-στήλης θα αναγράφεται η αναλογία ποσότητας του ιικού πλασμιδίου ως προς την αντίστοιχη ποσότητα του πλασμιδίου του υποκινητή, ή μόνο η ποσότητα του ιικού πλασμιδίου, που χρησιμοποιήθηκε.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 Αναλογίες και ποσότητες ιικών πλασμιδίων ως προς τα πλασμίδια των υποκινητών. Η ποσότητα του πατρικού πλασμιδίου pEUA2 προστίθεται για να εξομαλύνει και να διατηρήσει σταθερή την τελική ποσότητα του ολικού πλασμιδιακού DNA που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε συνδιαμόλυνση.

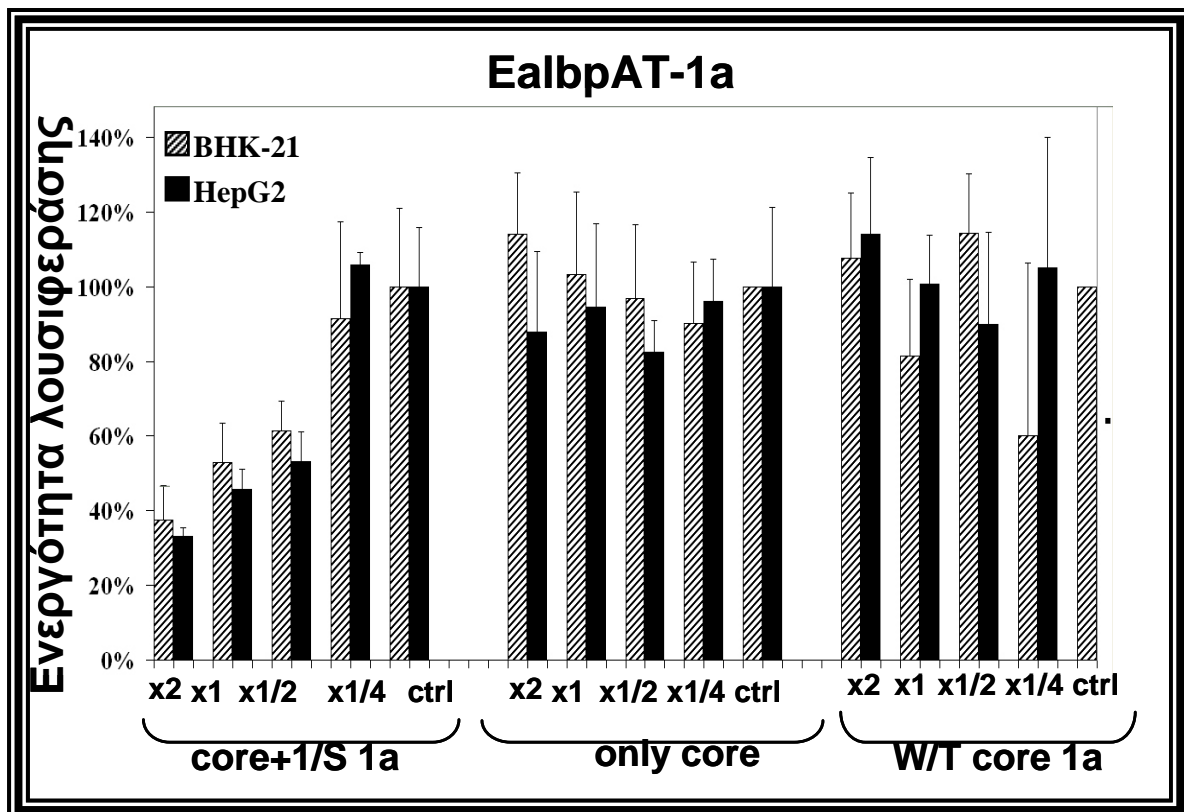
αναλογία	ϊικό πλασμίδιο	πλασμίδιο υποκινητή	πλασμίδιο pEUA2	ολικό DNA
x2	3μg	1,5μg	-	4,5μg
x1	1,5μg	1,5μg	1,5μg	4,5μg
x1/2	0,75μg	1,5μg	2,25μg	4,5μg
x1/4	0,375μg	1,5μg	2,625μg	4,5μg
ctrl	-	1,5μg	3μg	4,5μg

Επιπλέον όλες οι συνδιαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί σε βοθρία με διάμετρο 14mm (3,8cm²) δωδεκάτρυπου κυτταρικού δοχείου (ΕΙΚΟΝΑ 3.2) Τα συνδιαμολυσμένα κύτταρα συλλέγησαν μετά από 48 ώρες και υπέστησαν λύση μετά από κατεργασία με διάλυμα 1x Passive Luciferase Buffer (Promega).

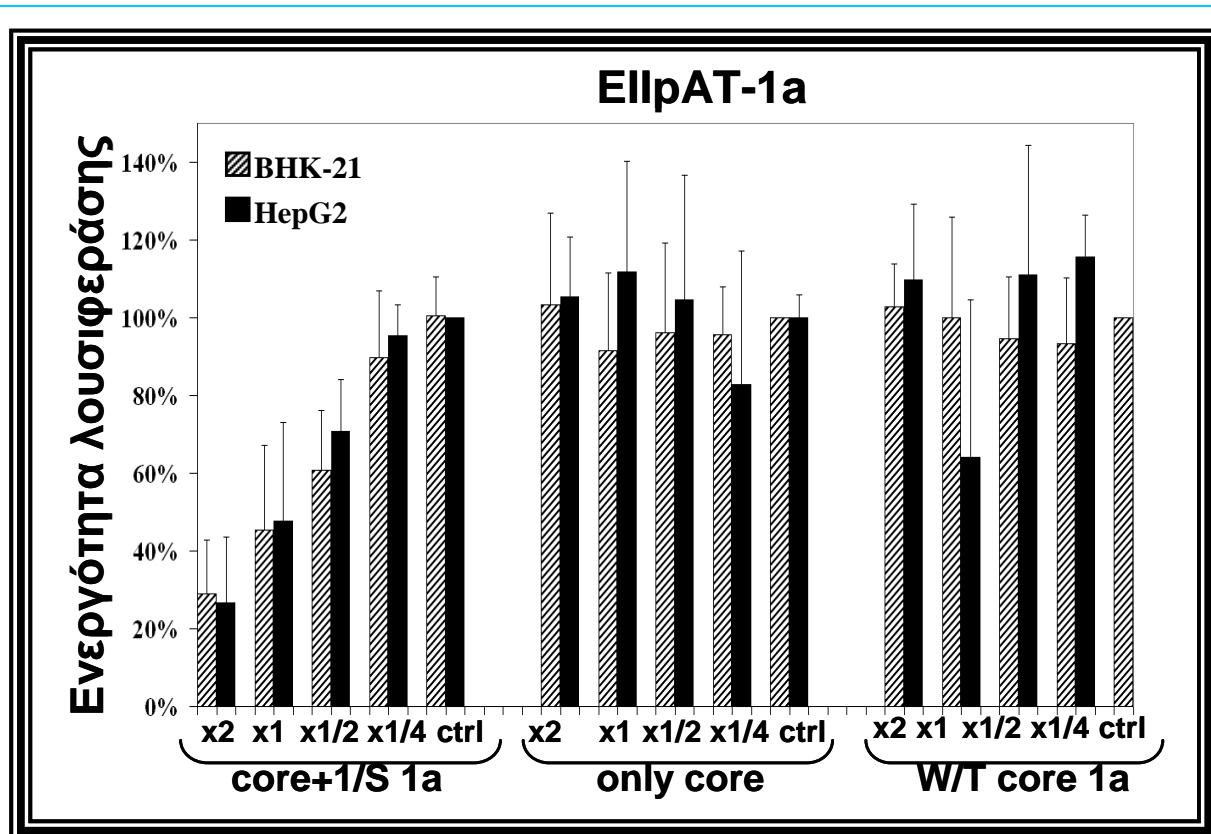


ΕΙΚΟΝΑ 3.2 Ένα δωδεκάτρυπο κυτταρικό δοχείο. Αριστερά του ένα εξάτρυπο, ενώ δεξιά του ένα εισοσιτετράτρυπο κυτταρικό δοχείο.

Ακολουθούν οι γραφικές παραστάσεις προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης από συνεπιμόλυνση ηπατικών (HepG2) και μη ηπατικών κυττάρων (BHK-21) κυττάρων με ιικά πλασμίδια που φέρουν κωδικές αλληλουχίες για την έκφραση των πρωτεϊνών core, core+1 και πλασμιδίων που περιέχουν χιμαιρικούς υποκινητές (ενισχυτής αλβουμίνης/υποκινητής αντιπρυψίνης EalbpAT-1α στην ΕΙΚΟΝΑ 3.3 και ενισχυτής ιού ηπατίτιδας Β/υποκινητής αντιπρυψίνης EllpAT-1α στην ΕΙΚΟΝΑ 3.4).



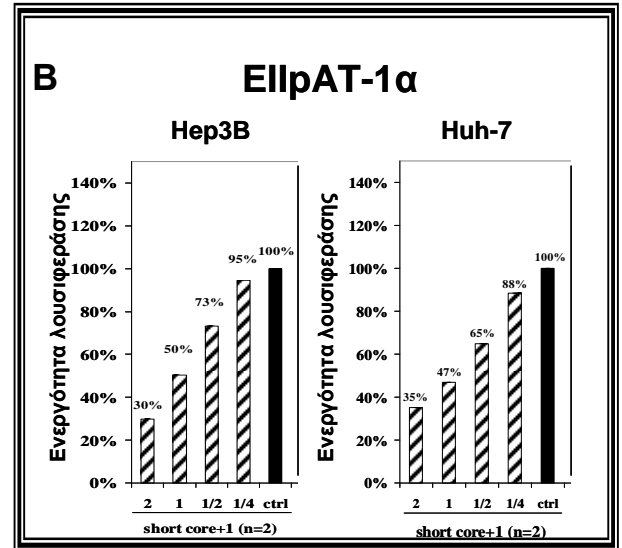
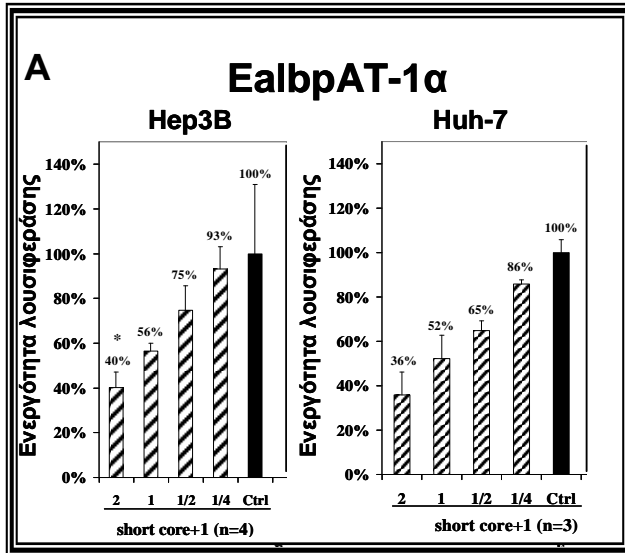
ΕΙΚΟΝΑ 3.3. Ενεργότητα χιμαιρικού υποκινητή EalbpAT-1α σε ηπατικά και μη κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Ηπατικές (HepG2; μαύρη στήλη) και μη ηπατικές (BHK-21; στήλη με ρίγα) κυτταρικές σειρές συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον ενισχυτή αλβουμίνης/υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης (EalbpAT-1α) και ιικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον ηπατικό χιμαιρικό υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα λουσιφεράσης που παρήχθησαν από παροδική διαμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Η αναλογία της συγκέντρωσης κάθε ιικού πλασμιδίου με τη συγκέντρωση του αντίστοιχου υποκινητή αναγράφεται κάτω από κάθε στήλη. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών.



ΕΙΚΟΝΑ 3.4 Ενεργότητα χιμαιρικού υποκινητή EIIpAT-1a σε ηπατικά και μη κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Ηπατικές (HepG2; μαύρη στήλη) και μη ηπατικές (BHK-21; στήλη με ρίγα) κυτταρικές σειρές συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον ενισχυτή της του ιού της ηπατίτιδας Β/υποκινητή της α1-αντιτρυψίνης (EIIpAT-1a) και ιικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον ηπατικό χιμαιρικό υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από παροδική διαμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Η αναλογία της συγκέντρωσης κάθε ιικού πλασμιδίου με τη συγκέντρωση του αντίστοιχου υποκινητή αναγράφεται κάτω από κάθε στήλη. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών.

Από τις παραπάνω εικόνες συμπεραίνουμε ότι σε συνδιαμολύνσεις κυτάρων BHK-21 και HepG2 με χιμαιρικούς ενισχυτές/υποκινητές EIIpAT-1a και EIIpAT-1a του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης κλωνοποιημένου σε πλασμίδιο pHP1 1579, που περιέχει την κωδική αλληλουχία για την έκφραση της ιικής πρωτεΐνης core+1/S παρατηρήθηκε σημαντικότερη δόσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων λουσιφεράσης ανάλογη με την αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης core +1/S. Ανάλογο αποτέλεσμα δεν παρουσιάστηκε στις επιμολύνσεις με τα πλασμίδια έκφρασης της πρωτεΐνης W/T core ή only core. Το παραπάνω φαινόμενο μείωσης της μεταγραφικής ενεργότητας των δύο χιμαιρικών υποκινητών παρουσία της ιικής πρωτεΐνης core+1/S, παρατηρήθηκε σε συνδιαμολύνσεις ηπατικών κυτάρων Huh-7 και

Hep3B (EIKONA 3.5 A και B). Αντίθετα η έκφραση της πρωτεΐνης W/T core ή only core δεν φαίνεται να επηρρέασε τη μεταγραφική ισχύ των χιμαιρικών υποκινητών.



EIKONA 3.5 . Ενεργότητα χιμαιρικών υποκινητών EalbpAT-1α (A) και EllpAT-1α (B) σε ηπατικά κύτταρα Hep3B και Huh-7 παρουσία πρωτεΐνης core+1/S. Η επαγόμενη λουσιφεράση από κάθε χιμαιρικό υποκινητή, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S (στήλη με ρίγα) συγκρίθηκε με την λουσιφεράση που παρήχθει από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2 (μαύρη στήλη, ctrl). Η αναλογία της συγκέντρωσης κάθε ιϊκού πλασμιδίου με τη συγκέντρωση του αντίστοιχου υποκινητή αναγράφεται κάτω από κάθε στήλη. Επίσης, με το γράμμα 'n=' στο κάτω μέρος κάθε γραφικής παράστασης συμβολίζεται ο αριθμός των ανεξάρτητων επαναλήψεων του πειράματος.

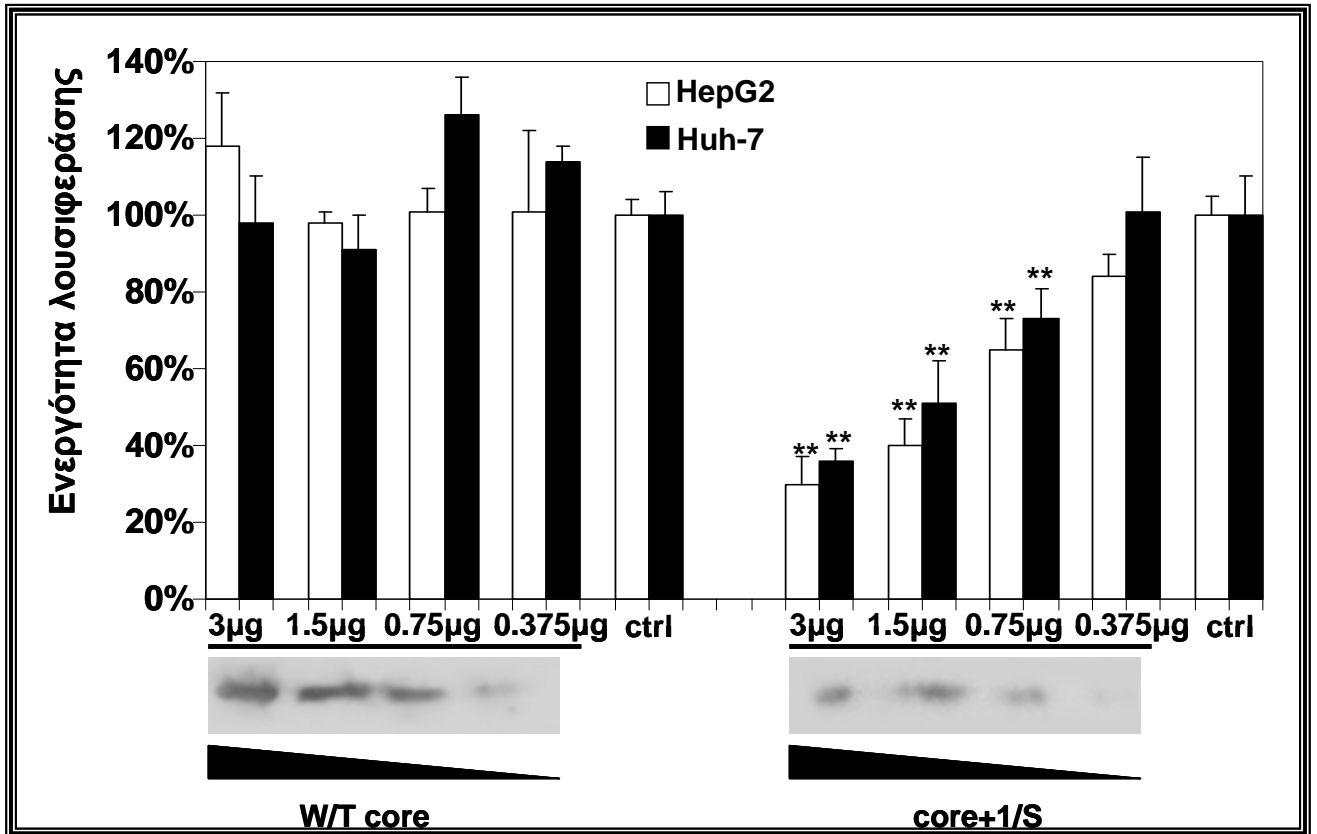
Τα πρώτα αυτά ενδεικτικά πειράματα πλοήγησης, μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a επηρεάζει αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα των χιμαιρικών ενισχυτών/υποκινητών του ανθρώπινου γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης. Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό να αναφέρουμε ότι το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρείται παρουσία πρωτεΐνης core, η οποία είναι η κατεξοχήν ιϊκή πρωτεΐνη μεταγραφικής ρύθμισης του ιού της ηπατίτιδας Γ.

3.1.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η μείωση των επιπέδων λουσιφεράσης και των δύο χιμαιρικών υποκινητών παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατιτίδας Γ, εντοπίστηκε στον κοινό υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης και όχι στους αντίστοιχους ενισχυτές Ealb και EII.

Έτσι, χρησιμοποιώντας ως πατρικό όχημα και DNA εκμαγείο τον χιμαιρικό ενισχυτή/υποκινητή EalbrAT-1α, πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την απομόνωση και πολλαπλασιασμό του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης. Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pGL3-Basic και συζεύκτηκε με το γονίδιο της λουσιφεράσης.

Ακολούθησε παροδική επιμόλυνση κυττάρων HepG2 και Huh-7 με τα ιϊκά πλασμίδια pHPI 1499 (W/T core), pHPI 1579(core+1/S) και το νέο πλασμίδιο που φέρει μόνο την κωδική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης (ΕΙΚΟΝΑ 3.6). Επιπλέον, ένα μέρος των συνδιαμολυσμένων κυττάρων HepG2 χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των παραγόμενων ιϊκών πρωτεϊνών στις διάφορες συγκεντρώσεις, μέσω ανοσοσύτωσης τύπου Western. Ειδικότερα για την ανίχνευση της πρωτεΐνης W/T core παρασκευάστηκε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης 12% και χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα mAb core C750 (Alexis) έναντι της πρωτεΐνης core. Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης core+1/S παρασκευάστηκε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης 14% και χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα NK 1 (Βασιλάκη Ν.).



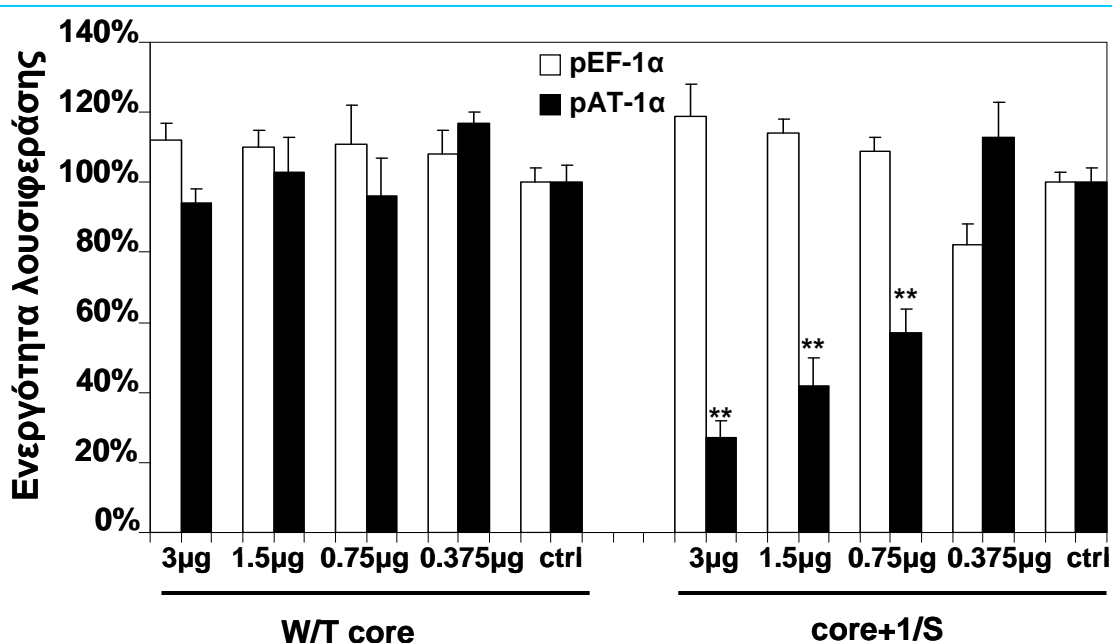
ΕΙΚΟΝΑ 3.6. Ενεργότητα υποκινητή γονιδίου α1-αντιπρυψίνης σε ηπατικά κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Ηπατικές κυτταρικές σειρές (HepG2; λευκή στήλη και Huh-7; μαύρη στήλη) συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης και με πλασμίδια έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον ηπατικό υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Κάτω από κάθε στήλη αναγράφεται η ποσότητα κάθε ιικού πλασμιδίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$).

Παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων λουσιφεράσης του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης παρουσία της ιικής πρωτεΐνης core+1. Η μείωση αυτή ήταν ανάλογη με την αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης core +1/S στα κύτταρα όπως φαίνεται και από την ανοσοσύτπωση τύπου Western. Αντίστοιχη μείωση δεν παρατηρήθηκε παρουσία ιικής πρωτεΐνης W/T core. Επομένως, είναι φανερό ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1/S του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a, μειώνει σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε περιβάλλον παροδικά επιμολυσμένων ηπατικών κυττάρων.

3.1.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ.

Για να διερευνηθεί η ειδικότητα του παραπάνω φαινομένου για τον συγκεκριμένο υποκινητή πραγματοποιήθηκε ανεξάρτητο πείραμα, με τον υποκινητή του γονιδίου EF-1α (pHPI 8101), που απαντά στα περισσότερα είδη κυττάρων σε μεγάλη περίσσεια. Ηπατικά κύτταρα HepG2 συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που έφεραν τους υποκινητές των γονιδίων EF-1α και AT-1α, αντίστοιχα μαζί με τα πλασμίδια που φέρουν τις κωδικές αλληλουχίες έκφρασης των πρωτεϊνών W/T core και core+1/S.

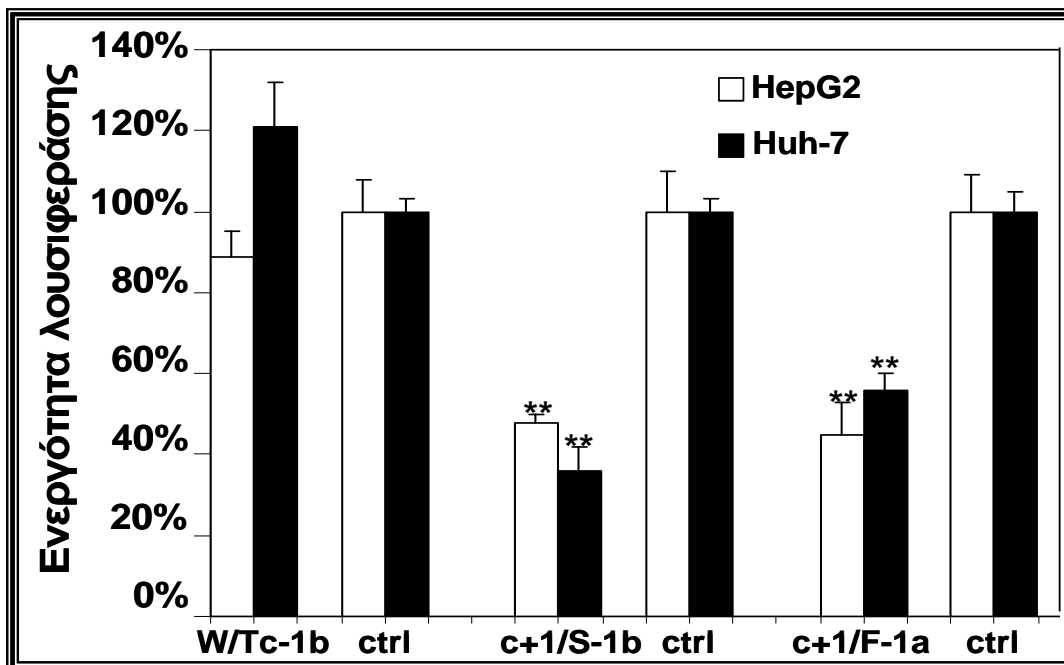
Καμμία ιϊκή πρωτεΐνη δεν φάνηκε να επηρεάζει τη δράση του υποκινητή του γονιδίου του EF-1α. Αντίθετα η δράση του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης μειώθηκε παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S, γεγονός που συνηγορεί για την ειδικότητά της στη ρύθμιση του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.7. Ενεργότητα υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε σχέση με την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου EF-1α σε ηπατικά κύτταρα παρουσία πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ. Ηπατικά κύτταρα HepG2 συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τους αναφερόμενους υποκινητές και ιϊκές πρωτεΐνες. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον κάθε υποκινητή παρουσία ιϊκών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Κάτω από κάθε στήλη αναγράφεται η ποσότητα κάθε ιϊκού πλασμιδίου. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$).

3.1.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1b ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το παραπάνω φαινόμενο με τις ιικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατιτίδας Γ με γονότυπο 1b. Ειδικότερα συνεπιμολύνθηκαν κύτταρα HepG2 και Huh-7 με το πλασμίδιο-υποκινητή του γονιδίου της α1- αντιτρυψίνης και με πλασμίδια που κατασκευάστηκαν πρόσφατα στο εργαστήριο και περιέχουν τις κωδικές αλληλουχίες για την έκφραση των πρωτεϊνών W/T core και core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b. Παράλληλα, συνδιαμολύνθηκαν κύτταρα HepG2 και με το πλασμίδιο pHPI 1493, που περιέχει την κωδική αλληλουχία για την έκφραση της πρωτεΐνης core+1/F.



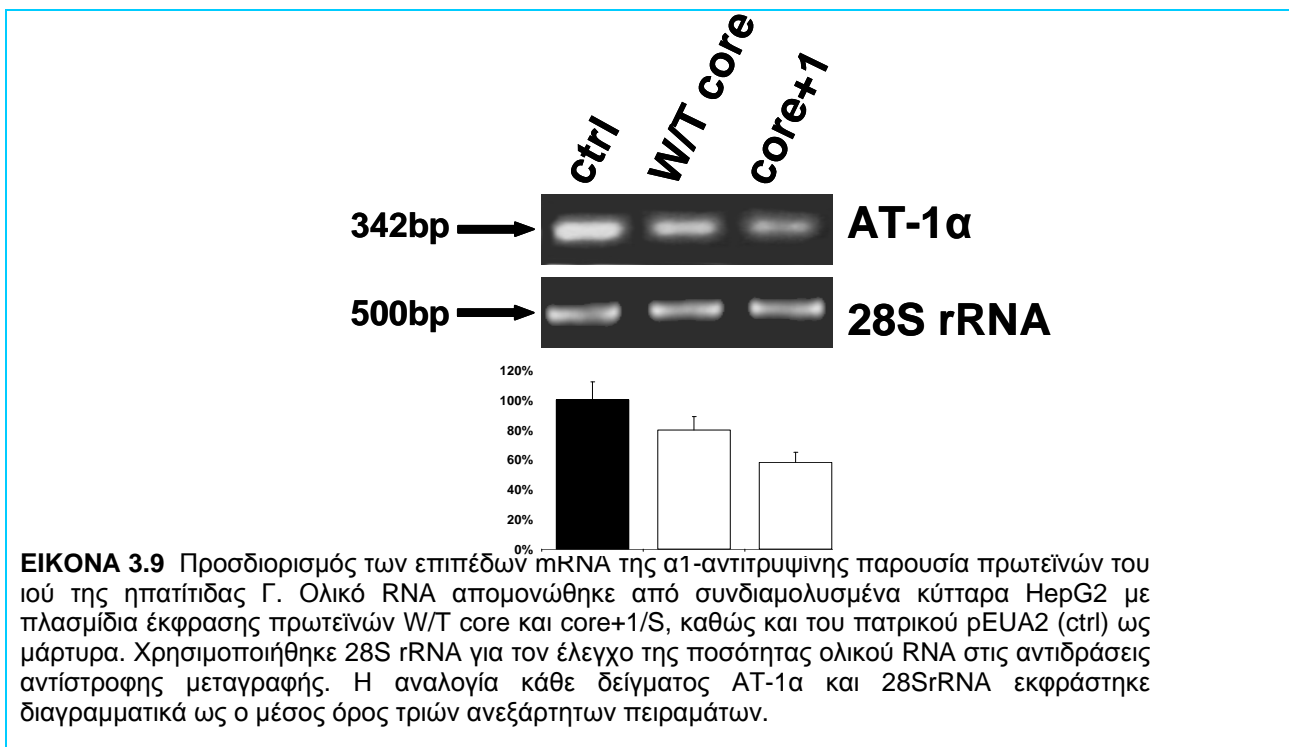
ΕΙΚΟΝΑ 3.8. Ενεργότητα υποκινητή γονιδίου α1-αντιτρυψίνης σε ηπατικά κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Ηπατικές κυτταρικές σειρές (HepG2; λευκή στήλη και Huh-7; μάρμη στήλη) συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον υποκινητή της α1-αντιτρυψίνης, με πλασμίδια έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S του ιού της ηπατιτίδας Γ με γονότυπο 1b, καθώς και της πρωτεΐνης core+1/F με γονότυπο 1a. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον κάθε υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Χρησιμοποιήθηκαν 3μg από κάθε ιικό πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, P < 0.005; *, P < 0.05).

Η μείωση στα επίπεδα της λουσιφεράσης του υποκινητή ήταν κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών core+1/S και των δύο γονοτύπων 1a και 1b του ιού της ηπατίτιδας Γ (ΕΙΚΟΝΑ 3.8). Πράγματι όπως φαίνεται στη γραφική παράσταση παρατηρήθηκε 52% μείωση της ενεργότητας της λουσιφεράσης σε κύτταρα HepG2 συνδιαμολυσμένα με 3μg πλασμιδίου έκφρασης core+1/S

με γονότυπο 1b. Η παρατήρηση αυτή επαναλαμβάνεται και στην κυτταρική σειρά Huh-7 (44% μείωση). Η έκφραση της πρωτεΐνης W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην δράση του υποκινητή. Επιπλέον, μία άλλη μορφή της πρωτεΐνης core+1, η core+1/F του ιού με γονότυπο 1a, ακολουθεί το ίδιο μοτίβο μείωσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή, όπως παρατηρείται στην περίπτωση της πρωτεΐνης core+1/S και των δύο γονοτύπων 1a και 1b του ιού της ηπατίτιδας Γ.

3.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ 1Α ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΣΤΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε το φαινόμενο ακόμη περισσότερο προσδιορίσαμε το ενδογενές επίπεδο mRNA α1-αντιτρυψίνης, παρουσία ιικών πρωτεϊνών core και core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a, με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).

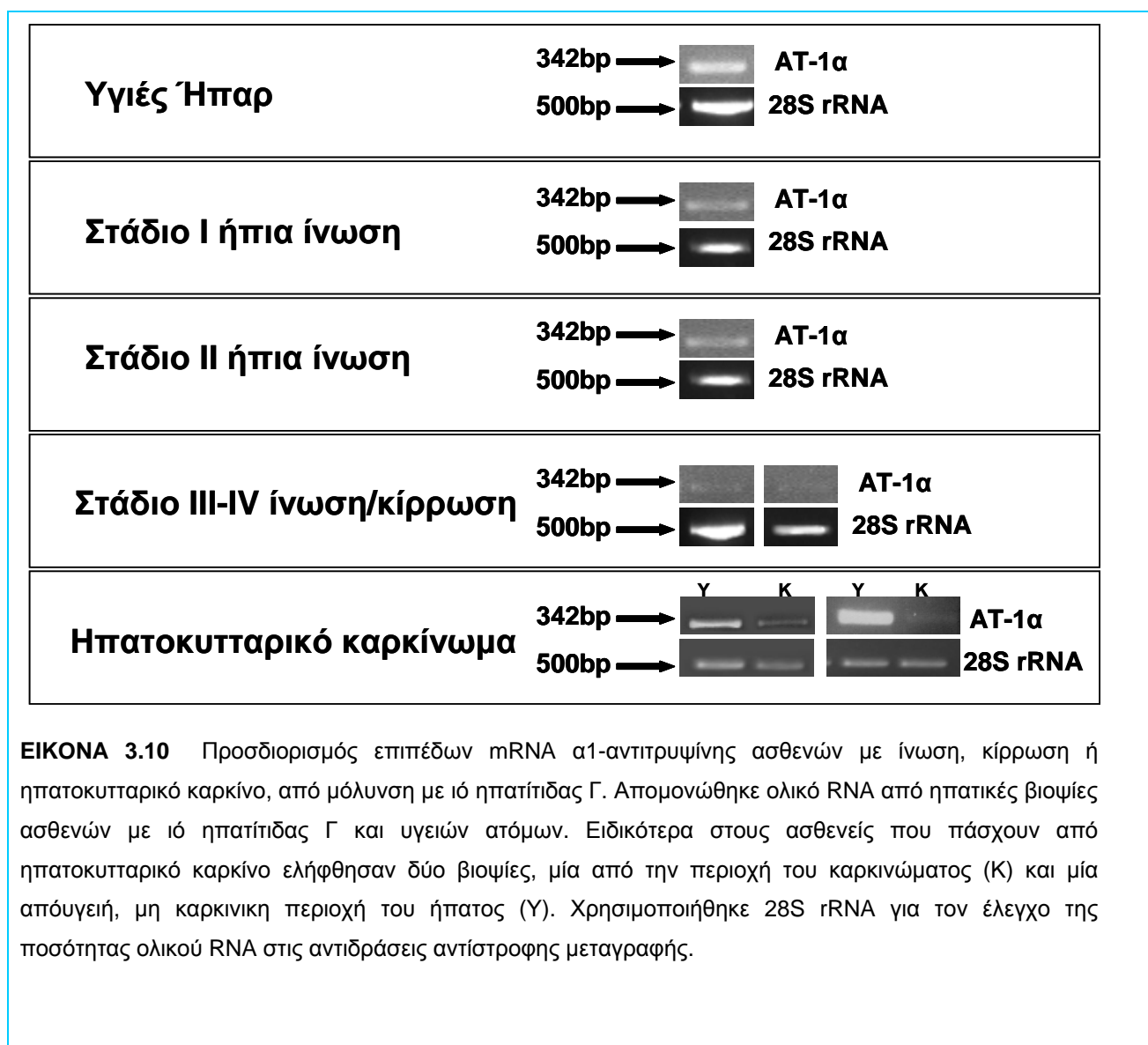


Μείωση παρατηρήθηκε επίσης στο ενδογενές επίπεδο mRNA α1-αντιτρυψίνης στα ηπατικά κύτταρα HepG2, όπως αναλύθηκε με τη χρήση συνδυασμού αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΕΙΚΟΝΑ 3.9). Βρέθηκε ότι ο μέσος όρος των ενδογενών επιπέδων mRNA α1-αντιτρυψίνης τριών ανεξάρτητων διαμολύνσεων κυττάρων HepG2 ήταν πάνω από δύο φορές μειωμένος παρουσία πρωτεΐνης core+1/S και όχι πρωτεΐνης W/T core.

Επομένως τα παραπάνω αποτελέσματα μαρτυρούν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης core+1/S οδηγεί σε μείωση του επιπέδου της α1-αντιτρυψίνης σε επίπεδο μεταγραφής.

3.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ 1a ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΣΤΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ.

Παράλληλα με την παραπάνω πειραματική διεργασία ανιχνεύτηκε το ενδογενές επίπεδο mRNA της α1-αντιτρυψίνης, σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με κίρρωση ήπατος, ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.10 Προσδιορισμός επιπέδων mRNA α1-αντιτρυψίνης ασθενών με ίνωση, κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο, από μόλυνση με ιό ηπατίτιδας Γ. Απομονώθηκε ολικό RNA από ηπατικές βιοψίες ασθενών με ιό ηπατίτιδας Γ και υγιών ατόμων. Ειδικότερα στους ασθενείς που πάσχουν από ηπατοκυτταρικό καρκίνο ελήφθησαν δύο βιοψίες, μία από την περιοχή του καρκινώματος (Κ) και μία από υγιή, μη καρκινική περιοχή του ήπατος (Υ). Χρησιμοποιήθηκε 28S rRNA για τον έλεγχο της ποσότητας ολικού RNA στις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής.

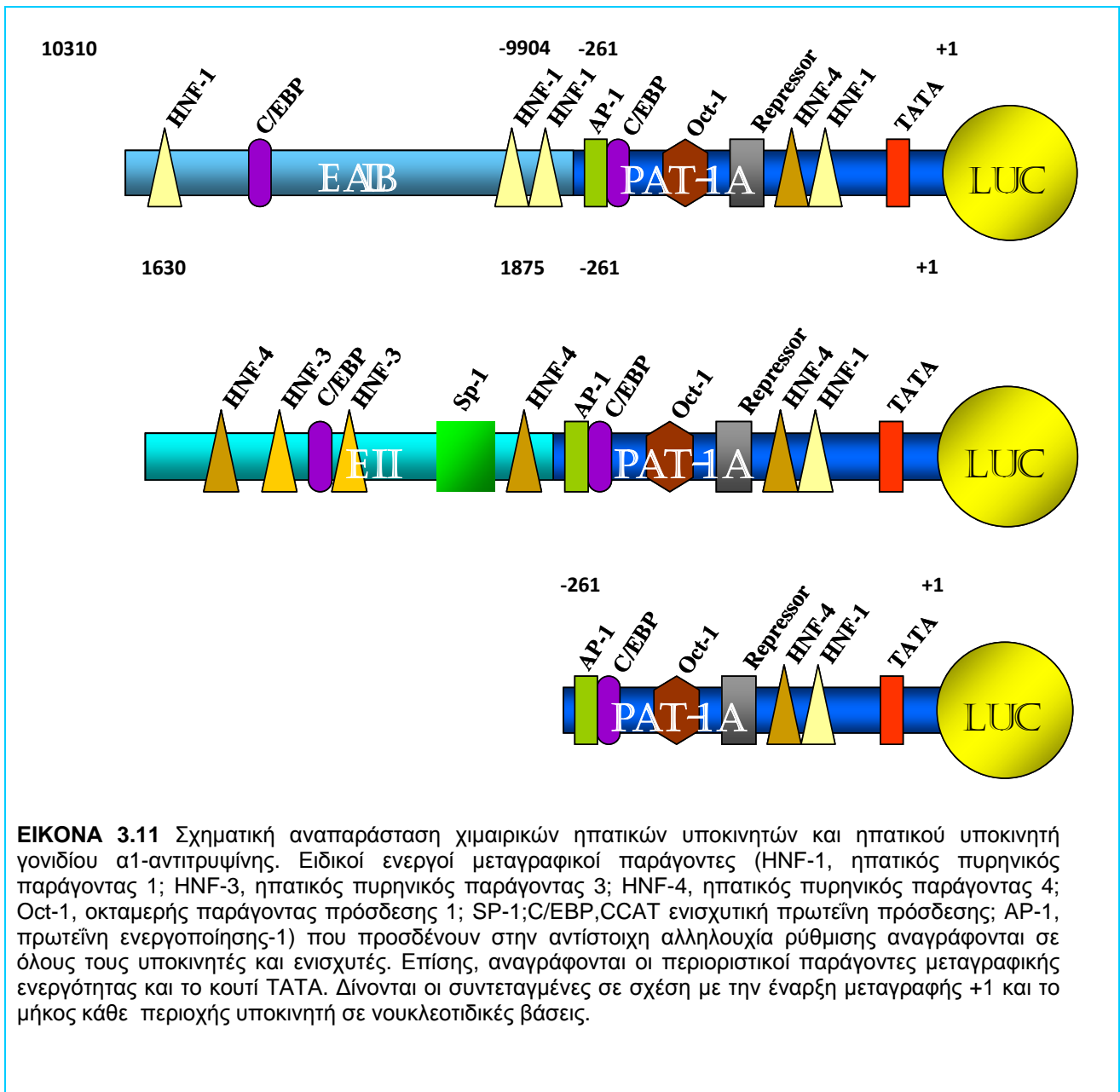
Παρατηρήθηκε μείωση του ενδογενούς επιπέδου mRNA α1-αντιτρυψίνης σε ηπατικές βιοψίες ασθενών με κίρρωση του ήπατος με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (ΕΙΚΟΝΑ 3.10). Επιπλέον παρατηρήθηκε δραματική μείωση του επιπέδου mRNA α1-αντιτρυψίνης σε βιοψίες καρκίνου ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο, σε σχέση με βιοψίες παρακείμενου υγιούς, μη καρκινικού ηπατικού ιστού των ιδίων ασθενών.

3.1.7 Η CORE+1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ HCV 1Α ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ ΜΕΣΩ C/EBP.

Η σημασία των επόμενων πειραμάτων ήταν να αναγνωριστούν τα ενεργά cis- και trans-στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της α1- αντιτρυψίνης που απορρυθμίζονται παρουσία ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S.

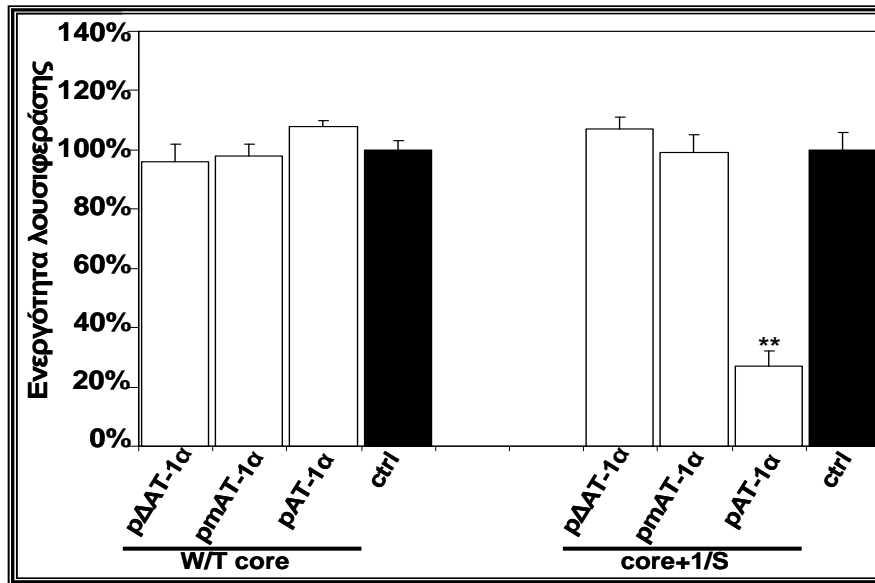
Προηγούμενες μελέτες που διενεργήθηκαν αρχές της δεκαετίας του '90, έδειξαν ότι υπάρχει ένα στοιχείο που βρίσκεται στις 100 πρώτες νουκλεοτιδικές βάσεις (από -137 έως και -37) πριν από το κουτί TATA και ευθύνεται για το υψηλό επίπεδο μεταγραφικής ενεργότητας και ιστοειδικότητας του υποκινητή του γονιδίου της α1- αντιτρυψίνης. Επιπλέον, αναγνωρίστηκαν και άλλα στοιχεία θετικής ρύθμισης της μεταγραφικής δράσης 200 περίπου βάσεις πριν από το κουτί TATA του υποκινητή (από -261 έως -208) με δομικές ομοιότητες αντίστοιχες με στοιχεία υποκινητών άλλων ηπατικών γονιδίων.

Χρησιμοποιήσαμε δύο λογισμικά προγράμματα πρόβλεψης μεταγραφικών παραγόντων ενός υποκινητή (TESS και MatInspector) για να καταγράψουμε όλα τα πιθανά cis- και trans-ενεργά στοιχεία του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης. Προς χάρη της ολοκλήρωσης και ακεραιότητας, δίνονται και οι χάρτες των μεταγραφικών παραγόντων των αρχικών χιμαιρικών υποκινητών (ΕΙΚΟΝΑ 3.11).



ΕΙΚΟΝΑ 3.11 Σχηματική αναπαράσταση χιμαιρικών ηπατικών υποκινητών και ηπατικού υποκινητή γονιδίου α1-αντιπρυψίνης. Ειδικοί ενεργοί μεταγραφικοί παράγοντες (HNF-1, ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 1; HNF-3, ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 3; HNF-4, ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4; Oct-1, οκταμερής παράγοντας πρόσδεσης 1; SP-1;C/EBP,CCAT ενισχυτική πρωτεΐνη πρόσδεσης; AP-1, πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1) που προσδέονται στην αντίστοιχη αλληλουχία ρύθμισης αναγράφονται σε όλους τους υποκινητές και ενισχυτές. Επίσης, αναγράφονται οι περιοριστικοί παράγοντες μεταγραφικής ενεργότητας και το κουτί TATA. Δίνονται οι συντεταγμένες σε σχέση με την έναρξη μεταγραφής +1 και το μήκος κάθε περιοχής υποκινητή σε νουκλεοτιδικές βάσεις.

Κατασκευάστηκε πλασμίδιο (pΔAT-1α), που φέρει διαγραφή ενός μέρους του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης (από -261 έως -181) για παροδική συνδιαμόλυνση ηπατικών κυτάρων HepG2, σε συνδυασμό με πλασμίδια έκφρασης ιικών πρωτεϊνών W/Tcore και core+1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.12, συνδιαμόλυνση κυτάρων με πλασμίδια που φέρουν διαγραφή περιοχής του υποκινητή (pΔAT-1α), ή ακέραιου υποκινητή (pAT-1α) απέδωσε ανάλογα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης.



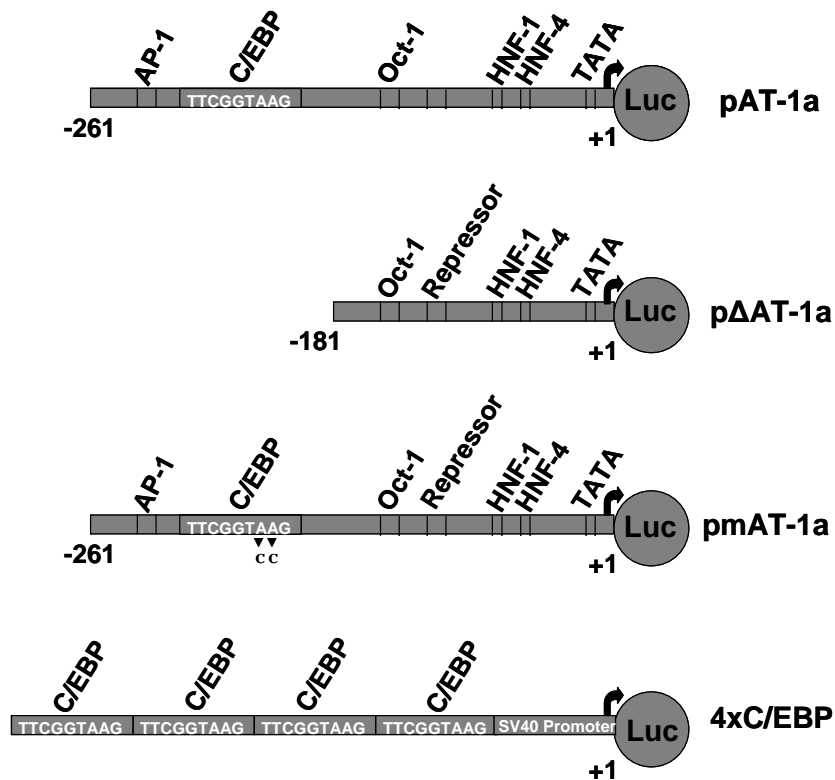
ΕΙΚΟΝΑ 3.12 Ενεργότητα υποκινητών γονιδίου α1-αντιπρυψίνης σε ηπατικά κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τους αναφερόμενους μεταλλαγμένους υποκινητές της α1-αντιπρυψίνης και τον ακέραιο υποκινητή, καθώς και με πλασμίδια έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον κάθε υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Χρησιμοποιήθηκαν 3μg από κάθε ιικό πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, P < 0.005; *, P < 0.05).

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να αναγνωρίσουμε το υπεύθυνο cis- ενεργό στοιχείο για την μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή από την πρωτεΐνη core+1/S. Το παραπάνω αποτέλεσμα ήδη επέτρεπε τον εντοπισμό του μέσα στην περιοχή -261 με -181 του υποκινητή, εφόσον απουσία της περιοχής αυτής δεν επέφερε μεταβολή στην ενεργότητα της λουσιφεράσης. Υποθέσαμε ότι η θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP, που βρίσκεται στην περιοχή -201/-193, ήταν κρίσιμη για την παρατηρούμενη μείωση, αφού τα C/EBP αποτελούν μία από τις καίριες ομάδες μεταγραφικών παραγόντων που ευθύνονται για την γονιδιακή ρύθμιση κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε στρες. Συνεπώς μεταλλαγή στην περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP θα ανέστειλε την περιοριστική δράση της πρωτεΐνης core+1/S στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης.

Πραγματοποιήθηκε μεταλλαγή των θέσεων -195 και -194 της περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP του υποκινητή και συνδιαμολύνθηκαν κύτταρα HepG2. Πρέπει να σημειωθεί ότι θεωρητικά οι μεταλλαγές A⁻¹⁹⁵→C και A⁻¹⁹⁴→C δεν αναμένεται να μεταβάλλουν την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του υποκινητή. Το πλασμίδιο που φέρει το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος του υποκινητή του γονιδίου της α1-

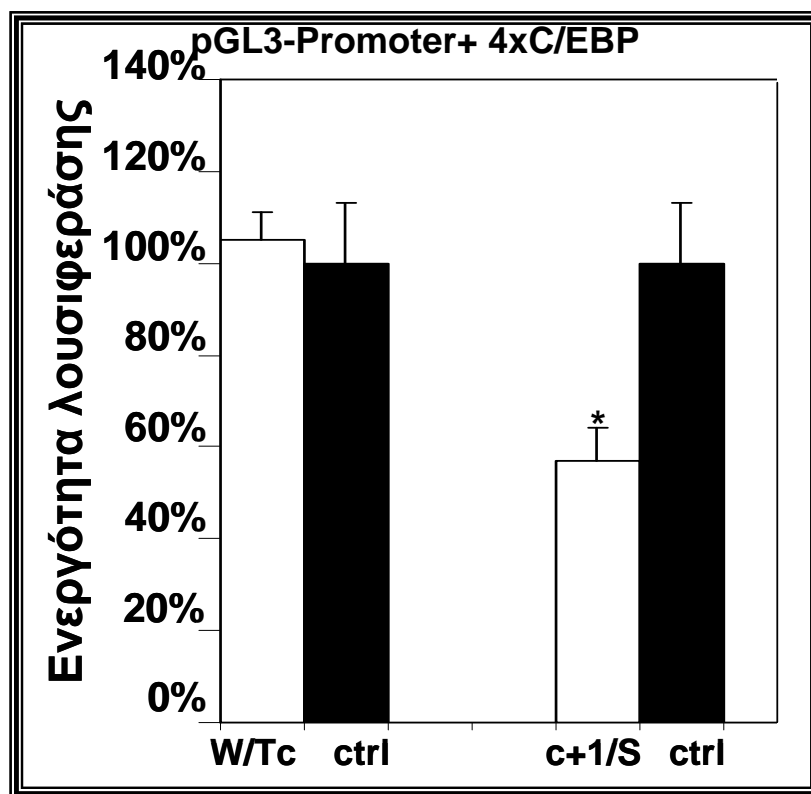
αντιπρυψίνης είναι το pGL3-Basic + pMAT-1α, ή pMAT-1α.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.13 διαπιστώνουμε ότι η μεταλλαγή στην περιοχή πρόσδεσης του C μεταγραφικού παράγοντα C/EBP ανέστειλλε πλήρως την περιοριστική δράση της πρωτεΐνης core+1/S στην μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, που φαίνεται στην περίπτωση του υποκινητή που διαθέτει ακέραια την περιοχή πρόσδεσης (pAT-1α). Με στόχο να εδραιώσουμε περαιτέρω την σημασία της αλληλουχίας αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, κατασκευάστηκε νέο πλασμίδιο με τέσσερα αντίγραφα της περιοχής πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP (4x -201/-193) συζευγμένα με υποκινητή SV40 του πατρικού πλασμιδιακού φορέα pGL3-Promoter. Παρακάτω επισυνάπτονται οι χάρτες των μεταγραφικών παραγόντων των μεταλλαγμένων υποκινητών σε σχέση με τον μη μεταλλαγμένο υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.13 Σχηματική απεικόνιση μεταλλαγμένων υποκινητών (pΔAT-1α και pmAT-1α), του ακέραιου υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης (pAT-1α), καθώς και του υποκινητή SV40 στο πατρικό όχημα pGL3-Promoter, συζευγμένου με 4 αντίγραφα της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP. Ειδικοί ενεργοί μεταγραφικοί παράγοντες (HNF-1, ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 1; HNF-4, ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4; Oct-1, οκταμερής παράγοντας πρόσδεσης 1; C/EBP, CCAT ενισχυτική πρωτεΐνη πρόσδεσης; AP-1, πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1) που προσδέονται στην αντίστοιχη αλληλουχία ρύθμισης αναγράφονται σε όλους τους υποκινητές και ενισχυτές. Επίσης, αναγράφονται ο περιοριστικός παράγοντας μεταγραφικής ενεργότητας και το ρυθμιστικό κουτί TATA. Δίνονται οι συντεταγμένες σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής +1 και το μήκος κάθε περιοχής υποκινητή σε νουκλεοτιδικές βάσεις καθώς και οι αλληλουχίες της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP.

Το πλασμίδιο αυτό (pGL3-Promoter+4xC/EBP, ή 4xC/EBPpAT-1α, αντίστοιχα) συνδιαμόλυνε κύτταρα HepG2 με τα πλασμίδια που φέρουν τις κωδικές αλληλουχίες για την έκφραση των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.



ΕΙΚΟΝΑ 3.14 Ενεργότητα υποκινητή SV-40 συζευγμένου με τέσσερα αντίγραφα της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP σε κύτταρα HepG2 παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl). Χρησιμοποιήθηκαν 3μg από κάθε ιικό πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$).

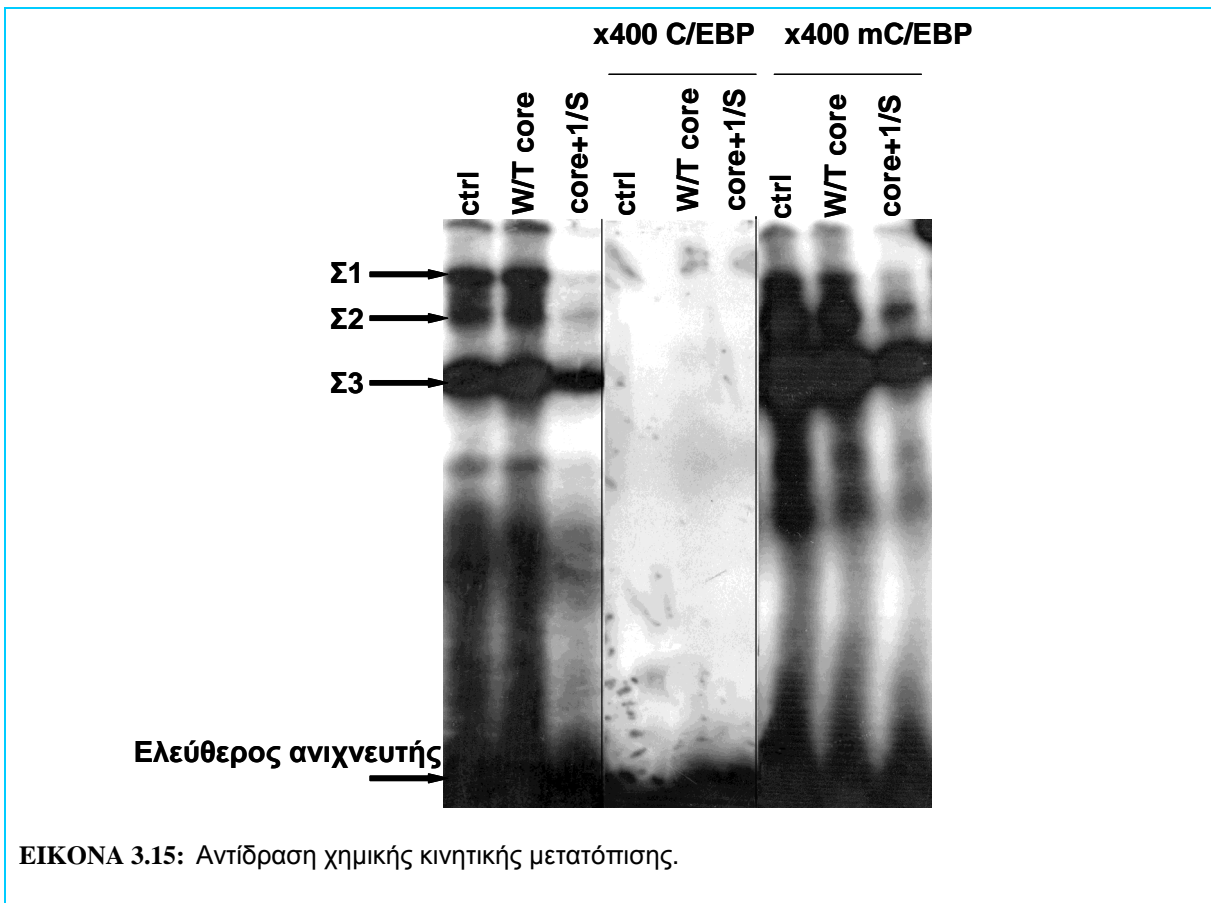
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.14 η έκφραση της πρωτεΐνης core+1/S σε ηπατικά κύτταρα HepG2 οδήγησε σε δραματική μείωση της ενεργότητας του γονιδίου αναφοράς της

λουσιφεράσης, το οποίο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή SV40, που είναι συζευγμένος με τα τέσσερα αντίγραφα της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP. Αντίθετα η έκφραση της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ δεν επέφερε καμία ποσοτική μεταβολή στα επίπεδα της λουσιφεράσης.

Όλα τα παραπάνω πειράματα αποδεικνύουν ότι η περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης επηρεάζει σημαντικά την μεταγραφική δράση του υποκινητή παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.

3.1.8 Η ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ C/EBP ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΕΠΗΡΕΑΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CORE+1/S ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ.

Έχοντας συσσωρευμένες ενδείξεις ότι η περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης ευθύνεται για την μεταγραφική δράση της πρωτεΐνης core+1/S, προχωρήσαμε στην εξέταση πρωτεϊνών πρόσδεσης στο DNA της συγκεκριμένης περιοχής, με χρήση της μεθόδου ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης (EMSA). Σχεδιάστηκαν ολιγονουκλεοτίδια στη μεταλλαγμένη περιοχή πρόσδεσης του παράγοντα C/EBP με βάση το πλασμίδιο pmAT-1a για συγκριτικές μελέτες. Για τον ραδιοσημασμένο ανιχνευτή C/EBP σχεδιάστηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια C/EBP: 5'-CAGTGTTTCCAGAC-3' και 5'-TTGGTCTGGAAACA-3', ενώ για τον ραδιοσημασμένο μεταλλαγμένο ανιχνευτή C/EBP σχεδιάστηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια mC/EBP: 5'-AGT CAG TGG GCG TTG CGC CAC GAT CT-3' και 5' TCA GTA GAT CGT GGC GCA ACG CCC ACT-3'. Τα ραδιενεργά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια επωάστηκαν με πυρηνικά εκχυλίσματα κυτταρικών σειρών Huh-7 που εκφράζουν σταθερά τις ιϊκές πρωτεΐνες core+1/S και W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ ή μόνο τον πατρικό πλασμιακό φορέα σαν μάρτυρα (ctrl).



ΕΙΚΟΝΑ 3.15: Αντίδραση χημικής κινητικής μετατόπισης.

Παρατηρήθηκε επαναλαμβανόμενη παρουσία τριών κύριων συμπλόκων (Σ1, Σ2 και Σ3) μεταξύ πρωτεϊνών και DNA σε ανεξάρτητα πειράματα (ΕΙΚΟΝΑ 3.15), με τον ραδιοσημασμένο ανιχνευτή C/EBP. Η ισχύς του σήματος και των τριών συμπλόκων ήταν παρόμοια όταν χρησιμοποιούνταν πυρηνικά εκχυλίσματα από τις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη W/T core και το πατρικό πλασμιδιακό φορέα (ctrl). Αντίθετα, η ένταση του σήματος όλων των συμπλόκων μειώνονταν σημαντικά σε πυρηνικά εκχυλίσματα της κυτταρικής σειράς με σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης core+1. Παρόμοια αποτελέσματα αντλήθηκαν από εκχυλίσματα κυττάρων HepG2, που συνδιαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που φέρουν τις κωδικές αλληλουχίες έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.

Έλεγχος της εξειδίκευσης των αλληλεπιδράσεων DNA/πρωτεϊνών διενεργήθηκε μέσω δοκιμών επικράτησης που κατέγραψαν τα πειράματα ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης. Προσθήκη μη ραδιενεργά σημασμένης αλληλουχίας ανιχνευτή C/EBP σε περίσσεια 400x εξουδετέρωσε όλα τα σύμπλοκα που παρατηρήθηκαν σε όλα τα πυρηνικά εκχυλίσματα (ΕΙΚΟΝΑ 3.15). Το ίδιο όμως φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε όταν προσθέσαμε μη ραδιενεργά σημασμένη

αλληλουχία του μεταλλαγμένου ανιχνευτή C/EBP σε περίσσεια 400x. Κανένα σύμπλοκο μεταξύ ραδιενεργού ανιχνευτή και πυρηνικών εκχυλισμάτων δεν εξουδετερώθηκε (ΕΙΚΟΝΑ 3.15).

Φαίνεται συνεπώς ότι η περιοχή αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP είναι λειτουργική και η ικανότητα πρόσδεσης κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων αναστέλλεται σημαντικά από την παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a.

3.1.9 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ C/EBP, ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΝΕΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΟΥΣ C/EBP ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ Α1-ΑΝΤΙΤΡΥΨΙΝΗΣ.

Για να εξετάσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και πρωτεϊνών στην περιοχή αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα C/EBP του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιτρυψίνης *in vivo* και να ανιχνεύσουμε μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται στη συγκεκριμένη περιοχή, καταφύγαμε στη μέθοδο ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης.

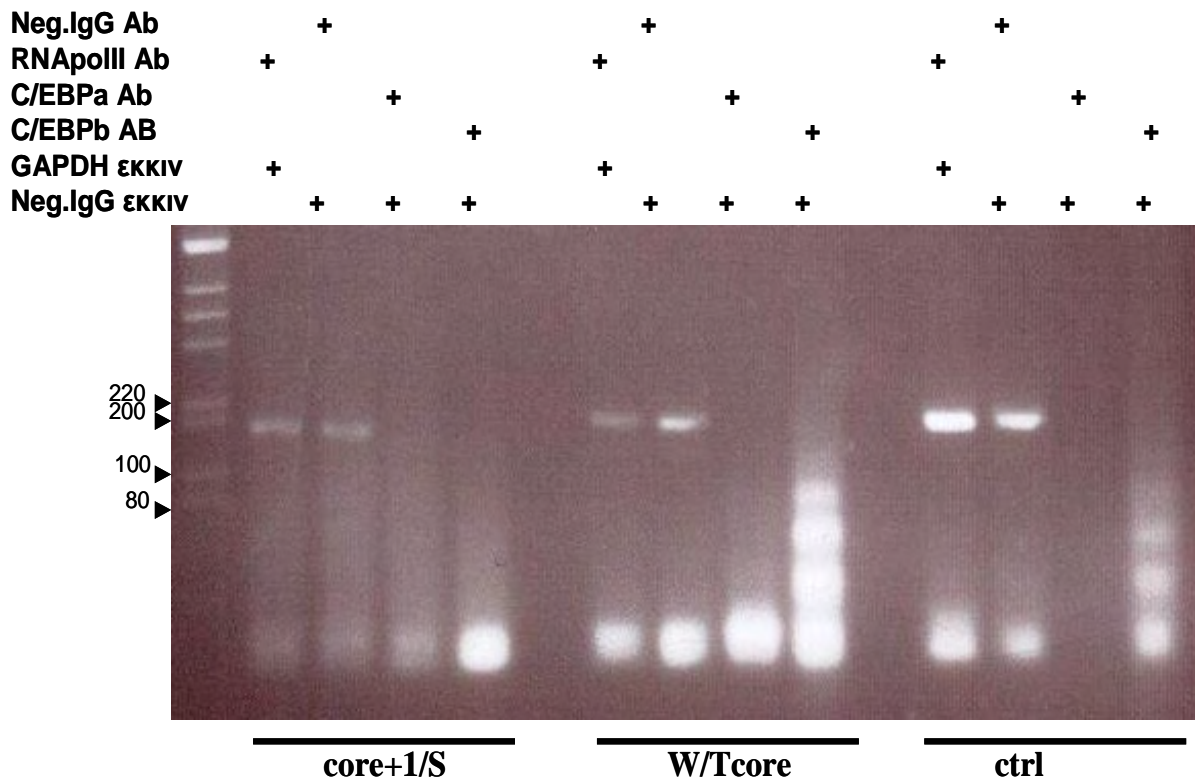
Απομονώθηκε χρωματίνη από εκχυλίσματα εδραιωμένων κυτταρικών σειρών Huh-7, που εκφράζουν σταθερά τις ιϊκές πρωτεΐνες core+1/S και W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ ή μόνο τον πατρικό πλασμιδιακό φορέα σαν μάρτυρα (ctrl). Η χρωματίνη κατακερματίστηκε ενζυμικά σε μικρά τμήματα 200 έως 1200 νουκλεοτιδικών βάσεων (ΕΙΚΟΝΑ 3.16).



ΕΙΚΟΝΑ 3.16 Ενζυμική κατάτμηση χρωματίνης σε τμήματα 200 - 1200 νουκλεοτιδικών βάσεων

Τα δείγματα που περιείχαν την κατακερματισμένη χρωματίνη ανοσοκατακρήμνιστηκαν με αντισώματα έναντι της RNA πολυμεράσης II, μη ειδικών ανοσοσφαιρινών G, πρωτεϊνών C/EBPα και C/EBPβ, αντίστοιχα και τα ανοσοκατακρήμνισμένα τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγεία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που ακολούθησε. Τα ανοσοκατακρήμνισμένα δείγματα με αντίσωμα έναντι της RNA πολυμεράσης II που επεκτάθηκαν με εκκινητές GAPDH,

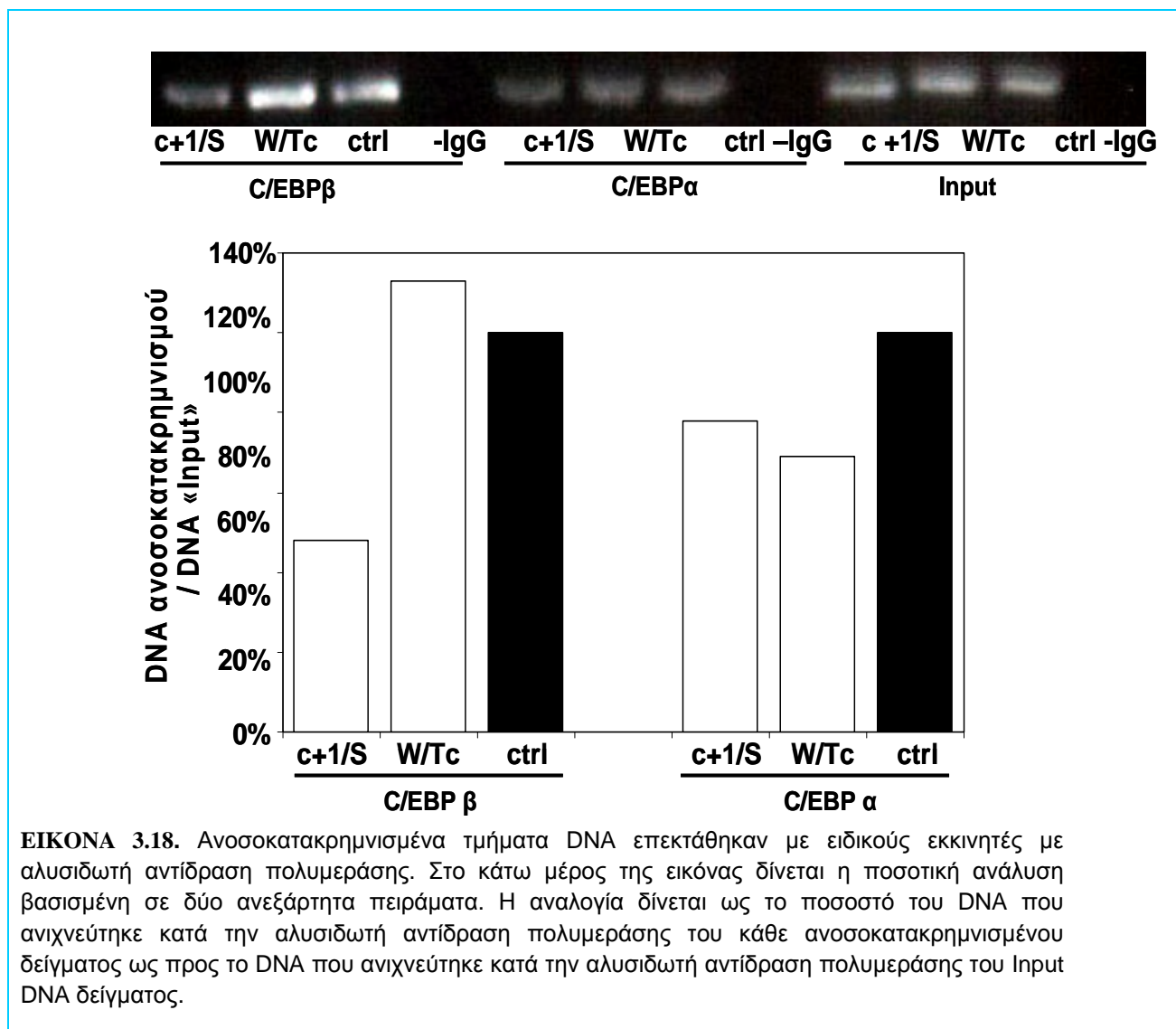
έδειξαν προϊόντα σωστού μοριακού μεγέθους (ΕΙΚΟΝΑ 3.17), αποδεικνύοντας την αποδοτικότητα και ακρίβεια της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με το αντιδραστήριο ChIP-IT Express (Active Motif).



ΕΙΚΟΝΑ 3.17. Ανοσοκατακρημνισμένα τμήματα DNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Πολλαπλασιάστηκαν ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα με αντίσωμα έναντι της RNA πολυμεράσης II, με εκκινητές GAPDH σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, σαν λειτουργικό μάρτυρα του αντιδραστήριου ChIP-IT Express.

Στην Εικόνα 3.18 παρατηρούμε ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα με αντίσωμα έναντι των παραγόντων C/EBPα, C/EBPβ και μη ειδικών ανοσοσφαιρινών G που επεκτάθηκαν με ειδικούς εκκινητές για περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης που περιέχει την περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP. Δεν υπήρξε κανένας εμπλουτισμός για την περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP σε όλα τα δείγματα που ανοσοκατακρημνίστηκαν με αντίσωμα έναντι μη ειδικών ανοσοσφαιρινών G, υποδεικνύοντας την εξειδίκευση των αντισωμάτων C/EBPα και C/EBPβ, αντίστοιχα. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες C/EBPα και C/EBPβ προσδένονται στην περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, σαν ένα ετεροδιμερές μόριο. Τέλος ποσοτική ανάλυση δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, φανερώνει μειωμένη πρόσδεση του

μεταγραφικού παράγοντα C/EBPβ στην περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP στα κύτταρα που εκφράζουν σταθερά την ιϊκή πρωτεΐνη core+1/S. Η συγκεκριμένη μείωση είναι μεγαλύτερη από 50% και δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν ανοσοκατακρημνιστεί με αντίσωμα έναντι του παράγοντα C/EBPα.



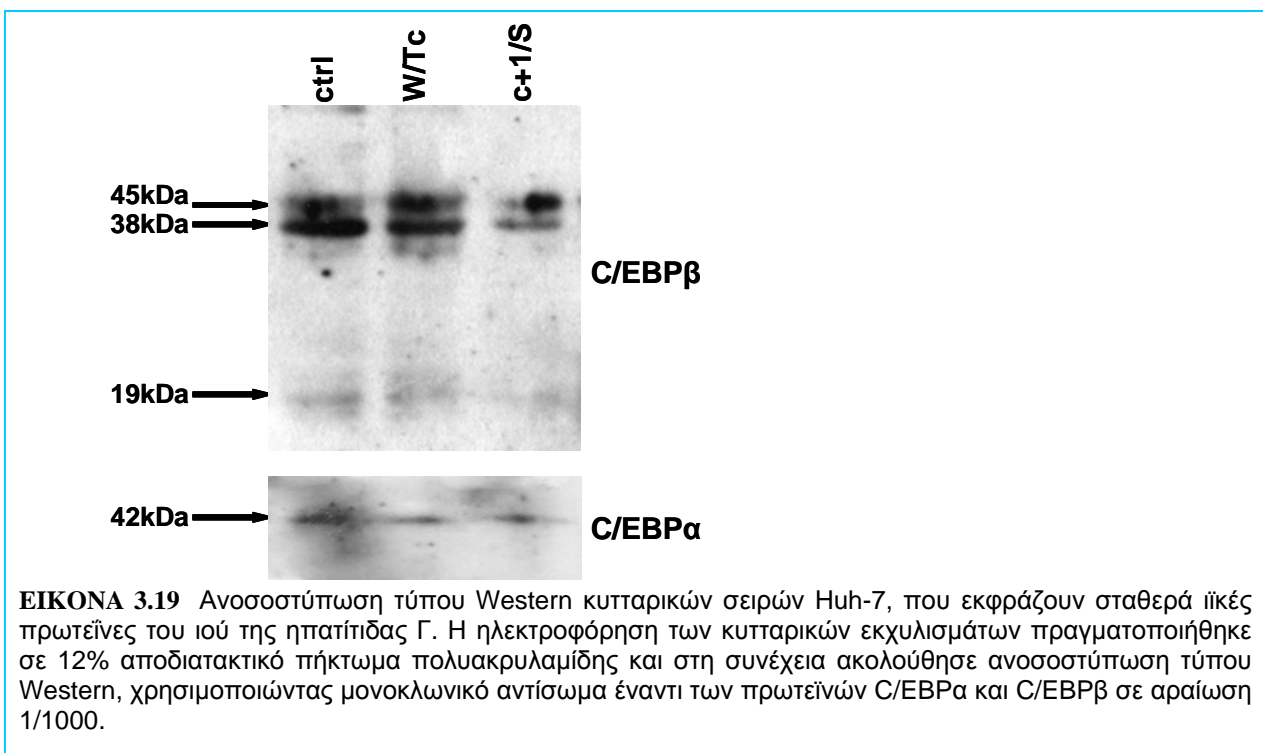
Παρατηρήθηκε μειωμένη πρόσδεση στην περιοχή αναγνώρισης του παράγοντα C/EBP σε κύτταρα που εκφράζουν την ιϊκή πρωτεΐνη core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε *in vitro* με την μέθοδο ηλεκτροφορητικής κινητικής μετατόπισης και *in vivo* με την μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης. Επιπλέον, αν και ο μεταγραφικός παράγοντας πρόσδεσης στην περιοχή αναγνώρισης του C/EBP του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, είναι ένα ετεροδιμερές C/EBPα -C/EBPβ, διαπιστώθηκε ότι μόνο η υπομονάδα

C/EBPβ σχετίζεται με τη δράση της πρωτεΐνης core+1/S στην μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή.

3.1.10 Η CORE+1/S ΡΥΘΜΙΖΕΙ ΤΗ C/EBPβ, ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΟΧΙ mRNA .

Έχοντας εδραιώσει την ύπαρξη συσχετισμού μεταξύ του μεταγραφικού παράγοντα C/EBPβ και της πρωτεΐνης core+1/S στην μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, προσπαθήσαμε να μελετήσουμε αν η πρωτεΐνη core+1/S δρα στο μεταγραφικό, ή μεταφραστικό επίπεδο και των δύο μεταγραφικών παραγόντων C/EBP.

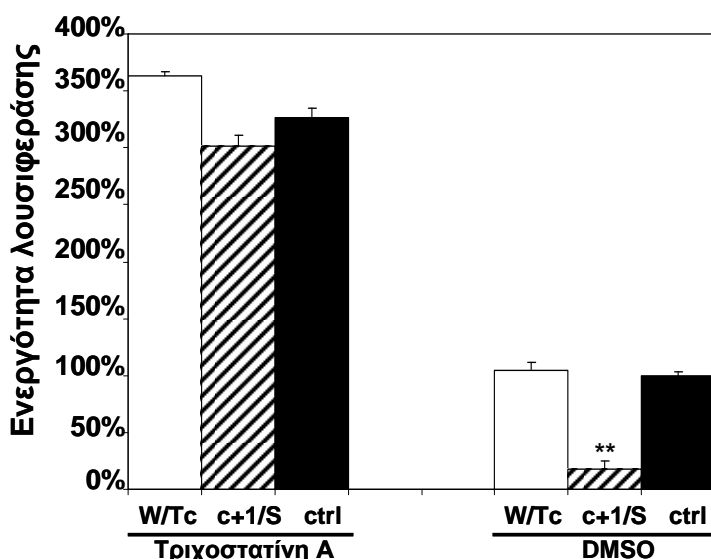
Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στο μεταγραφικό επίπεδο των δύο μεταγραφικών παραγόντων C/EBP παρουσία πρωτεϊνών W/T core και core+1/S ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19 το πρωτεϊνικό επίπεδο του παράγοντα C/EBPβ καταγράφει μειώνεται δραματικά κατά την παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S, σε σύγκριση με εκχυλίσματα κυττάρων Huh-7 που εκφράζουν σταθερά την πρωτεΐνη W/T core. Το επίπεδο της πρωτεΐνης C/EBPα παρέμεινε σταθερό και στα τρία δείγματα (ΕΙΚΟΝΑ 3.19).



3.1.11 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CORE+1/S ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΑΛΑΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.

Στην προσπάθεια ανεύρεσης του πιθανού μηχανισμού μείωσης της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή και του παράγοντα C/EBPβ σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρουσία πρωτεΐνης core+1/S, μελετήσαμε τη συμπεριφορά των ιικών πρωτεϊνών της ηπατίτιδας Γ κατά τη φάση χαλάρωσης, ή συμπίεσης της χρωματίνης. Συνδιαμολύνθηκαν κύτταρα HepG2 με το πλασμίδιο του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης και τα πλασμίδια που φέρουν τις κωδικές αλληλουχίες έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Δύο ώρες πριν τη διαμόλυνση στα μισά κυτταρικά δείγματα προστέθηκε τριχοστατίνη A (250ng/ml) σε DMSO, ενώ στα άλλα μισά προστέθηκε η διαλυτική ουσία DMSO.

Η τριχοστατίνη A (TSA) είναι αναστολέας ιστονών αποακετυλίωσης, που οδηγεί σε αφαίρεση ακετυλικών ομάδων από τις ιστόνες αποακετυλίωσης (HDAC), με συνέπεια η χρωματίνη να βρίσκεται σε μόνιμη φάση χαλάρωσης παρουσία του οργανικού συστατικού στο κύτταρο HepG2.



ΕΙΚΟΝΑ 3.20 Ενεργότητα υποκινητή γονιδίου α1-αντιπρυψίνης σε ηπατικά κύτταρα HepG2 που έχουν επεξεργαστεί με τριχοστατίνη A, παρουσία ιικών πρωτεϊνών. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον αναφερόμενο υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης και με πλασμίδια έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών W/T core και core+1/S της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl) σε κύτταρα που είχε προστεθεί μόνο DMSO. Χρησιμοποιήθηκαν 3μg από κάθε ιικό πλασμίδιο. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενεργότητας της λουσιφεράσης μεταξύ δείγματος και μάρτυρα (ctrl) (**, $P < 0.005$; *, $P < 0.05$).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.20 το φαινόμενο της περιοριστικής δράσης της πρωτεΐνης core+1/S στη μεταγραφική ικανότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης, επαναλήφθηκε για μία ακόμη φορά σε κυτταρικά δείγματα που συνδιαμολύνθηκαν παρουσία DMSO. Όμως στα δείγματα εκείνα που προστέθηκε η τριχοστατίνη A δεν παρατηρήθηκε η αρνητική δράση της πρωτεΐνης core+1/S στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης. Επίσης, είναι εντυπωσιακό ότι η παρουσία τριχοστατίνης A επέφερε αυξημένη ενεργότητα λουσιφεράσης κατά 3-4 φορές σε σχέση με τα κυτταρικά δείγματα που είχαν επεξεργαστεί μόνο με DMSO. Πράγματι, παρουσία τριχοστατίνης A, όπου η χρωματίνη οδηγείται σε κατάσταση χαλάρωσης και αυξάνει η γονιδιακή έκφραση, η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης αυξάνει δραματικά, τρεις τουλάχιστον φορές πάνω από την αντίστοιχη ενεργότητα σε συνθήκες κανονικής κατάστασης χρωματίνης. Δεν παρατηρήθηκε συσχετισμός της πρωτεΐνης core+1/S με τις ιστόνες αποακετυλίωσης HDACs σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο με την παραπάνω επιπενετική μέθοδο.

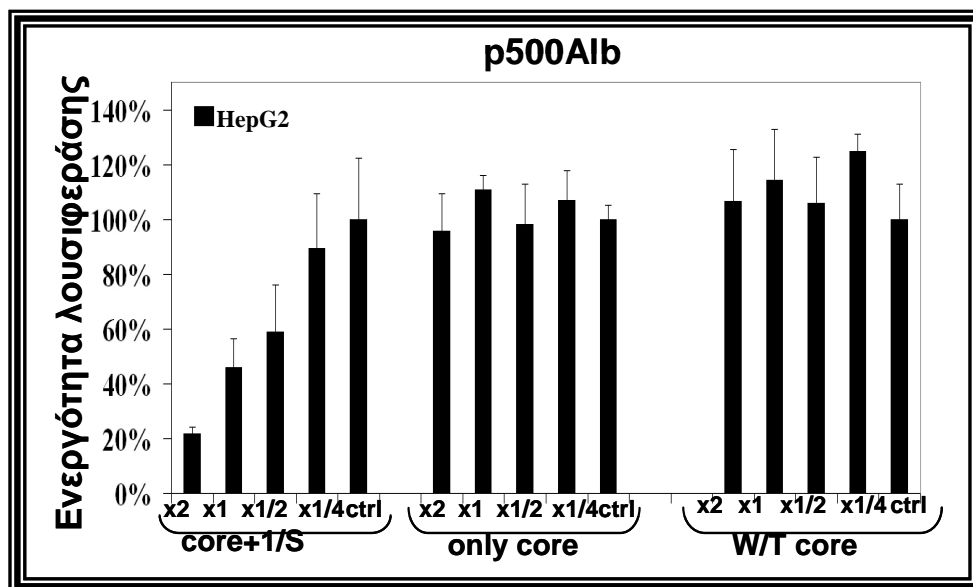
3.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE/CORE+1 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ.

3.2.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΣΤΟΝ ΥΠΟΚΙΝΗΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ

Τα επίπεδα αλβουμίνης παρουσιάζουν σημαντική μείωση 35-40% περίπου, σε ασθενείς με ηπατίτιδα Γ σε σχέση με υγιή άτομα. Στην παρακάτω μελέτη προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε πιθανή επιρροή κάποιας ιϊκής πρωτεΐνης στον υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δύο νέα πλασμίδια που φέρουν δύο διαφορετικά μέρη του υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης. Το πρώτο πλασμίδιο φέρει όλη την κωδική αλληλουχία του υποκινητή, ενώ το δεύτερο περιέχει το μέρος -486 σαν εναρκτήριο νουκλεοτίδιο έναρξης της μεταγραφής. Αυτός ο διαχωρισμός έγινε για να αποφευχθεί η επίδραση ενός στοιχείου σίγασης (περιοχή -623 έως -486) στην ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης, παρουσία των ιϊκών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ.

Ειδικότερα, γενωμικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα Huh-7, χρησιμοποιώντας πρωτεϊνάση K. Οι υποκινητές της αλβουμίνης 1000Albr και 500Albr πολλαπλασιάστηκαν με

κατάλληλους εκκινητές 1000alb (5'- AGA ACC CGG GCC TTG GGT AGG GAA GGA-3'), 500alb (5'- CAT GCC CGG GCG TGA GTA CTT GTG TGT-3'), 0alb (5'- CAA ACT CGA GCG CGG AGG GAA ATT AGC A -3') μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Και τα δύο προϊόντα της αντίδρασης επώαστηκαν με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI* (φέρει ο εκκινητής που αντιστοιχεί στην οδηγό αλυσίδα DNA, 1000alb και 500Alb) και *XhoI* (φέρει ο εκκινητής που αντιστοιχεί στην συμπληρωματική αλυσίδα DNA, 0Alb) και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα pGL3 Basic, ευθυγραμμισμένο με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *SmaI* και *XhoI*. Όλες οι συνεπιμολύνσεις των υποκινητών της αλβουμίνης 1000Alb και 500Alb μαζί με τις ιικές πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ έγιναν σε κυτταρική σειρά HepG2, με όμοιο τρόπο όπως έχει ακολουθηθεί σε όλα τα προηγούμενα πειράματα με τους διάφορους ηπατικούς υποκινητές.

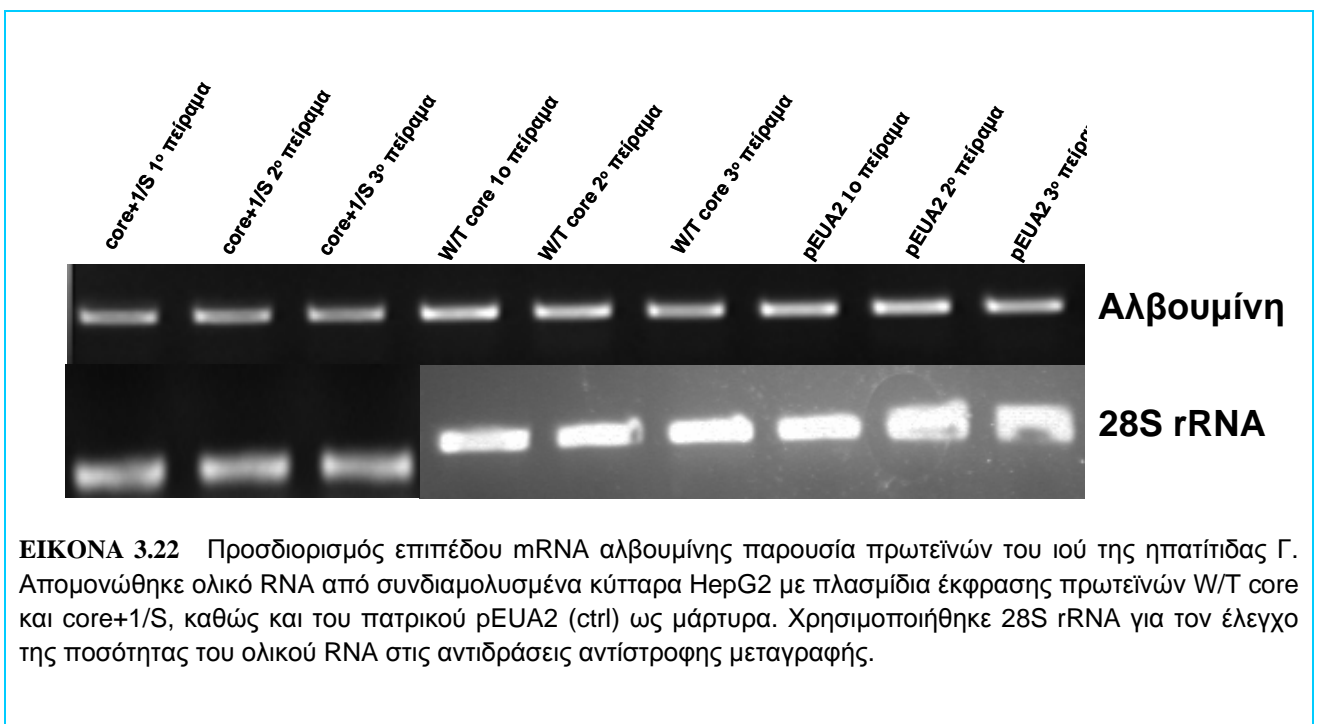


ΕΙΚΟΝΑ 3.21 Ενεργότητα υποκινητή γονιδίου αλβουμίνης p500Alb σε ηπατικά κύτταρα παρουσία ιικών πρωτεϊνών ιού ηπατίτιδας Γ. Ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 διαμολύνθηκε παροδικά με πλασμίδια που περιέχουν τον αναφερόμενο υποκινητή της αλβουμίνης και με πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ. Η επαγωγή της λουσιφεράσης από τον υποκινητή παρουσία ιικών πρωτεϊνών εκτιμήθηκε σε σχέση με τα επίπεδα της λουσιφεράσης που παρήχθησαν από την παροδική επιμόλυνση του αντίστοιχου υποκινητή με το πατρικό όχημα pEUA2(ctrl) σε κύτταρα που είχε προστεθεί μόνο DMSO. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά εννέα επαναλήψεων τριών ανεξάρτητων πειραματικών δοκιμών.

Η παραπάνω πειραματική διεργασία μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1/S του ιού ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a επηρεάζει αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή p500Alb του ανθρώπινου γονιδίου της αλβουμίνης σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης (ΕΙΚΟΝΑ 3.21). Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι το φαινόμενο δεν παρατηρείται παρουσία της πρωτεΐνης core του ιού της ηπατίτιδας Γ. Τέλος, ούτε η πρωτεΐνη W/T core, ούτε η core+1 επέφεραν κάποια στοιχειώδη μεταβολή στα επίπεδα της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή p1000Alb του ανθρώπινου γονιδίου της αλβουμίνης (τα αποτελέσματα δεν αναγράφονται).

3.2.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ CORE ΚΑΙ CORE+1 ΙΟΥ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1a ΣΤΑ ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ.

Το φαινόμενο μελετήθηκε και σε ενδογενές επίπεδο mRNA αλβουμίνης, παρουσία ιικών πρωτεϊνών core και core+1 ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b, με συνδυασμό αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR). Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή του ενδογενούς επιπέδου αλβουμίνης παρουσία των πρωτεϊνών W/T core και core+1/S του ιού (ΕΙΚΟΝΑ 3.22).



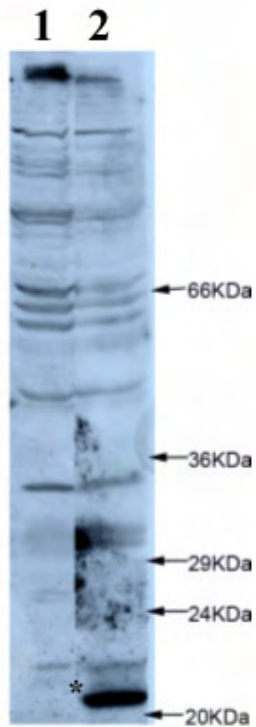
3.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ W/T CORE, CORE+1 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ.

3.3.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΪΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1α.

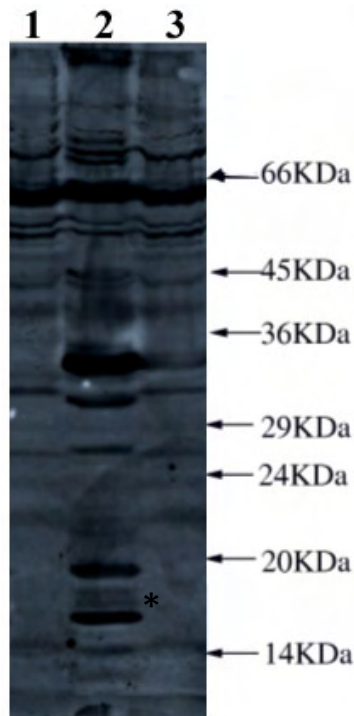
Κλωνοποιήθηκαν γονιδιακές αλληλουχίες W/T core, core+1/F, core και core+1/S στον υποκινητή αλβουμίνης, που είναι κατάλληλος για την έκφραση των διαγονιδίων στο ήπαρ και τα T-λεμφοκύτταρα. Αλληλουχίες Core από 1-191 aa και μεταλλαγμένες αλληλουχίες Core με α) εισαγωγή κωδικόνιου λήξης στο νουκλεοτίδιο 631, ώστε να δημιουργηθεί κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο της core+1, β) εισαγωγή κωδικόνιου λήξης στο νουκλεοτίδιο 408, ώστε να δημιουργηθεί κωδικόνιο λήξης στο πλαίσιο της core και γ) εσωτερικό εναρκτήριο κωδικόνιο (μικρή μορφή) κλωνοποιήθηκαν κάτω από τον ενισχυτή/υποκινητή της αλβουμίνης του ποντικού (ευγενική χορηγία από το εργαστήριο του Δρ. Thorgeisson). Όλοι οι κλώνοι περιγράφονται λεπτομερώς στο μέρος των πλασμιδίων.

3.3.2. ΈΚΦΡΑΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΠΑΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.

Οι αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς σε πλασμιδιακό φορέα pCI, ελλιπή ως προς τον υποκινητή CMV, ο οποίος αντικαταστάθηκε με τον ενισχυτή/υποκινητή της αλβουμίνης του ποντικού. Παράλληλα, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία των παραπάνω πλασμιδίων και επιβεβαιώθηκε η ακέραια ενσωμάτωση των αλληλουχιών στον πλασμιδιακό φορέα. Για την ανάγνωση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα ολιγονουκλεοτίδια TCR1 και TCR2. Στη συνέχεια κύτταρα ηπατικής προέλευσης Huh-7 διαμολύνθηκαν παροδικά με τα παραπάνω πλασμίδια. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λιποσώματος της λιποφεκταμίνης. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε λύση με το τριπλό απορρυπαντικό σαραντά οκτώ ώρες μετά την διαμόλυνση. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε ανοσοσύτπωση τύπου Western με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core, (pAb core, ΕΙΚΟΝΑ 3.23) και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core+1 (NK-1, ΕΙΚΟΝΑ 3.24 και ΕΙΚΟΝΑ 3.25).

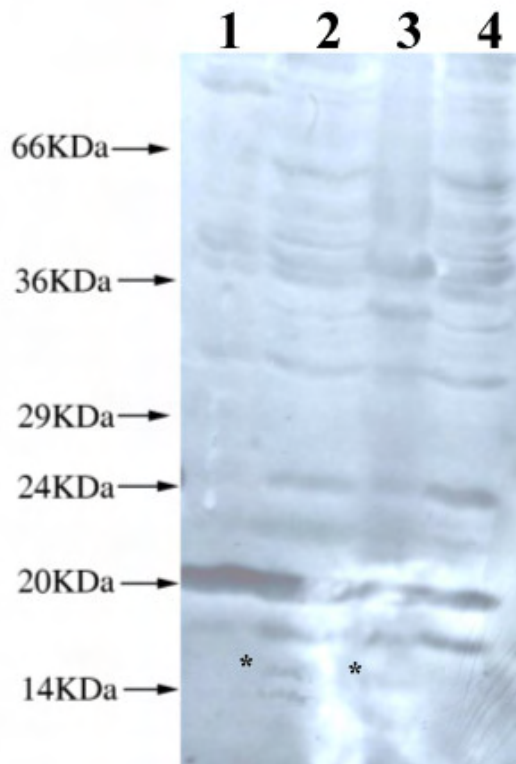


ΕΙΚΟΝΑ 3.23 Ανοσοσύτπωση τύπου Western του pHPI 1684 & pHPI 1685 σε κύτταρα Huh-7. Τα κύτταρα Huh-7 διαμολύνθηκαν παροδικά για 48 ώρες με πλασμίδια που περιέχουν κωδικές αλληλουχίες έκφρασης των ιϊκών πρωτεϊνών W/T core (pHPI 1684- βοθρίο 2), και only core (pHPI 1685 - βοθρίο 1). Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε 12% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοσύτπωση τύπου Western, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core σε αραίωση 1/1000. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει την ζώνη ανίχνευσης της πρωτεΐνης core του ιού ηπατίτιδας Γ.



αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολούθησε ανοσοσύτρωση τύπου Western με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core+1 σε αρραίωση 1/1000. Ειδικότερα το βοθρίο 1 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο rHPI 1686 (core+1/F). Το βοθρίο 3 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων μη διαμολυσμένων και το βοθρίο 1 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που φέρει την κωδική αλληλουχία έκφρασης της πρωτεΐνης core+1/F συζευγμένη με την φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP στον υποκινητή CMV, ως θετικός μάρτυρας ελέγχου έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης core+1/F. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει την ζώνη ανίχνευσης της πρωτεΐνης core+1/F του ιού της ηπατίτιδας Γ.

ΕΙΚΟΝΑ 3.24 Ανοσοσύτρωση τύπου Western εκχυλίσματος κυττάρων Huh-7 που διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο rHPI 1686, που περιέχει την κωδική αλληλουχία έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/F, κάτω από τον έλεγχο του ενισχυτή/υποκινητή της αλβουμίνης του ποντικού. Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε 14%

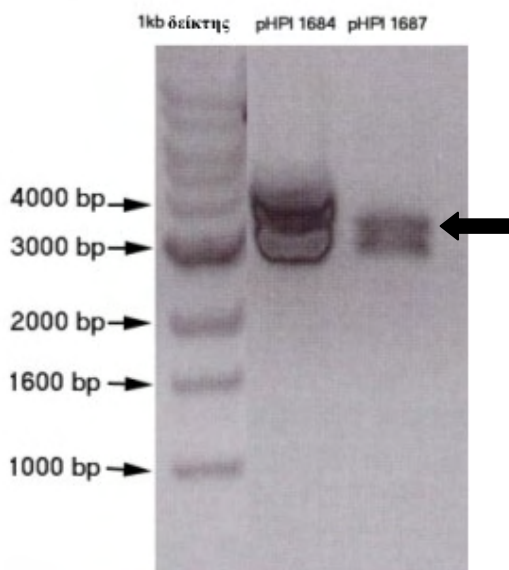


ΕΙΚΟΝΑ 3.25 Ανοσοστύπωση τύπου Western παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων Huh-7 με το πλασμίδιο pHPI 1687, που περιέχει την κωδική αλληλουχία έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S, κάτω από τον έλεγχο του ενισχυτή/υποκινητή της αλβουμίνης του ποντικού. Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε 14% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοστύπωση τύπου Western, με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης core+1 σε αραιώση 1/500. Ειδικότερα το βοθρίο 2 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pHPI 1687 (core+1/F). Το βοθρίο 4 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων μη διαμολυσμένων και το βοθρίο 3 περιέχει εκχύλισμα κυττάρων διαμολυσμένων με πλασμίδιο που φέρει την κωδική αλληλουχία έκφρασης της πρωτεΐνης core+1/S συζευγμένης με την φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP σε υποκινητή CMV, σαν θετικό μάρτυρα ελέγχου έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης core+1/F. Τέλος το βοθρίο 1 περιέχει εκχύλισμα διαμολυσμένων κυττάρων με το πλασμίδιο pHPI 1686. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει την ζώνη ανίχνευσης της πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ.

Δυστυχώς, μόνο δύο από τα τέσσερα πλασμίδια εκφράστηκαν σε ηπατικά κύτταρα Huh-7. Τα πλασμίδια αυτά περιέχουν κωδικές αλληλουχίες έκφρασης των πρωτεϊνών W/T core (pHPI 1684) και την core+1/S (pHPI 1687) του ιού της ηπατίτιδας Γ, κάτω από τον έλεγχο του ενισχυτή/υποκινητή αλβουμίνης του ποντικού.

3.3.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ C57/BL6-CBA.

Αφού βεβαιώθηκε η έκφραση των παραπάνω πλασμιδίων, απομονώθηκε πλασμιδιακό DNA σε μεγάλη κλίμακα από κατάλληλα μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη DH5α και χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα περιορισμού (*Bam*HI & *Hind*III) για την απελευθέρωση των αλληλουχιών που θα χρησιμοποιηθούν στον εμβολιασμό ποντικών C57/BL6-CBA. Στόχος ήταν η κάθε αλληλουχία να εμπεριέχει τον ενισχυτή/υποκινητή της αλβουμίνης, την κωδική αλληλουχία για την έκφραση πρωτεϊνών W/T core ή core+1/S αντίστοιχα, το εσώνιο του ανθρώπινου γονιδίου της β-σφαιρίνης που σταθεροποιεί το παραγόμενο RNA, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται σταθερότητα έκβασης και μεταβίβασης του γονιδίου σε πειραματόζωα και τέλος την ουρά πολυ-A, που έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει την σταθερότητα του mRNA. Τα δείγματα ηλεκτροφορηθήκαν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και το DNA καθαρίστηκε από το πήκτωμα αγαρόζης (ΕΙΚΟΝΑ 3.26). Εν συνεχεία, το DNA διαγονιδιακής «κασσέτας» διαλύθηκε σε 200μl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος MIJ (Micro -Injection Buffer) προκειμένου να εμβολιαστεί σε ποντίκια C57/BL6-CBA για την παραγωγή διαγονιδιακών σειρών.

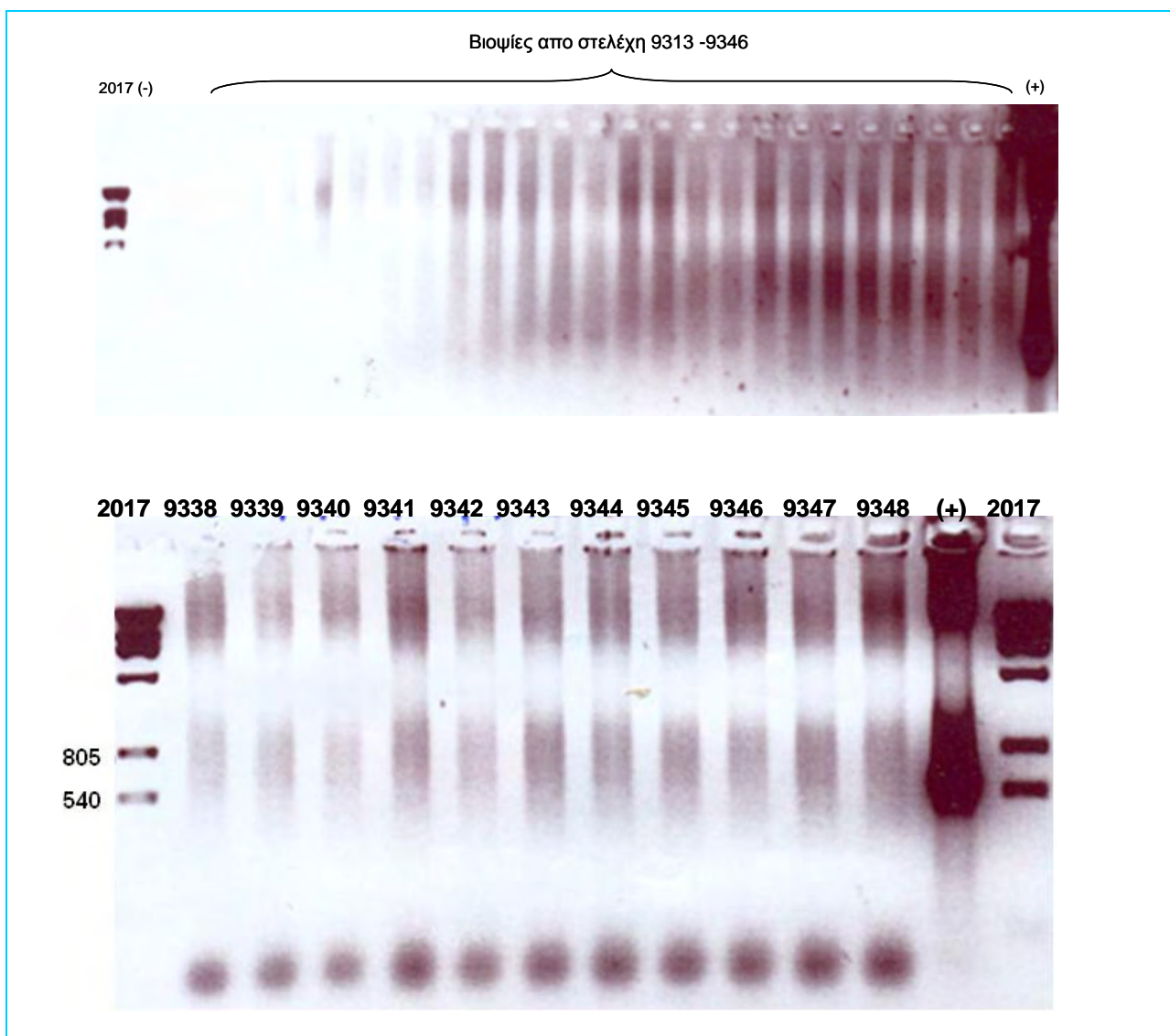


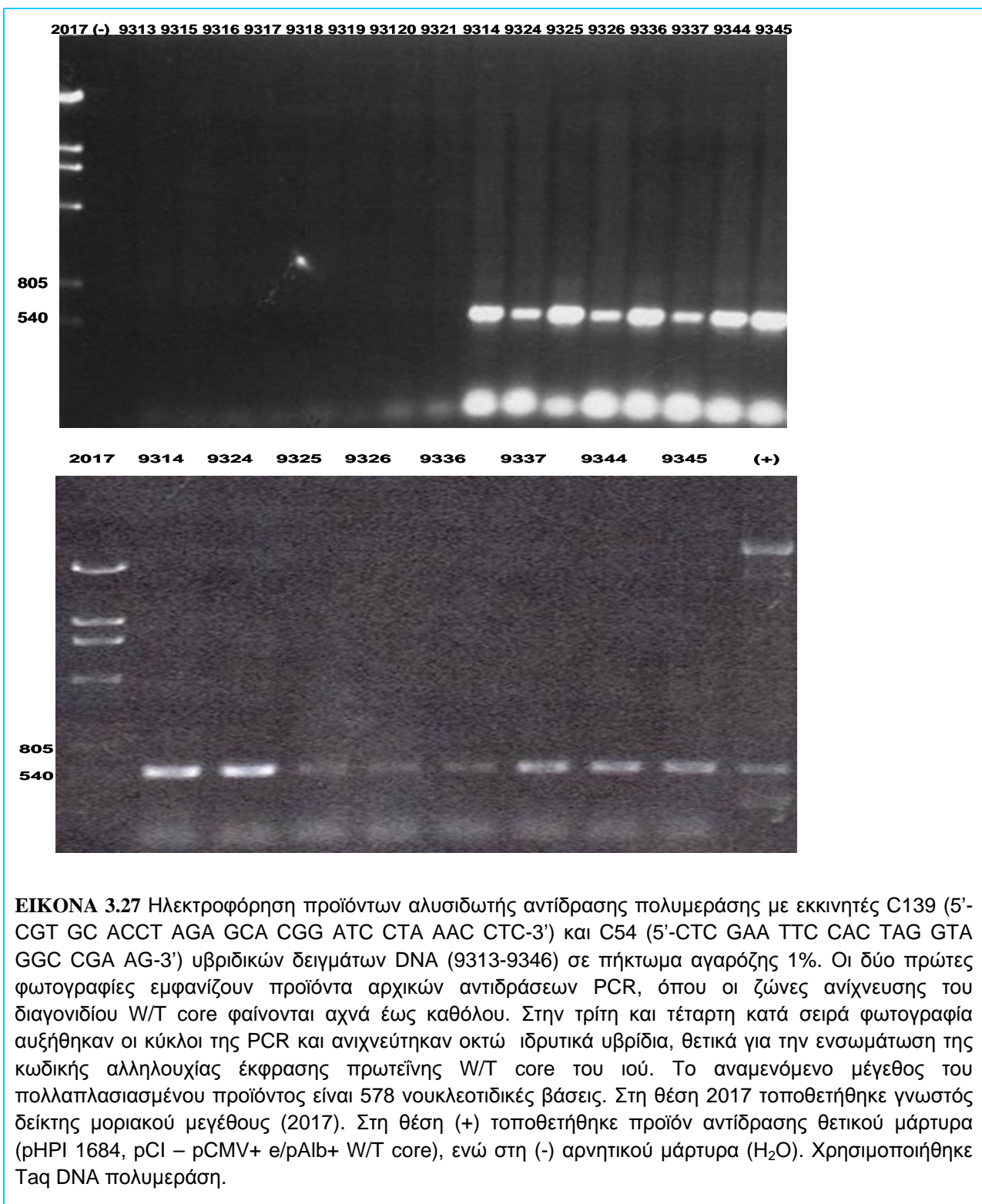
ΕΙΚΟΝΑ 3.26 Απελευθέρωση της επιθυμητής διαγονιδιακής «κασσέτας» W/T core (pHPI 1684) και core+1/S (pHPI 1687) με ένζυμα περιορισμού *Bam*HI & *Hind*III. Η ανώτερη ζώνη (βέλος) αφαιρείται από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίζεται.

3.3.4. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ C57/BL6-CBA ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ W/T CORE ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1Α.

Εμβολιάστηκαν 120 ώρια ψευδοέγγυων ποντικών ♀ C57BL/6-CBA με 50ng DNA Albe/p + W/T core / ώριο. Γεννήθηκαν τριάντα έξι υβρίδια (9313-9346). Έγιναν βιοψίες ουράς ύστερα από 5 εβδομάδες και εν συνεχεία απομονώθηκε DNA από κάθε βιοψία. Εξετάστηκαν 36 ολικά γενωμικά DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για πιθανή ενσωμάτωση της κωδικής αλληλουχίας έκφρασης της πρωτεΐνης W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1α.

Ανιχνεύτηκαν οκτώ ιδρυτικά υβρίδια (5♀, 3♂) με ενσωματωμένη κωδική αλληλουχία έκφρασης της πρωτεΐνης W/T core. Παρακάτω, ακολουθούν οι εικόνες από τις ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης(ΕΙΚΟΝΑ 3.27).



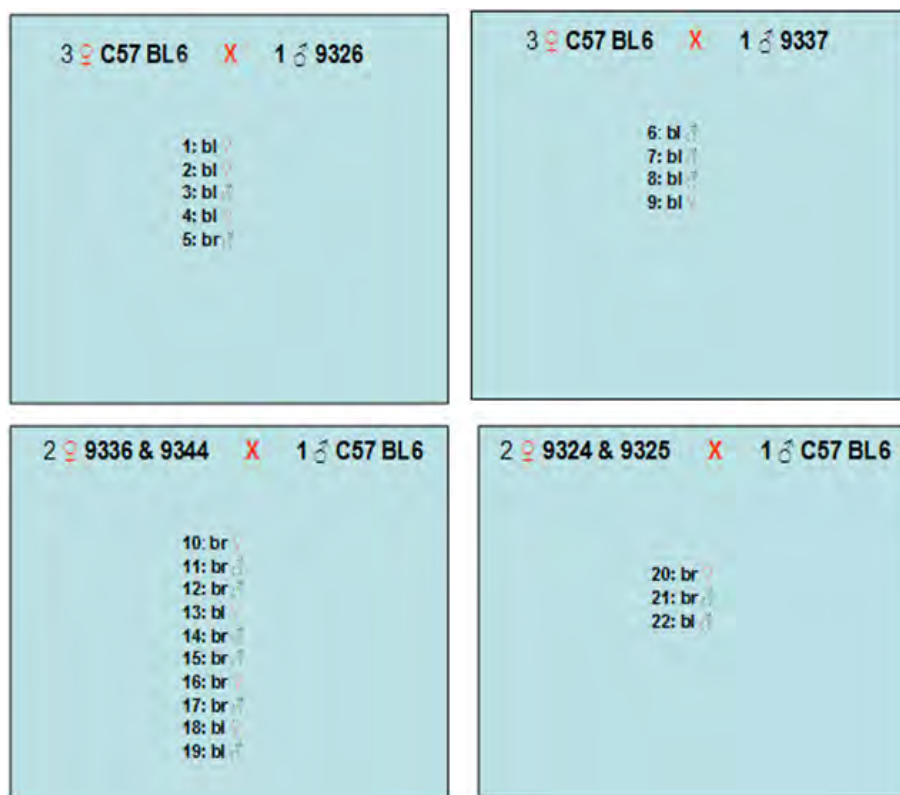


Πρόεκυψαν τα ακόλουθα ιδρυτικά υβρίδια: 9314♂, 9324♀, 9325♀, 9326♂, 9336♀, 9337♂, 9344♀ και 9345♀.

3.3.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ W/T CORE ΙΟΥ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1a.

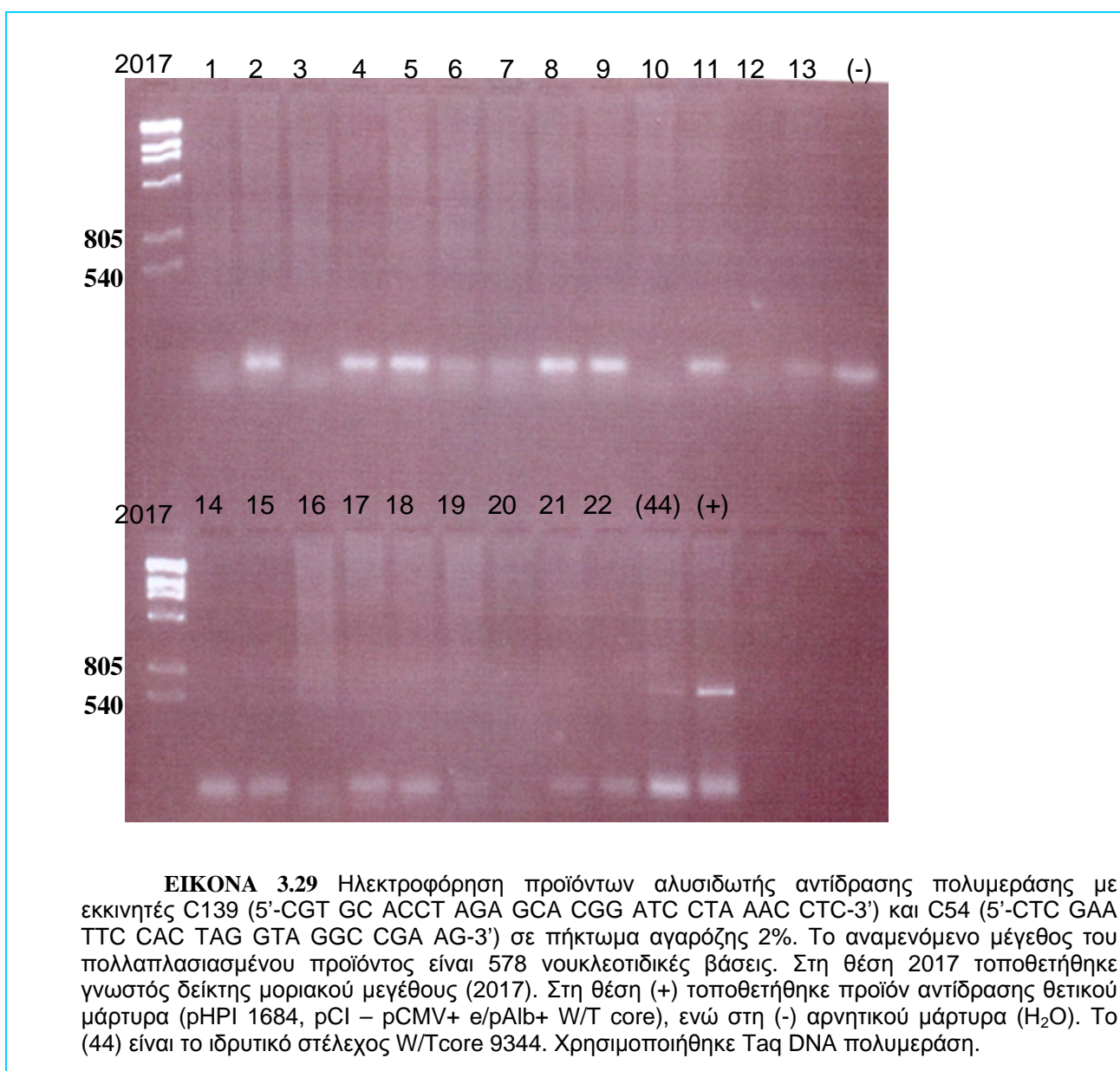
Τα ιδρυτικά υβρίδια απομονώθηκαν και διασταυρώθηκαν με C57/BL6 ποντικούς, προκειμένου να μεταβιβαστεί το διαγονίδιο W/T core και να εδραιωθεί η διαγονιδιακή σειρά. Απόγονοι θετικοί για την ανίχνευση του διαγονιδίου θα διασταυρωθούν πάλι με ποντικούς C57BL/6, ώστε με την πάροδο διασταυρώσεων, η διαγονιδιακή σειρά να τείνει σε ολικό γενετικό υπόστρωμα C57/BL6 ($\approx 100\%$), εξαλείφοντας το ιδρυτικό γενετικό υπόστρωμα CBA. Πράγματι, φαινοτυπικές διαφορές, λόγω έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a, παρατηρήθηκαν μόνο σε γενετικό υπόστρωμα C57/BL6, ενώ σε CBA ή FBV σειρές, οι διαγονιδιακοί ποντικοί δεν παρουσίασαν φαινοτυπικές διαφορές με τους αντίστοιχους κανονικούς. Ο Moriya και συνεργάτες έδειξαν ότι διαγονιδιακοί ποντικοί C57/BL6 που εκφράζουν την ιϊκή πρωτεΐνη W/T core της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a εμφάνισαν ηπατική στεάτωση τον έκτο μήνα, έπειτα ηπατική κίρρωση, ενώ 20% των κίρρωτικών ποντικών εκδήλωσαν ηπατοκυτταρικό καρκίνο το δωδέκατο μήνα.

Είκοσι δύο ποντικοί γεννήθηκαν κατόπιν διασταυρώσεων μεταξύ ιδρυτικών στελεχών W/T core και ποντικών C57/ BL6, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.28.



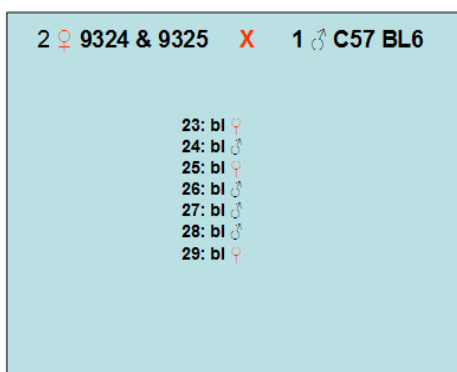
ΕΙΚΟΝΑ 3.28 Διασταυρώσεις και απόγονοι ιδρυτικών στελεχών W/T core με ποντικούς C57/ BL6.

Έγιναν βιοψίες ουράς ύστερα από 5 εβδομάδες και εν συνεχεία απομονώθηκε DNA από κάθε βιοψία. Εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε όλα τα δείγματα με τα ίδια αντιδραστήρια και συνθήκες, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση των ιδρυτικών στελεχών W/T core (ΕΙΚΟΝΑ 3.29).



ΕΙΚΟΝΑ 3.29 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές C139 (5'-CGT GC ACCT AGA GCA CGG ATC CTA AAC CTC-3') και C54 (5'-CTC GAA TTC CAC TAG GTA GGC CGA AG-3') σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Το αναμενόμενο μέγεθος του πολλαπλασιασμένου προϊόντος είναι 578 νουκλεοτιδικές βάσεις. Στη θέση 2017 τοποθετήθηκε γνωστός δείκτης μοριακού μεγέθους (2017). Στη θέση (+) τοποθετήθηκε προϊόν αντίδρασης θετικού μάρτυρα (pHPI 1684, pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core), ενώ στη (-) αρνητικού μάρτυρα (H₂O). Το (44) είναι το ιδρυτικό στέλεχος W/Tcore 9344. Χρησιμοποιήθηκε Taq DNA πολυμεράση.

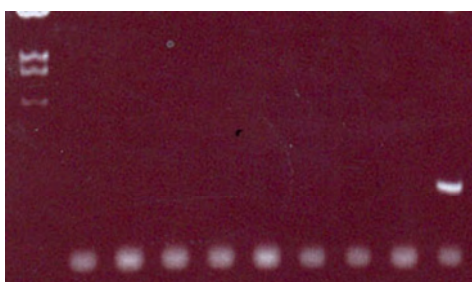
Καμμία θετική ζώνη δεν ανιχνεύτηκε στα 22 γενωμικά δείγματα, ενώ στους δύο θετικούς μάρτυρες (ιδρυτικό στέλεχος 9344 και πλασμίδιο pHPI 1684, pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core) η ζώνη που προσδιορίζει την ύπαρξη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core είναι εμφανής. Παράλληλα, επτά νέοι ποντικοί γεννήθηκαν από την διασταύρωση που φαίνεται στην εικόνα 3.30 και έγιναν βιοψίες ουράς την εικοστή ημέρα μετά την γέννησή τους. Το DNA απομονώθηκε με την ίδια τεχνική όπως και στις προηγούμενες βιοψίες.



ΕΙΚΟΝΑ 3.30 Διασταύρωση και απόγονοι δύο ιδρυτικών στελεχών W/T core με ποντικούς C57/ BL6.

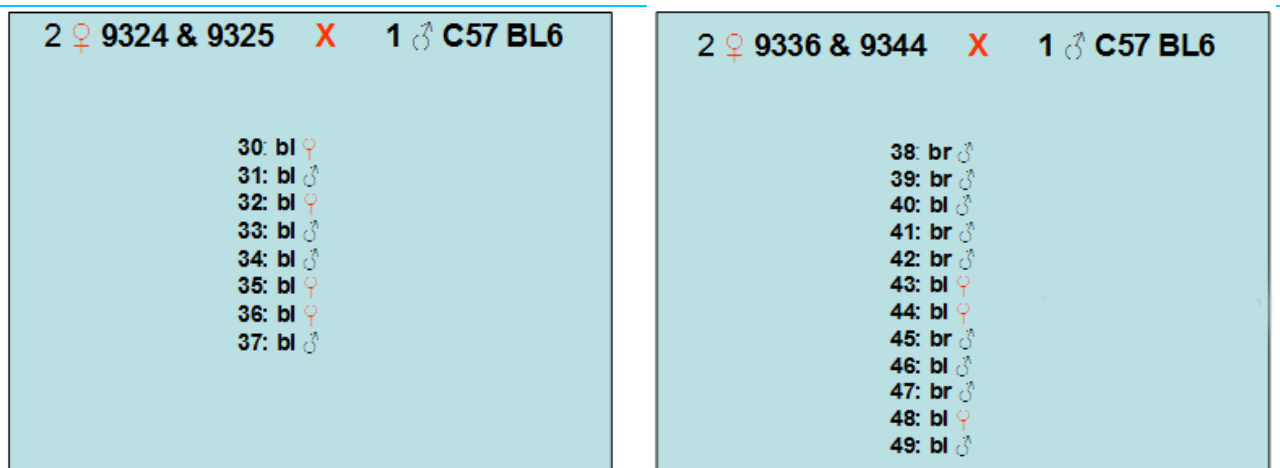
Πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στα επτά νέα δείγματα για ανίχνευση πιθανής μεταβίβασης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core. Τα δείγματα ηλεκτροφορηθήκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

2017 (-) 23 24 25 26 27 28 29 9324



ΕΙΚΟΝΑ 3.31 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές C139 (5'-CGT GC ACCT AGA GCA CGG ATC CTA AAC CTC-3') και C54 (5'-CTC GAA TTC CAC TAG GTA GGC CGA AG-3') σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Το αναμενόμενο μέγεθος του πολλαπλασιασμένου προϊόντος είναι 578 νουκλεοτιδικές βάσεις. Στη θέση 2017 τοποθετήθηκε γνωστός δείκτης μοριακού μεγέθους (2017). Στη θέση (+) τοποθετήθηκε προϊόν αντίδρασης θετικού μάρτυρα (pHPI 1684, pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core), ενώ στη (-) αρνητικού μάρτυρα (H₂O). Το (9324) είναι το ιδρυτικό στέλεχος W/Tcore 9324. Χρησιμοποιήθηκε Taq DNA πολυμεράση.

Δεν ανιχνεύτηκε καμία ζώνη στο ύψος της W/T core στις επτά βιοψίες, ενώ η ζώνη είναι εμφανής στο θετικό μάρτυρα 9324 (ιδρυτικό στέλεχος), αποδεικνύοντας ότι η PCR ήταν επιτυχής, ενώ κανένας νεογνός ποντικός δεν έφερε το διαγονίδιο W/T core (ΕΙΚΟΝΑ 3.31). Πραγματοποιήθηκαν νέες διασταυρώσεις προκειμένου να αυξηθεί η πιθανότητα εύρεσης ποντικού δεύτερης γενιάς, στον οποίο να έχει μεταβιβαστεί το διαγονίδιο έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core. Οι νέες διασταυρώσεις και οι αντίστοιχες γενήσεις αναφέρονται στην εικόνα 3.32.



ΕΙΚΟΝΑ 3.32 Διασταυρώσεις και απόγονοι ιδρυτικών στελεχών W/T core με ποντικούς C57/ BL6

Απομονώθηκε γενωμικό DNA από βιοψίες ουράς και χρησιμοποιήθηκε σε αλυσιδωτη αντίδρασης πολυμεράσης για την ανίχνευση ποντικού δεύτερης γενιάς, στον οποίο μεταβιβάστηκε το διαγονίδιο έκφρασης της ιίκης πρωτεΐνης W/T core.

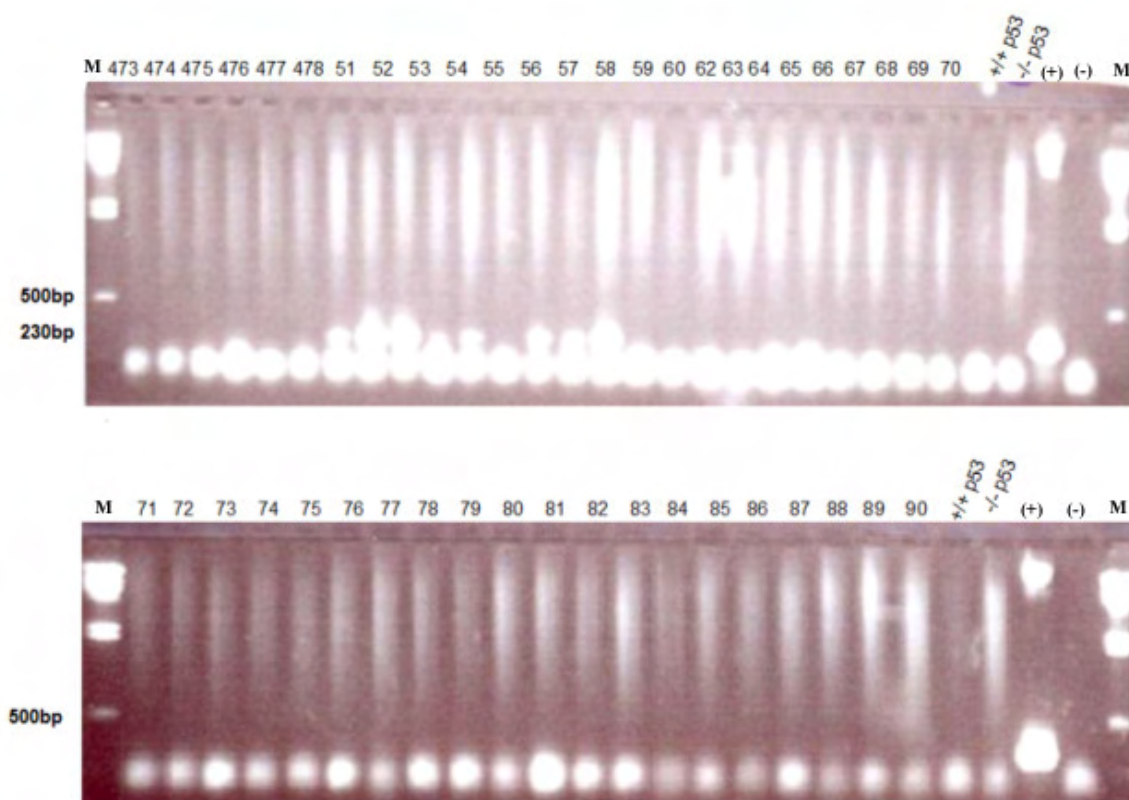


ΕΙΚΟΝΑ 3.33 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές C139 (5'-CGT GC ACCT AGA GCA CGG ATC CTA AAC CTC-3') και C54 (5'-CTC GAA TTC CAC TAG GTA GGC CGA AG-3') σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Το αναμενόμενο μέγεθος του πολλαπλασιασμένου προϊόντος είναι 578 νουκλεοτιδικές βάσεις. Στη θέση 2017 τοποθετήθηκε γνωστός δείκτης μοριακού μεγέθους (2017). Στη θέση (+) τοποθετήθηκε προϊόν αντίδρασης θετικού μάρτυρα (pHPI 1684, pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core), ενώ στη (-) αρνητικού μάρτυρα (H₂O). Το (9324) είναι το ιδρυτικό στέλεχος W/Tcore 9324. Χρησιμοποιήθηκε Taq DNA πολυμεράση.

Χρησιμοποιώντας εκκινητές C54 και C139 ανιχνεύθηκαν όλα τα θετικά ιδρυτικά στελέχη για την ενσωμάτωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core, ενώ για ακόμη μία φορά κανένα νεογνό δεν ήταν θετικό για το αντίστοιχο διαγονίδιο (ΕΙΚΟΝΑ 3.33).

3.3.6. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ C57/BL6-CBA ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ CORE+1/S ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1a.

Εμβολιάστηκαν 154 ωάρια ψευδοέγγυων ποντικών ♀ C57BL/6-CBA με 50ng DNA Albe/p+core+1/S / ωάριο. Γενήθηκαν σαράντα οκτώ υβρίδια (473-478 και 51-90). Έγιναν βιοψίες ουράς ύστερα από 4 εβδομάδες και εν συνεχεία απομονώθηκε DNA από κάθε βιοψία. Εξετάστηκαν 48 δείγματα ολικού γενομικού DNA για πιθανή ενσωμάτωση της κωδικής αλληλουχίας έκφρασης της πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.34 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές N222 (5'- CTC GAA TTC AGT TCA CGC CGT CTT CCA G -3') και N298 (5'- CCG GAA TTC CCC CTC TAT GGC AAT GAG GG -3') σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το αναμενόμενο μέγεθος του πολλαπλασιασμένου προϊόντος είναι 230 νουκλεοτιδικές βάσεις. Όταν αναγράφεται πάνω από κάποιο δείγμα το γράμμα M είναι ο αντίστοιχος δείκτης DNA M 1kb. Στη θέση M τοποθετήθηκε γνωστός δείκτης μοριακού μεγέθους

(2017). Στη θέση (+) τοποθετήθηκε προϊόν αντίδρασης θετικού μάρτυρα (pHPI 1687, pCI – pCMV+ e/pAlb+ core+1/S), ενώ στη (-) αρνητικού μάρτυρα (H₂O). Επίσης, ηλεκτροφορήθηκαν και δείγματα PCR ποντικών ομόλογων ή γυμνών στο γονίδιο p53 (p53+/, p53-/-), για περαιτέρω ποιοτικό έλεγχο της αντίδρασης. Χρησιμοποιήθηκε Taq DNA πολυμεράση.

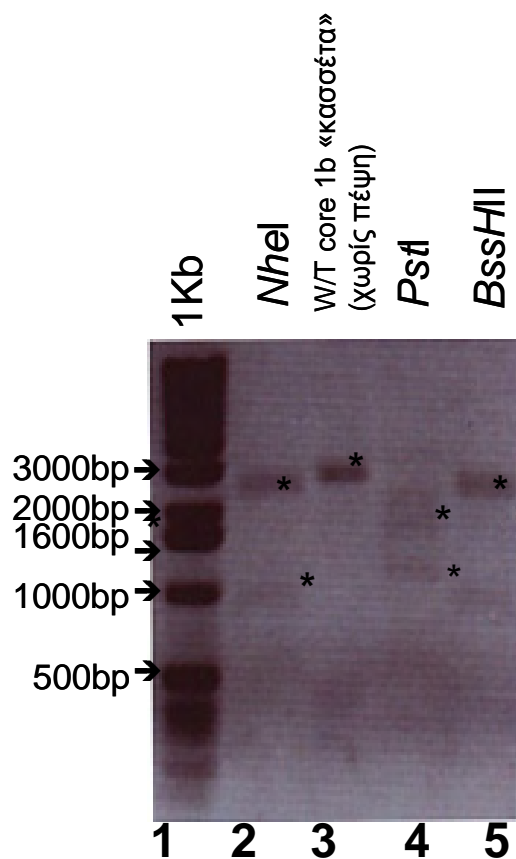
Ανιχνεύτηκαν οκτώ νεογνά με ενσωματωμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S (ΕΙΚΟΝΑ 3.34). Προέκυψαν τα ακόλουθα ιδρυτικά υβρίδια: 51♂, 52♂, 53♀, 54♀, 55♀, 57♀, 58♂ και 59♀.

3.3.8 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΕΚΦΡΑΖΕΙ ΤΗΝ ΙΪΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ W/T CORE ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1b.

Κατασκευάστηκε πλασμίδιο που φέρει την κωδική αλληλουχία έκφρασης της ιϊκής πρωτεΐνης W/T core της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b. Το πλασμίδιο αυτό pHPI 1950/pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core 1b, βασίζεται στον πλασμιδιακό φορέα pCI – pCMV+ e/pAlb (pHPI 1683). Το τμήμα DNA που ευθύνεται για την έκφραση της πρωτεΐνης W/T core, απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα Core 1b BT (ευγενική προσφορά του Καθ. Brechot).

3.3.9. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΟΥ W/T CORE 1B ΠΡΙΝ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΤΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ C57/BL6-CBA.

Αφού, επικυρώθηκε η έκφραση του παραπάνω πλασμιδίου, απομονώθηκε DNA σε μεγάλη κλίμακα από κατάλληλα μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη DH5α. Η αλληλουχία που θα χρησιμοποιηθεί στον εμβολιασμό ποντικών C57/BL6-CBA, απελευθερώθηκε από το πατρικό όχημα (pHPI 1950/pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core 1b) με ένζυμα περιορισμού *Bam*HI & *Hind*III. Το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης, το DNA καθαρίστηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και διαλύθηκε σε 200μl ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος MIJ (Micro – Injection Buffer). Η ακεραιότητα του διαγονιδίου W/T core 1b που θα χρησιμοποιηθεί στον εμβολιασμό ποντικών C57/BL6-CBA επιβεβαιώθηκε με περαιτέρω ενζυμικές πέψεις (Εικόνα 3.35).



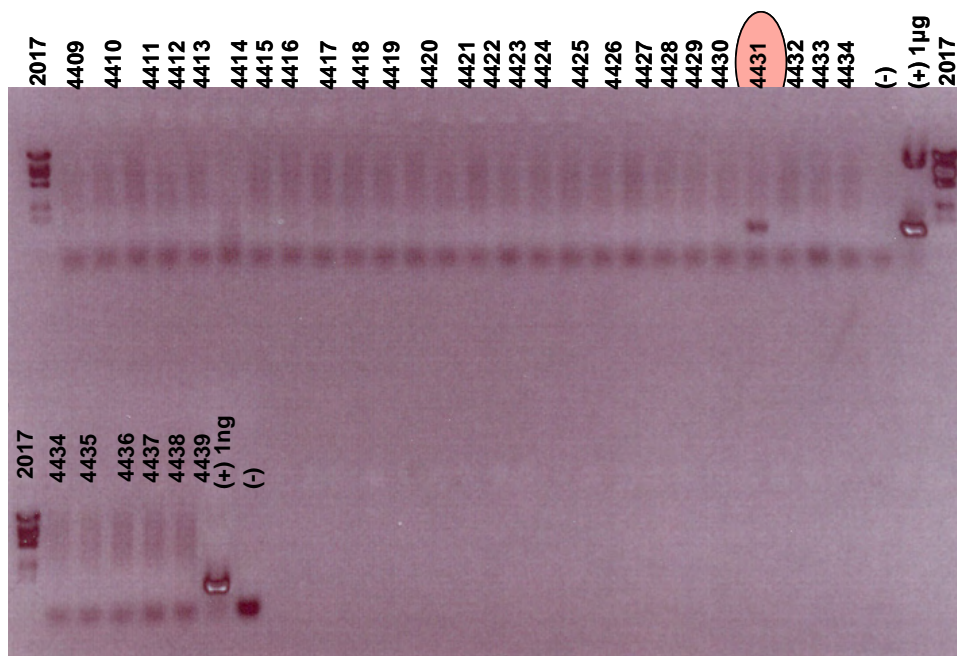
ΕΙΚΟΝΑ 3.35 Έλεγχος ακεραιότητας διαγονιδιακής «κασσέτας» W/T core 1b με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το βοθρίο 3 περιέχει μη κατεργασμένη διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b με ενδονουκλεάση. Η διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b απομονώθηκε από το πλασμίδιο pHPI 1950 με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Bam*HI και *Hind*III. Το βοθρίο 2 περιέχει διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b κατατμήμενη με *Nhe*I ενδονουκλεάση. Αναμένονται δύο ζώνες μεγέθους 2381 και 983 νουκλεοτιδικών βάσεων. Το βοθρίο 4 περιέχει διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b κατατμήμενη με *Pst*I ενδονουκλεάση. Αναμένονται δύο ζώνες μεγέθους 1964 και 1400 νουκλεοτιδικών βάσεων. Το βοθρίο 5 περιέχει διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b με ενδονουκλεάση *Bss*HII. Αναμένονται τρεις ζώνες μεγέθους 2301, 975 και 88 νουκλεοτιδικών βάσεων. Τέλος, στο βοθρίο 1 βρίσκεται ο δείκτης DNA γνωστού μοριακού μήκους 1kb.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.35 γίνεται άμεσα αντιληπτό ότι τα προϊόντα των εξυμικών αντιδράσεων περιορισμού της αλληλουχίας του διαγονιδίου W/T core 1b έχουν το αναμενόμενο μέγεθος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαγονιδιακή «κασσέτα» W/T core 1b απομονώθηκε ακέραιη από το πατρικό όχημα pHPI 1950.

3.3.10. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ C57/BL6-CBA ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΗΣ W/T CORE 1B ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Εμβολιάστηκαν 117 wάρια ψευδοέγγυων ποντικών ♀ C57BL/6-CBA με 50ng DNA Albe/p+W/Tcore 1b / wάριο. Γενήθηκαν τριάντα ένα υβρίδια (4409-4439). Έγιναν βιοψίες ουράς ύστερα από 4 εβδομάδες και απομονώθηκε DNA από κάθε βιοψία. Εξετάστηκαν 31 δείγματα

ολικού γενομικού DNA για πιθανή ενσωμάτωση της κωδικής αλληλουχίας έκφρασης της πρωτεΐνης W/T core του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.36 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με εκκινητές N276 (5'- CCG GAA TTC ACC ATG AGC ACG AAT CCT AAC -3') και N277 (5'- CCG GAA TTC GAG GGG GGC GCC GAC GAG CGG AAT G -3') υβριδικών δειγμάτων DNA (9313-9346) σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το αναμενόμενο μέγεθος του πολλαπλασιασμένου προϊόντος είναι 212 νουκλεοτιδικές βάσεις. Στη θέση 2017 τοποθετήθηκε γνωστός δείκτης μοριακού μεγέθους (2017). Στη θέση (+) τοποθετήθηκε προϊόν αντίδρασης θετικού μάρτυρα (pHPI 1950, pCI – pCMV+ e/pAlb+ W/T core 1b), ενώ στη (-) αρνητικού μάρτυρα (H₂O). Ο θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 1µg και 1ng. Χρησιμοποιήθηκε Taq DNA πολυμεράση.

Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.36 προκύπτει μόνο ένα ιδρυτικό υβρίδιο, θετικό για την ενσωμάτωση της κωδικής αλληλουχίας έκφρασης της πρωτεΐνης W/T core 1b (4431 ♂).

3.3.11. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ W/T CORE ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Γ ΜΕ ΓΟΝΟΤΥΠΟ 1b.

Τα ιδρυτικό υβρίδιο (4431 ♂) διασταυρώθηκε με ♀ ποντικούς C57/BL6. Μερικές εβδομάδες αργότερα και με συχνές αλλαγές αρκετών θηλυκών ποντικών, σε μερικές μάλιστα περιπτώσεις διαφορετικού γενετικού υποστρώματος (CBA και FBV), διαπιστώθηκε ότι ιδρυτικό υβρίδιο ήταν στείρο. Προς μεγάλη ατυχία ημέρες πριν την προγραμματισμένη εξωσωματική γονιμοποίηση ο ποντικός απεβίωσε σε ηλικία 11 εβδομάδων. Στη συνέχεια διενεργήθηκαν και άλλοι εμβολιασμοί ποντικών C57BL/6-CBA με τη διαγονιδιακή «κασσέτα» W/Tcore 1b, αλλά δεν ανιχνεύτηκε κανένα θετικό υβρίδιο για την ενσωμάτωση του διαγονιδίου.

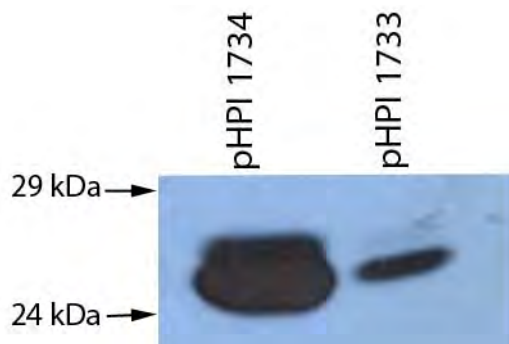
3.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΙΣΧΥΟΣ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ CMV ΚΑΙ EF-1α.

3.4.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΥΠΟΚΙΝΗΤΩΝ.

Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκαν δύο πλασμίδια με τη φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP σαν γονίδιο αναφοράς. Η φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού και του ευκαρυωτικού EF-1α (Elongation Factor-1α) υποκινητή (ρHPI 1733 και ρHPI 1734 αντιστοιχα). Με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού επιτεύχθηκε άμεση εισαγωγή της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP (προέρχεται από το πλασμίδιο ρEGFP-N3) και κατασκευάστηκε το πρώτο πλασμίδιο (ρHPI 1733). Κατόπιν, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ένζυμα περιορισμού ο υποκινητής CMV του ρHPI 1733 αντικαταστήθηκε από τον υποκινητή EF-1α, δημιουργώντας το πλασμίδιο ρHPI 1734. Το πατρικό όχημα των παραπάνω πλασμιδίων είναι ο MTS-1, μία παραλλαγή του αρχικού πλασμιδίου ρAcSG2, κατά την οποία μέσα στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, έχει κλωνοποιηθεί ο υποκινητής CMV του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού. Ο MTS-1 είναι κατάλληλος για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών και χάρη στον υποκινητή CMV επιτυγχάνεται αυξημένη έκφραση σε παροδική διαμόλυνση θηλαστικών κυττάρων.

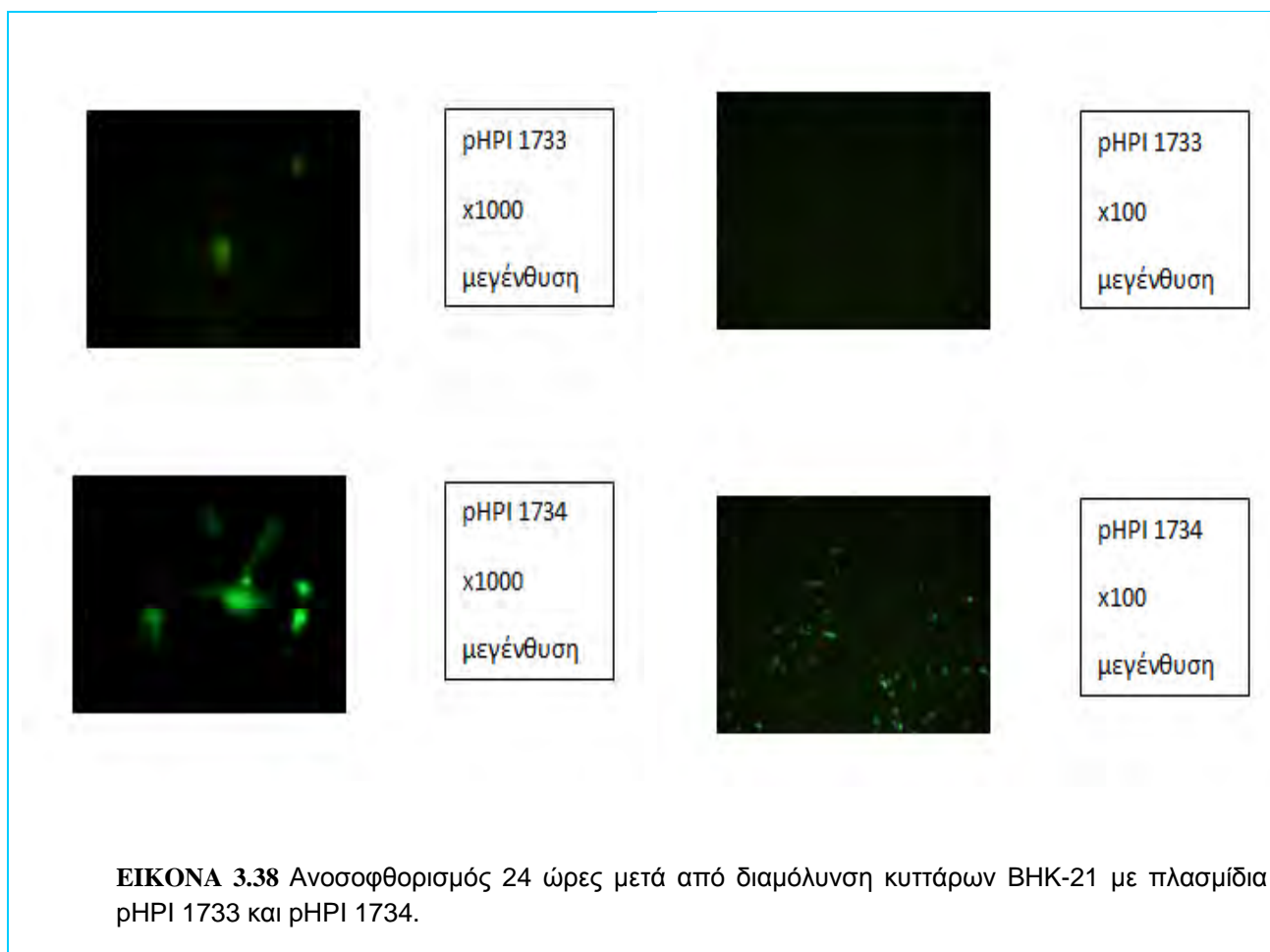
3.4.2 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΒΗΚ-21 ΜΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΡΗΡ1 1733 ΚΑΙ 1734

Κύτταρα ΒΗΚ-21 (ινοβλάστες φυσιολογικού νεφρού συριακού χρυσού κρικετομύ) επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια που φέρουν τη φθορίζουσα πράσινη πρωτεΐνη GFP κάτω από τον έλεγχο υποκινητή CMV (ρHPI 1733) και κάτω από υποκινητή EF-1α. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε με χρήση του λιποσώματος της λιποφεκταμίνης. Σαραντά οκτώ ώρες μετά την επιμόλυνση, τα κύτταρα συλλέχτηκαν και λύθηκαν με χρήση του τριπλού απορρυπαντικού. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης και η νιτροκυτταρίνη υβριδίστηκε με πολύκλωνο αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.37 Ανοσοστύπωση τύπου Western του pHPI 1733 (CMV+GFP) και pHPI 1734 (EF-1α +GFP) πλασμιδίων. Το αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης ήταν 12% και χρησιμοποιήθηκε πολύκλωνο αντίσωμα έναντι της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP σε συγκέντρωση 1/1000. Ο χρόνος έκθεσης του φίλμ στην νιτροκυτταρίνη ήταν 30 δευτερόλεπτα.

Από την εικόνα 3.37 διαπιστώνουμε ότι η ένταση της ζώνης της πρωτεΐνης GFP που παρήχθει υπό τον έλεγχο του υποκινητή EF-1α είναι τουλάχιστον 30 φορές εντονότερη από την αντίστοιχη ποσότητα πρωτεΐνης GFP που παράγεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή CMV σε BHK-21 κύτταρα. Η ενεργότητα των δυο υποκινητών ελέγχθηκε και με ανοσοφθορισμό 24 ώρες μετά την παροδική επιμόλυνση των BHK-21 κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια. Παρατήρηση και φωτογράφιση σε διάφορες μεγεθύνσεις (1600x1024, 600 d.p.i.) των επιμολυσμένων κυττάρων αποκάλυψε ότι μόλις το 10% των επιμολυσμένων κυττάρων με το πλασμίδιο pHPI 1733 εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη ενώ η έκφρασή της ανιχνεύονταν σε ποσοστά άνω του 40% όταν χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pHPI 1734 στη διαμόλυνση κυττάρων (ΕΙΚΟΝΑ 3.38).



Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι κατά την παροδική επιμόλυνση BHK-21 κυττάρων με τα παραπάνω πλασμίδια, το επίπεδο έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, είναι μεγαλύτερο υπό τον έλεγχο του EF-1α υποκινητή, σε αντίθεση με τον CMV υποκινητή. Επομένως η ισχύς του του EF-1α υποκινητή στην BHK-21 κυτταρική σειρά είναι μεγαλύτερη και η μεταγραφική ενεργότητά του είναι φανερή από τις πρώτες κιόλας ώρες της διαμόλυνσης.

3.4.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΟΥΛΟΪΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΑ ΤΑ ΡΗΡ1 1733 ΚΑΙ ΡΗΡ1 1734 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.

Η επιλογή της ενασχόλησής μας με το πατρικό όχημα MTS-1 (pAsCG2 + CMV) δεν ήταν τυχαία, μιας και τα παραπάνω πλασμίδια (pHP1 1733 και pHP1 1734) χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα και για την αναπαραγωγή βακουλοϊών (Bac 1733 και Bac 1734). Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο πλασμιδιακός φορέας pAsCG2 φέρει υποκινητή της πολυεδρίνης του εντόμου

Autographa californica και χρησιμοποιείται για την κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών. Ενσωματωμένες αλληλουχίες ή γονίδια που έχουν κλωνοποιηθεί στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, μπορούν να μεταφερθούν στη θέση της πολυεδρίνης, στο DNA του βακουλοϊού, με αποτέλεσμα την παραγωγή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών.

Είναι ένα άλλο *in vitro* σύστημα που θα μας κατευθύνει στην διερεύνηση πιθανής διαφοράς ισχύος υποκινητή στους παραπάνω βακουλοϊούς. Η σημαντικότητα ή η καινοτομία αυτής της μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι η χρήση βακουλοϊών ως σύστημα γονιδιακής παράδοσης είναι ακόμη πολύ νέο και οποιαδήποτε διαφορά στην ενεργότητα μεταξύ των δύο υποκινητών θα αποτελέσει έναρξη για την αποκλειστική παραγωγή και χρήση του ενός από των δύο υποκινητών σε πλασμίδια κατάλληλα για την αναπαραγωγή βακουλοϊών. Βέβαια, προκειμένου να επιβεβαιωθεί οποιοδήποτε τέτοιο αποτέλεσμα θα πρέπει να προηγηθεί εκτεταμένη μόλυνση των παραπάνω βακουλοϊών σε ποκίλλες κυτταρικές σειρές.

Παράλληλα θα πρέπει να σημειωθεί ότι παράχθηκαν και άλλοι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν, φέρουν κωδικές αλληλουχίες για την έκφραση ιικών πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ και περιγράφονται λεπτομερώς στην παράγραφο των πλασμιδίων. Αναφορικά οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί που εκφάζουν ιικές πρωτεΐνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως σύστημα γονιδιακής παράδοσης σε διάφορες πειραματικές διεργασίες, όπως προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης κυτοκινών και χημοκινών, μελέτη της ουβικιτινιλίωσης πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ, απομόνωση και καθαρισμός μίας παραγόμενης πρωτεΐνης, καθώς και σύγκριση της ποσοτικής μόλυνσης ιικών πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών.

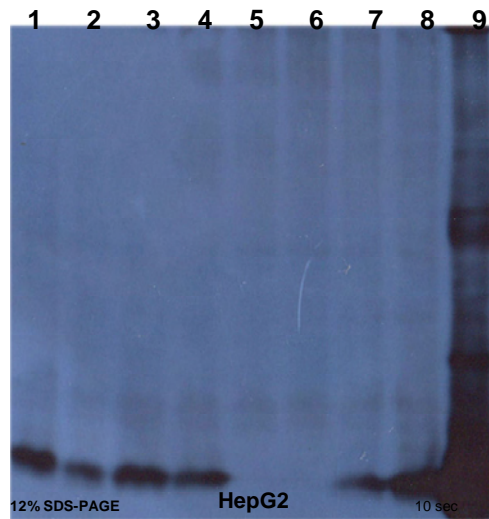
Ειδικότερα, αφού αναπαράχθηκαν οι δύο βακουλοϊοί Bac 1733 και Bac 1734, τα τελικά ιικά εφόδια (P3 stocks) τιτλοφορήθηκαν χρησιμοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις του ιικού εφοδίου σε Sf-9 κυτταρα, που προέρχεται από την κυτταρική σειρά IPLBSF-21, από το νυμφικό ωθητικό ιστό του εντόμου *Spodoptera frugiperda*. Ο υπολογισμός του τίτλου του Bac 1733 έδειξε ότι είναι 3×10^8 ιικά σωματίδια / ml, ενώ ο τίτλος του Bac 1734 ανέρχονταν 1×10^9 ιικά σωματίδια / ml. Μολονότι η τιμή των τιτλοφορήσεων και των δύο ανασυνδυασμένων βακουλοϊών ξεπερνά τα 10^8 ιικά σωματίδια / ml, επιτρέποντας το ιικό εφόδιο να χρησιμοποιηθεί για μολύνσεις και μελέτες έκφρασης, δε μπορεί να διεξαχθεί οποιαδήποτε ποιοτική και ποσοτική σύγκριση μεταξύ των δύο βακουλοϊών, εφόσον το ανώτερο όριο διαφοράς ανάμεσα σε δύο ιικούς τίτλους πρέπει να κυμαίνεται μέχρι την τιμή απόκλισης της μισής λογαριθμικής μονάδας. Συνεπώς, νέα ιικά εφόδια των δύο βακουλοϊών παράχθηκαν και τιτλοφορήθηκαν. Ο

υπολογισμός του νέου τίτλου του Bac 1733 έδειξε ότι είναι 5×10^8 ιικά σωματίδια / ml, ενώ ο νέος τίτλος του Bac 1734 ανέρχονταν 2×10^8 ιικά σωματίδια / ml.

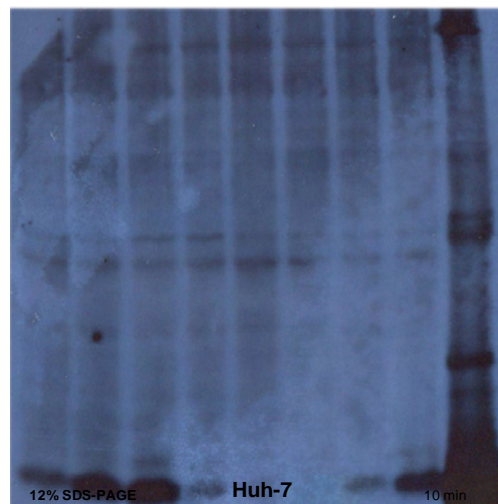
Κατόπιν, 100 Μ.Ο.Ι. (100 ιοί / κύτταρο) από τον κάθε βακουλοϊό χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση BHK-21 κυττάρων. Μετά απο 24 ώρες μόλυνσης τα κύτταρα ελέχθηκαν κατω απο μικροσκόπιο φθορισμού και κυτταρομετρία ροής (FACS), όπου διαπιστώθηκε ότι μονο το 50% των κυττάρων ήταν μολυσμενα με το Bac1733 βακουλοϊό, ενώ μόνο το 30% των κυττάρων βρέθηκαν να είναι μολυσμένα με το Bac1734 βακουλοϊό. Στη συνέχεια BHK-21 κύτταρα απο άλλη ανεξάρτητη μόλυνση με τους δύο βακουλοϊούς λύθηκαν 48 ώρες μετά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του τριπλού απορρυπαντικού. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS πολυακρυλαμίδης. Για την ανοσοσύτπωση τύπου Western χρησιμοποιήθηκε πολύκλωνο αντίσωμα έναντι της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP σε συγκέντρωση 1/1000. Η ένταση των ζωνών της φθορίζουσας πράσινης πρωτεΐνης GFP ήταν σχεδόν ίδια και στα δύο κυτταρικά εκχυλίσματα των μολυσμένων κυττάρων από τους αντίστοιχους βακουλοϊούς (Ιδιοκτησία αποτελεσμάτων Ε. Κοχλιού).

3.4.4 ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEPG2 ΚΑΙ HUH-7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΜΕ ΤΑ ΡΗΡΙ 1733 ΚΑΙ ΡΗΡΙ 1734 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ.

Τα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν στην διαμόλυνση ηπατικών κυτταρικών σειρών HepG2 (ΕΙΚΟΝΑ 3.39), Huh-7 (ΕΙΚΟΝΑ 3.40) και χαρακτηρίστηκαν με ανοσοσύτπωση τύπου Western χρησιμοποιώντας πολύκλωνο GFP αντίσωμα. Η πειραματική διαδικασία των κυτταρικών μολύνσεων επαναλήφθηκε σε τρεις ανεξάρτητες ημέρες, καθώς και χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο της β-γαλακτοσιδάσης προκειμένου να ελεγχθεί το ποσοστό διαμόλυνσης στα αντίστοιχα κύτταρα μεταξύ των δυο πλασμιδίων. Ειδικότερα χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα της BetaGlo Assay (Promega) η παραγόμενη β-γαλακτοσιδάση μετατρέπεται σε D-luciferin, όπου σε φθορισμόμετρο μπορεί να μετρηθεί η έκκληση φωταύγειας της. Τοιουτοτρόπως, σχετικά ίδια ποσοστά διαμόλυνσης στα αντίστοιχα κύτταρα μεταξύ των δυο πλασμιδίων, φέρουν και σχεδόν όμοιες τιμές παραγωγής D-luciferin.



ΕΙΚΟΝΑ 3.39 Ανοσοσύτρωση τύπου Western του rHPI 1733 & rHPI 1734 σε HepG2 κύτταρα. Ηπατικά κύτταρα HepG2 διαμολυνθήκαν παροδικά για 48 ώρες με πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο αναφοράς GFP, υπό υποκινητή CMV και EF-1α , αντιστοίχως. Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε 12% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοσύτρωση τύπου Western, χρησιμοποιώντας πολύκλωνο αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 1/1000. Ειδικότερα στα φρεάτια 2,4 και 7 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο rHPI 1733 (CMV-GFP), ενώ στα φρεατια 1,3 και 8 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο rHPI 1734 (EF-1α -GFP), αντιστοίχως. Επίσης, στα φρεάτια 5 και 6 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα από μη διαμολυσμένα HepG2, καθώς και στο φρεατιο υπο τον αναγραφόμενο αριθμό 9 έχουν φορτωθεί κυτταρικά εκχυλίσματα από διαμολυσμένα HepG2 κύτταρα με ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο αναφοράς GFP υπό υποκινητή της πολυεδρίνης (πρωτεΐνη εντόμου), ως θετικός μάρτυρας ελέγχου.



ΕΙΚΟΝΑ 3.40 Ανοσοσύτρωση τύπου Western του rHPI 1733 & rHPI 1734 σε Huh-7 κύτταρα. Ηπατικά κύτταρα Huh-7 διαμολυνθήκαν παροδικά για 48 ώρες με πλασμίδια που περιέχουν το γονίδιο αναφοράς GFP, υπό υποκινητή CMV και EF-1α , αντιστοίχως. Η ηλεκτροφόρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σε 12% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοσύτρωση τύπου Western, χρησιμοποιώντας πολύκλωνο αντίσωμα έναντι της GFP πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 1/1000. Ειδικότερα στα φρεάτια 1,4 και 7 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο rHPI 1733 (CMV-GFP), ενώ στα φρεατια 2,3 και 8 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο rHPI 1734 (EF-1α -GFP), αντιστοίχως. Επίσης, στα φρεάτια 5 και 6 έχουν εισαχθεί κυτταρικά εκχυλίσματα από μη διαμολυσμένα Huh-7, καθώς και στο φρεατιο υπο τον αναγραφόμενο αριθμό 9 έχουν φορτωθεί κυτταρικά εκχυλίσματα από διαμολυσμένα Huh-7 κύτταρα με ένα πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο αναφοράς GFP υπό υποκινητή της πολυεδρίνης (πρωτεΐνη εντόμου), ως θετικός μάρτυρας ελέγχου.

Η ένταση της ζώνης της GFP πρωτεΐνης υπό EF-1a υποκινητή είναι τουλάχιστον 6 φορές πιο έντονη κατά μέσο ορό από εκείνη της αντίστοιχης GFP υπό CMV υποκινητή στα παροδικά διαμολυσμένα HepG2 κύτταρα (ΕΙΚΟΝΑ 3.39) Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα Huh-7 κύτταρα, όπου η διαφορά έντασης της ζώνης της πρωτεΐνης GFP είναι πολύ μεγαλύτερη, τουλάχιστον 20 φορές, μεταξύ των δυο υποκινητών (ΕΙΚΟΝΑ 3.40). Επίσης το ποσοστό διαμόλυνσης στα αντίστοιχα κύτταρα μεταξύ των δυο πλασμιδίων ήταν σχετικά το ίδιο, εφόσον οι τιμές της επαγόμενης Luciferin-D από την παραχθείσα β-γαλακτοσιδάση διέφεραν λιγότερο από 15% μεταξύ τους.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελέτες έκφρασης της κωδικής περιοχής του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Γ έδειξαν από τα μέσα της δεκαετίας του '90 ότι από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία της καψιδιακής πρωτεΐνης core του ιού εκφράζεται μία μικρότερη πρωτεΐνη 17kDa περίπου. Παράλληλα από συγκρίσεις των διαθέσιμων αλληλουχιών των στελεχών του ιού που έγιναν την ίδια εποχή εντοπίστηκε μία συντηρημένη περιοχή στη κωδική αλληλουχία core του ιού της ηπατίτιδας Γ. Ακολούθησαν μελέτες, σε τρία εργαστήρια, που έδειξαν ότι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ, που επικαλύπτεται της κωδικής αλληλουχίας core κατά +1 νουκλεοτίδιο, μεταφράζεται τόσο σε ακυτταρικά συστήματα όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Απόδειξη για τη μετάφραση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης core+1 κατά τη φυσική μόλυνση του ιού δόθηκε με την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι ειδικών επιτόπων core+1 σε ορούς ασθενών με οξεία ή χρόνια λοίμωξη από τον ιό και παρουσία ανοσοαπόκρισης Τ λεμφοκυττάρων σε core+1 επιτόπους^{189,190}. Η βιολογική σημασία των διαφόρων μορφών της πρωτεΐνης core+1 που εκφράζονται από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης +1 καθώς και κοινές λειτουργίες που διαθέτει με την core πρωτεΐνη, παραμένουν άγνωστες. Παρόλο αυτά όπως είδαμε και παραπάνω προκύπτουν κάποιες ενδείξεις για τη βιολογική σημασία των μορφών της πρωτεΐνης²⁰⁴⁻²¹⁰. Στη παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η βιολογική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ *in vitro* και *in vivo*, με τέσσερεις κυρίως επιμέρους στόχους:

- A. Επίδραση της πρωτεΐνης core/core+1 στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης.
- B. Κατασκευή νέων ηπατικών υποκινητών και έλεγχο της δράσης της πρωτεΐνης core/core+1 στη μεταγραφική τους ενεργότητα.
- Γ. Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών core/core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ.
- Δ. Σύγκριση υποκινητών CMV & EF-1α για παρασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που φέρουν κωδικές αλληλουχίες για έκφραση πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ.
- A.** Επίδραση της πρωτεΐνης core/core+1 στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης.

Η ολοκληρωμένη μελέτη της ιικής δράσης οφείλει να περιλαμβάνει έλεγχο: α του ιστού που μολύνεται, β. της απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, γ. της κυτταρικής ενδοεπικοινωνίας μεταξύ προσβεβλημένων και υγιών κυττάρων, και δ. πάνω από όλα την κλινική εικόνα του οργανισμού που νοσεί. Το αποτέλεσμα της φυσικής πορείας της μόλυνσης

από τον ιό της ηπατίτιδας Γ καθορίζεται κυρίως από την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Η αρχική και ενδιάμεση ανοσοαπόκριση του οργανισμού σε λοίμωξη, μόλυνση ή τραύμα ονομάζεται συλλογικά οξεία φάση απόκρισης σε ερέθισμα ή στρες, που αν και σε φυσιολογική απειλή είναι σύντομης διάρκειας, μπορεί να βλάψει σοβαρά τον οργανισμό σε περίπτωση χρόνιας λοίμωξης. Κατά την οξεία φάση απόκρισης του οργανισμού σε ερέθισμα ή στρες, συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στη φυσιολογία του ήπατος, των υποδοχέων που αναγνωρίζουν δομικά συστατικά των εισβαλόντων μικροβίων όπως τείχοικά οξέα, πολυσακχαρίδια, ενδοτοξίνες και των πρωτεϊνών οξείας φάσης, με σημαντικότερη την α1-αντιπρυψίνη. Η πειραματική ενασχόληση με την α1-αντιπρυψίνη άρχισε με δύο ηπατικούς χιμαιρικούς υποκινητές που έφεραν μέρος του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης. Συνεπιμολύνσεις ηπατικών και μη κυττάρων έδειξαν πως τα επίπεδα του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης μειώνονταν δραματικά παρουσία της ιϊκής πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε πλασμίδιο που έφερε μόνο τον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης συζευγμένο με το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης. Οι συνεπιμολύνσεις που ακολούθησαν έδειξαν ότι η παρουσία της πρωτεΐνης core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a επηρεάζει αρνητικά την μεταγραφική ενεργότητα των χιμαιρικών ενισχυτών/υποκινητών του ανθρώπινου γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε κύτταρα ηπατικής προέλευσης. Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί πως δεν παρατηρείτε το φαινόμενο με την κύρια πρωτεΐνη μεταγραφικής ρύθμισης του ιού, core.

Ο Ray και συνεργάτες διαπίστωσαν από παρόμοιες συνεπιμολύνσεις ηπατικών κυττάρων ότι η πρωτεΐνη core+1 δεν έχει κοινή λειτουργία με την πρωτεΐνη core αφού η έκφρασή της σε κύτταρα HepG2 οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου p21.

Η επίδραση της ιϊκής πρωτεΐνης core+1 στο ενδογενές επίπεδο της 1α-αντιπρυψίνης μελετήθηκε σε ηπατικές σειρές και βιοψίες ήπατος ασθενών μολυσμένων με ιό. Βρέθηκε ότι η ιϊκή πρωτεΐνη core+1 μειώνει τα ενδογενή επίπεδα α1-αντιπρυψίνης των ηπατικών κυττάρων καθώς και την έκφραση του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε βιοψίες ασθενών με ίνωση, κίρρωση, ή ηπατοκυτταρικό καρκίνο από χρόνια λοίμωξη με ιό ηπατίτιδας Γ, σε σχέση με τα φυσιολογικά. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν προηγούμενες μελέτες που κατέγραψαν μειωμένα επίπεδα α1-αντιπρυψίνης σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Γ, σε σχέση με υγιή άτομα³⁰¹. Επιπλέον, το παραπάνω αποτέλεσμα είναι καίριο αναφορικά με πιθανά γονίδια που εμπλέκονται στο ηπατοκυτταρικό καρκίνο από μόλυνση με ιό ηπατίτιδας Γ.

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν πλασμίδια με μεταλλαγμένα στελέχη του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης και προσδιορίστηκε η περιοχή του υποκινητή που προσδένει την ιϊκή πρωτεΐνη core+1 και ενέχεται στη μείωση της ενεργότητάς του. Στην ίδια περιοχή του υποκινητή προσδένεται και η εξαμελής οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων C/EBP, που ρυθμίζει ανάπτυξη, διαφοροποίηση, μεταβολισμό, ανοσία και άλλες κυτταρικές διεργασίες^{215,218-223}. Είναι συνεπώς πιθανό η ιϊκή πρωτεΐνη core+1/S να ρυθμίζει κάποια κυτταρική διεργασία μέσω ανταγωνισμού με το σύστημα C/EBP. Η λειτουργικότητα της θέσης αναγνώρισης του C/EBP στον υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης επιβεβαιώθηκε in vitro με ηλεκτροφορητική κινητική μετατόπιση και in vivo με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης, αφού βρέθηκε να προσδένει το ετεροδιμερές σύμπλοκο C/EBPα και C/EBPβ. Επιπλέον έκφραση της ιϊκής πρωτεΐνης core+1/S σε ηπατικά κύτταρα μείωσε δραματικά την πρόσδεση του παράγοντα C/EBPβ, γεγονός που επιβεβαιώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1a και του μεταγραφικού παράγοντα C/EBPβ in vivo & in vitro. Βρέθηκε επίσης ότι η πρωτεΐνη core+1/S μειώνει τα επίπεδα της C/EBPβ χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα της C/EBPα.

Τέλος, μελετήθηκαν πιθανές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης core+1/S με ιστόνες αποακετυλίωσης, σαν ένας πιθανός μηχανισμός μείωσης της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης και του παράγοντα C/EBPβ σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Πραγματοποιήθηκε συνεπιμόλυνση ηπατικών κυττάρων κατάλληλα επεξεργασμένων με τριχοστατίνη Α, που είναι γνωστός παράγων χαλάρωσης της χρωματίνης. Δεν παρατηρήθηκε κάποιος συσχετισμός της core+1/S με ιστόνες αποακετυλίωσης, αλλά η μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σχεδόν τετραπλασιάστηκε γεγονός που συνηγορεί στο γεγονός ότι η ακετυλίωση των ιστονών επηρεάζει τη δράση του υποκινητή της αντιπρυψίνης. Μελετήθηκε ακολούθως η ακετυλίωση των ιστονών με τη βοήθεια της πρωτεΐνης p300, που αντιδρά με τη CBP (γνωστή και ως CREB πρωτεΐνη πρόσδεσης) και δημιουργεί σύμπλοκο ζωτικής σημασίας για την μεταγραφική ενεργότητα των υποκινητών, καθώς η δράση άμινο-ακετυλοτρανσφεράσης που το συνοδεύει, βοηθά στην επιστράτευση του βασικού μεταγραφικού μηχανισμού στον υποκινητή, συμπεριλαμβανομένης και της RNA πολυμεράσης II. Δεν ανιχνεύτηκε επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης σε περίσσεια έκφρασης της p300.

Συνοπτικά παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της α1-αντιπρυψίνης από τη πρωτεΐνη core+1 μέσω ανταγωνισμού της με τον παράγοντα C/EBPβ. Η ρύθμιση του ηπατικού μεταγραφικού παράγοντα C/EBPβ από τη πρωτεΐνη core+1 αποτελεί κύριο βιολογικό εύρημα της παρούσας μελέτης. Προφανώς η μελέτη

μας δεν περιορίζει ή δεν μπορεί να αποκλείσει πιθανή συμμετοχή της πρωτεΐνης core+1 στη ρύθμιση και άλλων μεταγραφικών παραγόντων ενεργοποίησης της οξείας φάσης απόκρισης του οργανισμού στο στρες, ιδιαίτερα ηπατικής προέλευσης. Το επόμενο βήμα της μελέτης είναι να προσδιοριστεί ο μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης του γονιδίου C/EBPβ από την ιϊκή πρωτεΐνη, εγχείρημα δύσκολο, δεδομένου ότι το γονίδιο C/EBPβ ρυθμίζεται μετα-μεταγραφικά και μετα-μεταφραστικά και ειδικότερα η μετα-μεταφραστική του ρύθμιση γίνεται με διάφορους μηχανισμούς, όπως φωσφορυλίωση, αυτό-φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση και ακετυλίωση.

B. Κατασκευή νέων ηπατικών υποκινητών και έλεγχο της δράσης της πρωτεΐνης core/core+1 στη μεταγραφική τους ενεργότητα.

Στα πλαίσια συμμετοχής σε μεγάλο ευρωπαϊκό πρόγραμμα (THOVLEN) κατασκευάστηκαν τέσσερις ηπατικοί υποκινητές και μαζί με άλλους υποκινητές ήδη κλωνοποιημένους και συζευγμένους με το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης, συνδιαμόλυναν πλήθος κυτταρικών σειρών προκειμένου να συγκριθεί η μεταγραφική τους ικανότητα. Ο πιο ισχυρός με μεγάλη ιστο-ειδικότητα σε ηπατοκύτταρα ήταν ο υποκινητής του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης 6. Ο υποκινητής αυτός και ορισμένοι άλλοι ηπατικοί υποκινητές θα χρησιμεύσουν στην παραγωγή ογκολυτικών HSV-1 ιϊκών οχημάτων για τη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τους νέους ηπατικούς υποκινητές και πλασμίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες W/T core και core+1/S του ιού της ηπατίτιδας Γ, πραγματοποιήθηκαν παρόμοιες συνδιαμολύνσεις ηπατικών κυττάρων, όπως στην περίπτωση του υποκινητή της α1-αντιπρυψίνης. Αναφορικά, βρέθηκε ότι παρουσία της πρωτεΐνης core+1 οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή της αλβουμίνης p500Alb. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και άλλες συνδιαμολύνσεις κυττάρων με ηπατικούς υποκινητές, όπως αλκοολικής αφυδρογονάσης 6, απολιποπρωτεΐνης Β και επιδίνης. Τα αποτελέσματα που αντλήθηκαν από αυτές τις συνδιαμολύνσεις δε θα συζητηθούν εδώ, αφού η έρευνα είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο. Η μελέτη όταν ολοκληρωθεί η θα προσδώσει πρόσθετη πληροφορία στη ρύθμιση ηπατικών γονιδίων από την πρωτεΐνη core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ.

Γ. Κατασκευή διαγονιδιακών ποντικών core/core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ

Ο στόχος της μελέτης ήταν η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν ξεχωριστά τις πρωτεΐνες core και core+1 στο ήπαρ, ώστε να συγκριθεί η ογκογόνος δράση και η ρυθμιστική λειτουργία τους στα ηπατικά κύτταρα *in vitro*. Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος

πλασμιδιακός φορέας για την σωστή ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε ηπατικό υποκινητή του γονιδίου της αλβουμίνης του ποντικού. Υστερα από πολλαπλές πειραματικές διαδικασίες και τη χρήση της μεθόδου της σημειακής σήμανσης αποδείχτηκε ότι τα ιδρυτικά υβρίδια για την ενσωμάτωση του διαγονιδίου της πρωτεΐνης W/T core, ή core+1/S που αναγνωρίστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ήταν ψευδώς θετικά.

Παράλληλα, εκείνη τη χρονική στιγμή κατασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης των πρωτεϊνών W/T core και core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b, που είναι πιο συνήθης από τον γονότυπο 1a για εξέλιξη σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο και κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα διαγονιδιακά πλασμίδια. Εμβολιασμός με το διαγονίδιο W/Tcore 1b απέδωσε ένα ιδρυτικό υβρίδιο με ενσωματωμένο το διαγονίδιο W/T core 1b, που ανιχνεύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Δυστυχώς, διαπιστώθηκε ότι ιδρυτικό αυτό υβρίδιο ήταν στείρο. Προς μεγάλη ατυχία ημέρες πριν την προγραμματισμένη εξωσωματική γονιμοποίηση ο ποντικός απεβίωσε σε ηλικία 11 εβδομάδων. Αν και το θετικό διαγονιδιακό για την ενσωμάτωση της πρωτεΐνης W/T core και core+1 του ιού της ηπατίτιδας Γ με γονότυπο 1b ήταν μόνο ένα και στείρο, θα ήταν πιθανώς ενδιαφέρον να διερευνηθεί οιοσδήποτε συσχετισμός της πρωτεΐνης W/T core με στειρότητα, αφού έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 απορρυθμίζει τον υποδοχέα ανδρογόνων³¹⁷. Στη συνέχεια διενεργήθηκαν και άλλοι εμβολιασμοί ποντικών με τη διαγονιδιακή «κασσέτα» W/Tcore 1b, αλλά δεν ανιχνεύτηκε κανένα υβρίδιο θετικό για την ενσωμάτωση του διαγονιδίου. Η δυσκολία ενσωμάτωσης των διαγονιακών κασσετών στους ποντικούς μπορεί να οφείλεται στην πειραματική διεργασία κατά τον μικρο-εμβολιασμό των ωαρίων, αλλά μπορεί όμως και να οφείλεται σε υψηλή για το κύτταρο τοξικότητα της διαγονιδιακής κασσέτας, οδηγώντας σε εμβρυικό θάνατο.

Δεν επαναλήφθηκαν περαιτέρω εμβολιασμοί. Εναλλακτικά, αν και δεν θα υποκαταστάσει πλήρως το διαγονιδιακό, το σύστημα των λεντοϊών τροποποιημένων με τον υποκινητή της αλβουμίνης για στοχευμένη έκφραση της πρωτεΐνης core/core+1 στο ήπαρ, θα ήταν λιγότερο χρονοβόρο, δαπανηρό και πιθανό υποψήφιο για μελλοντικές προσπάθειες.

Δ. Σύγκριση υποκινητών CMV & EF-1α για παρασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών που φέρουν κωδικές αλληλουχίες για έκφραση πρωτεϊνών του ιού της ηπατίτιδας Γ

Σκοπός της σειράς αυτής πειραμάτων ήταν η σύγκριση της έκφρασης ενός ποσοτικοποιήσιμου εσωτερικού γονιδίου κάτω από τον έλεγχο των υποκινητών CMV ή EF-1α. Πιθανή ένδειξη διαφοράς μεταξύ των δυο υποκινητών είναι πολύ σημαντική μιας και θα οδηγήσει στην επικράτηση του ενός και σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα περαιτέρω πειραμάτων, που θα

εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη δύναμη και τη σταθερή έκφραση ενός γονιδίου σε διαφορετικά *in vitro* συστήματα. Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του εσωτερικού γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης ήταν μεγαλύτερη όταν εκφραζόταν κάτω από τον έλεγχο του ευκαρυωτικού υποκινητή του γονιδίου EF-1α, σε σύγκριση με τον υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού CMV. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρήθηκε όταν κύτταρα BHK-21 και ηπατικά HepG2 και Huh-7 διαμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια που φέρουν το εσωτερικό γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του ευκαρυωτικού υποκινητή του γονιδίου EF-1α και του υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού CMV.

Παράλληλα χρησιμοποιώντας τα παραπάνω πλασμίδια κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί. Οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί είναι ένα άλλο *in vitro* σύστημα που θα μας κατευθύνει στην διερεύνηση πιθανής διαφοράς ισχύος μεταξύ των υποκινητών. Η σημαντικότητα ή η καινοτομία αυτής της μελέτης στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρήση βακουλοϊών ως σύστημα γονιδιακής παράδοσης είναι ακόμη πολύ νέο και οποιαδήποτε διαφορά στην ενεργότητα μεταξύ των δύο υποκινητών θα αποτελέσει έναρξη για την αποκλειστική παραγωγή και χρήση του πιο μεταγραφικά ενεργού υποκινητή από τους δύο σε πλασμίδια κατάλληλα για την αναπαραγωγή βακουλοϊών. Στα πλασμίδια, ή οι στους βακουλοϊούς με τον ισχυρότερο υποκινητή, θα κλωνοποιηθεί η πρωτεΐνη core+1, αλλά και άλλες πρωτεΐνες του ιού της ηπατίτιδας Γ, για αποτελεσματικότερη συστηματικότερη μελέτη των λειτουργιών τους σε ένα *in vitro* σύστημα συνεχόμενης και σταθερής έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών.

Συμπερασματικά οι βιολογικές επεκτάσεις της παρούσας μελέτης συγκλίνουν στο γεγονός ότι οι εναλλακτικές μορφές της πρωτεΐνης core+1, συμμετέχουν ενεργά στους μηχανισμούς παθογένειας του ιού της ηπατίτιδας Γ, μέσω αλληλεπιδράσεων τους με μεταγραφικούς παράγοντες του ξενιστή και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε προληπτικές και επιδημιολογικές παρεμβάσεις, αλλά και στην καλύτερη κατανόηση της μηχανιστικής δράσης του ιού της ηπατίτιδας Γ στην είσοδό του στον οργανισμό και στην ηπατική βλάβη που επιφέρει. Είναι βέβαιο ότι η πρωτεΐνη core+1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην απορρύθμιση κύριων ηπατικών πρωτεϊνών (π.χ. αλβουμίνη, α1-αντιπρυψίνη), συμμετέχοντας στην εξέλιξη της ηπατικής νόσου με τελικό στάδιο τη δημιουργία ηπατοκυτταρικού καρκίνου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chambers, T.J., Rice, C.M. (1987) Molecular biology of the flaviviruses. *Microbiol Sci.*, 4 , 219-23.
2. Knipe, M.K, Roizman B., Howley P.M., Straus E.S., Griffin D.E., (2006) *Fields Virology* Lippincott Williams & Wilkins
3. Chambers, T.J., Hahn C.S., Galler R., Rice C.M. (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.*, **44**, 649-88.
4. Khromykh A.A., Meka H., Guyatt K.J., Westaway E.G. (2001) Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *Journal of Virology*, **75**, 6719-28
5. Villordo S.M., Gamarnik A.V. (2008) Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. *Virus Res.*, **139**, 230-239
6. Sampath A., Padmanabhan R.(2009) Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.*,**81**, 6-15
7. Beeson, P.B. (1943) Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma: Report of seven cases. *Journal of the American Medical Association*, **121**, 1332-4.
8. MacCallum, F.O (1947) Homologous serum jaundice. *Lancet*, **ii**, 691-2.
9. Feinstone, S.M., Kapilian, Z.M., Purcell, R.H. (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science*, **182**, 1026-8
10. Blumberg, B.S., Alter, H.J., Visnich, S. (1965) A new antigen in leukemia sera. *Journal of the American Medical Association*, **191**, 541-6.
11. Alter, H.J., Holland, P.V., Purcell, R.H. (1972) Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis B antigen positive donors. *Annals of Internal Medicine*, **77**, 691-9.
12. Feinstone, S.M., Kapilian, Z.M., Purcell, R.H., Alter, H.J., Holland P.V. (1975) Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England Journal of Medicine*, **292**, 767-770.
13. Knodell, R.G., Conrad, M.E., Dienstag, J.L. (1975) Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology*, **69**, 1278-85.
14. Maugh, T.H. (1980) Where is the hepatitis C virus? *Science*, **210**, 999-1000.
15. Prince, A.M., Brotman, B., Gradi, G.F. (1974) Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. *Lancet*, **ii**, 241-6.
16. Alter, H.J., Holland, P.V., Morrow, A.G., Purcell, R.H., Feinstone, S.M., Moritsugu, Y. (1975) Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*, **ii**, 838-41.
17. Alter, M.J., Gerety, R.J., Smallwood, L.A. (1982) Sporadic non-A, non-B hepatitis: frequency and epidemiology in an urban US population. *Journal of Infectious Diseases*, **145**, 886-93.

18. Shimizu, Y.K., Feinstone, S.M., Purcell, R.H., Alter, H.J., London, W.T. (1979) Non-A, Non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two evidence in two agents in experimentally infected chimpanzees . *Science*, **205**, 197-200
19. Bradley, D.W., Maynard, J.E., Popper, H., Cook, E.H., Ebert,J.W., MacClaustad, K.A., Scable, C.A., Fields, H.A. (1983) Post-transfusion Non-A, Non-B hepatitis : physiochemical properties of two distinct agents. *Journal of infectious diseases*. **148**, 254-65
20. Feinstone, S.M., Mihalik, K.B., Kamimura, T., Alter H.J., London, T.W., Purcell, R.H.(1983) Inactivation of hepatitis B virus and non-A, non-B hepatitis by chloroform. *Infectious Immunology*, **41**, 816-21
21. Prince, A.M., Huima-Byron, T., Williams, B.A.A., Bardina, L., Brotman, B. (1984) Isolation of a virus from chimpanzee liver cell cultures inoculated with sera containing the agent of non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, **ii**, 1071-5.
22. Seto, B., Goleman, W.G., Iwarson, S., Gerety, R.J. (1984) Detection of reverse transcriptase activity in association with the non-A,non-B hepatitis agent(s). *Lancet*, **ii**, 941-3.
23. Iwarson, S., Scaff, Z., Seto, B., Nokrans G., Gerety, R.J. (1985) Retrovirus-like particles in hepatocytes of patients with transfusion-acquired non-A, non-B hepatitis. *Journal of Medical Virology*, **16**, 37-45
24. Bradley, MacClaustad, K.A., Cook, E.H., D.W., Scable, C.A., Ebert,J.W., Maynard, J.W., Maynard, J.E. (1985) Posttransfusion non-A, non-B hepatitis in chimpanzees.Physiochemical evidence that the tubule-forming agent is a small enveloped virus. *Gastroenterology*, **88**, 773-9.
25. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. & Houghton, M. (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359–62
26. Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. & Choo, Q. L. (1991) Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, **14**, 381–8.
27. Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J. et al. (1991) Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the Xavirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology*, **180**, 842–8.
28. Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H. J. et al. (1989) An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, **244**, 362–4.
29. Choo, Q. L., Berger, K., Kuo, G. & Houghton, M. (1990) Detection and mapping of immunologic epitopes expressed by bacterial cDNA clones of the hepatitis C virus. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*, eds. F. B. Hollinger, S. M. Lemon & H. S. Margolis, pp. 345–6, Philadelphia: PA: Williams & Wilkins.
- 30.Alter, H. J., Purcell, R. H., Shih, J. W. et al. (1989) Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine*, **321**, 1495–1500.
31. Alter, M. J., Coleman, P. J., Alexander, W. J. et al. (1989) Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis. *Journal of the American Medical Association*, **262**, 1201–5.
32. Van der Poel, C. L., Reesink, H. W., Lelie, P. N. et al. (1989) Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B posttransfusion hepatitis in The Netherlands. *Lancet*, **ii**, 297–8.

33. Houghton, M. C. (1996) Hepatitis C viruses. In *Fields Virology* 3rd edn, eds. B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley, pp. 1035–58, Philadelphia, PA: Lippincott-Raven.
34. Purcell, R. H. (1994) Hepatitis viruses: changing patterns of human disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 2401–6.
35. Contreras, M., Barbara, J. A. J., Anderson, C. C. et al. (1991) Low incidence of non-A, non-B post-transfusion hepatitis in London conWrmed by hepatitis C virus serology. *Lancet*, **337**, 753–7.
36. Kuhl, P., Seidl, S., Stangel, W., Beyer, J., Sibrowski, W. & Flik, J. (1989) Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet*, **ii**, 324.
37. Janot, C., Courouge, A. M. & Maniez, M. (1989) Antibodies to hepatitis C virus in French blood donors. *Lancet*, **ii**, 796–7.
38. Esteban, J. I., Esteban, R., Viladomiu, L. et al. (1989) Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet*, **ii**, 294–7.
39. Esteban, J. K., Gonzalez, A., Hernandez, J. M. et al. (1990) Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *New England Journal of Medicine*, **323**, 1107–12.
40. Par, A. (1990) Antibodies to hepatitis C virus in Hungary. *Lancet*, **336**, 123.
41. Katayama, T., Kikuchi, S., Tanaka, Y. et al. (1990) Blood screening for non-A, non-B hepatitis by hepatitis C virus antibody assay. *Transfusion*, **30**, 374–6.
42. Dawson, G. J., Lesniowski, R. R., Steward, I. L. et al. (1991) Detection of antibodies to hepatitis C 189 References virus in US blood donors. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 551–6.
43. Poynard, T., Yuen, M.F., Ratziu, V. and Lai, C.L. (2003) Viral hepatitis C. *Lancet*, **362**, 2095-2100
44. Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T. et al. (2000) The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, **355**, 887–91.
45. Alter, M.J. (2002) Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*. **36**, 93-8.
46. Lauer, G.M., Walker, B.D. (2001) Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* , **345**, 41-52.
47. Fiore, R. J., Potenza, D., Monno, L. et al. (1995) Detection of HCV RNA in serum and seminal Xuid from HIV-1 coinfectd intravenous drug addicts. *Journal of Medical Virology*, **46**, 364–7.
48. Chen, M., Yun, Z. B., Sallberg, M. et al. (1995) Detection of hepatitis C virus RNA in the cell fraction of saliva before and after oral surgery. *Journal of Medical Virology*, **45**, 223–6.
49. Liou, T. C., Chang, T.T., Young, K. C., Lin, X. Z., Lin, C. Y. & Wu, H. L. (1992) Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal Xuid, and ascites. *Journal of Medical Virology*, **37**, 197–202.
50. Mendel, I., Muraine, M., Riachi, G. et al. (1997) Detection and genotyping of the hepatitis C RNA in tear fluid from patients with chronic hepatitis C. *Journal of Medical Virology*, **51**, 231–3.
51. Kudesia, G., Ball, G. & Irving, W. L. (1995) Vertical transmission of hepatitis C. *Lancet*, **345**, 1122.

52. Matsubara, T., Sumazaki, R. & Takita, H. (1995) Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a prospective study. *European Journal of Pediatrics*, **154**, 973–8.
53. Sabatino, G., Ramenghi, L. A., diMarzio, M. & Pizzigallo, E. (1996) Vertical transmission of hepatitis C virus: an epidemiological study on 2980 pregnant women in Italy. *European Journal of Epidemiology*, **12**, 443–7.
54. Resti, M., Azzari, C., Lega, L. et al. (1995) Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Acta Paediatrica*, **84**, 251–5.
55. Eyster, M.E., Alter, H.J., Aledort, L.M., Quan, S., Hatzakis, A. and Goedert, J.J. (1991) Heterosexual cotransmission of hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV) *Ann Intern Med.* **115**, 764-8.
56. Gowans, E.J. (2000) Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis.*, **20**, 85-102
57. Forton, D.M., Wright, M., Knapp, S., Thursz, M.R., Taylor-Robinson, S.D. and Thomas, H.C. (2002) New insights into hepatitis C. *Clin Med.* , **2**, 554-9
58. Alter, M. J. (1990) Epidemiology of community-acquired hepatitis C. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*, eds. F. B. Hollinger, S. M. Lemon & H. Margolis, pp. 410–13, Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
59. Farci, P., Alter, H. J., Wang, D. et al. (1991) A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *New England Journal of Medicine*, **325**, 98–104.
60. Houghton, M., Weiner, A., Han, J., Kuo, G. & Choo, Q. L. (1991) Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology*, **14**, 381–8.
61. Gretch, D. R., de la Rosa, C., Carithers, R. L., Wilson, R. A., Williams, B. & Corey, L. (1995) Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Annals of Internal Medicine*, **123**, 321–9.
62. Hoofnagle, J. H. (1997) Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology*, **26**(Suppl. 1), 15–20.
63. Mattsson, L., Sonnerborg, A. & Weiland, O. (1993) Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13 year followup study of hepatitis C virus markers. *Liver*, **13**, 274–8.
64. Alberti, A., Morsica, G., Chemello, L. et al. (1992) Hepatitis C viremia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *Lancet*, **340**, 697–8.
65. Sharara, A. I. (1997) Chronic hepatitis C. *Southern Medical Journal*, **90**, 872–7.
66. Barrera, J. M., Bruguera, M., Guadalupe-Ercilla, M. et al. (1995) Persistent hepatitis C viremia after acute self-limiting posttransfusion hepatitis C. *Hepatology*, **21**, 639–44.
67. Conry-Cantilena, C., Van Raden, M., Gible, J. et al. (1996) Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine*, **334**, 1691–6.
68. Kiyosawa, K., Sodeyama, T., Tanaka, E. et al. (1990) Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C. *Hepatology*, **12**, 671–5.
69. Tong, M. J., El-Farra, N. S., Reikes, A. R. & Co, R. L. (1995) Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *New England Journal of Medicine*, **332**, 1463–6.

70. Di Bisceglie, A. M., Goodman, Z. D., Ishak, K. G., Hoofnagle, J. H., Melpolder, J. J. & Alter, H. J. (1991) Long term clinical and histopathological follow up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology*, **14**, 969–74.
71. Fattovich, G., Giustina, G., Degos, F. et al. (1997) Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*, **112**, 463–72.
72. Poynard, T., Bedosa, P. & Opolon, P. (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*, **349**, 825–32.
73. KoV, R. S. & Dienstag, J. L. (1995) Extrahepatic manifestations of hepatitis C and the association with alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease*, **15**, 101–9.
74. Walker, C. M. (1997) Comparative features of hepatitis C virus infection in humans and chimpanzees. *Springer Seminars in Immunopathology*, **19**, 85–98.
75. Cai, Z. & Sprent, J. (1996) Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8 T cells *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, **183**, 2247–57.
76. Koretz, R. L., Abbey, H., Coleman, E. & Gitnick, G. (1993) Non-A, non-B post-transfusion hepatitis: looking back in the second decade. *Annals of Internal Medicine*, **119**, 110–15.
77. Esteban, J. K., Gonzalez, A., Hernandez, J. M. et al. (1990) Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a study of transfusion-associated hepatitis. *New England Journal of Medicine*, **323**, 1107–12.
78. Koretz, R. L., Brezina, M., Polito, A. J. et al. (1993b) Non-A, non-B posttransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology*, **17**, 361–5.
79. Alter, H. J. & Bradley, D. W. (1995) Non-A, non-B hepatitis unrelated to the hepatitis C virus. *Seminars in Liver Disease*, **15**, 110–20.
80. Okuda, K. (2000) Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.*, **32**, 225-37.
81. Szabo, E., Paska, C., Kaposi Novak, P., Schaff, Z. and Kiss, A. (2004) Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res.*, **10**, 5-11.
82. Moradpour, D. and Blum, H.E. (2005) Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **17**, 477-83.
83. Zuckerman, E., Zuckerman, T., Levine, A.M., Douer, D., Gutekunst, K., Mizokami, M., Qian, D.G., Velankar, M., Nathwani, B.N. and Fong, T.L. (1997) Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med.*, **127**, 423-8.
84. Zoulim, F., Chevallier, M., Maynard, M. and Trepo, C. (2003) Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev Med Virol.* **13** 57-68.
85. Fargion, S., Piperno, A., Cappellini, M.D., Sampietro, M., Fracanzani, A.L., Romano, R., Caldarelli, R., Marcelli, R., Vecchi, L. and Fiorelli, G. (1992) Hepatitis C virus and porphyria cutanea tarda: evidence of a strong association. *Hepatology*, **16**, 1322-6
86. Tanei, R., Watanabe, K. and Nishiyama, S. (1995) Clinical and histopathologic analysis of the relationship between lichen planus and chronic hepatitis C. *J Dermatol.*, **22**, 316-23.

87. Hoofnagle, J.H., Mullen, K.D., Jones, D.B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J.G., Park, Y. and Jones, E.A. (1986) Treatment of chronic non-A, non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med.*, **315**, 1575-8.
88. Lau, D.T., Kleiner, D.E., Ghany, M.G., Park, Y., Schmid, P. and Hoofnagle, J.H. (1998) 10-Year follow-up after interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*, **28**, 1121-7.
89. Glue, P., Fang, J.W., Rouzier-Panis, R., Raffanel, C., Sabo, R., Gupta, S.K., Salfi, M. and Jacobs, S. (2000) Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin Pharmacol Ther.*, **68**, 556-67.
90. Heathcote, E.J., Shiffman, M.L., Cooksley, W.G., Dusheiko, G.M., Lee, S.S., Balart, L., Reindollar, R., Reddy, R.K., Wright, T.L., Lin, A., Hoffman, J. and De Pamphilis, J. (2000) Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med.*, **343**, 1673-80.
91. Kahle, W., Platzer, W. (1985) Color Atlas and textbook of the Human Anatomy, George Thieme Verlag.
92. Rubin, E., Farber, J.L., (1998) Pathology. USA, Philadelphia, PA, Lippincott Co.
93. Di Marino, A.J. (2008) Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Saunders, 8th edition
94. Tortora, G.J., Derrickson, B.H. (2008) Principles of Anatomy and Physiology. John Wiley & Sons, 12th ed.
95. Kremsdorf, D., Brezillon, N. (2007) New animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol.*, **13**, 2427-35.
96. Yoo, B. J., Selby, M., Choe, J. et al. (1995) Transfection of a differentiated human hepatoma cell line Huh7 with *in vitro* transcribed hepatitis C virus HCV RNA and establishment of a long term culture persistently infected with HCV. *Journal of Virology*, **69**, 32-8.
97. Seipp, S., Mueller, H. M., PfaV, E., Stremmel, W., Theilmann, L. & Goeser, T. (1997) Establishment of persistent hepatitis C virus infection and replication *in vitro*. *Journal of General Virology*, **78**, 2467-76.
98. Dash, S., Halim, A. B., Tsuji, H., Hiramatsu, N. & Gerber, M. A. (1997) Transfection of HepG2 cells with infectious hepatitis C virus genome. *American Journal of Pathology*, **151**, 363-73.
99. Hiramatsu, N., Dash, S. & Gerber, M. A. (1997) HCV cDNA transfection to HepG2 cells. *Journal of Viral Hepatitis*, **4**(Suppl. 1), 61-7.
100. Moradpour, D., Kary, P., Rice, C. M. & Blum, H. E. (1998) Continuous human cell lines inducibly expressing hepatitis C virus structural and nonstructural proteins. *Hepatology*, **28**, 192-201.
101. Mizuno, M., Yamada, G., Tanaka, T., Shimotohno, K., Takatani, M. & Tsuji, T. (1995) Virion-like structures in HeLa G cells transfected with the full-length sequence of the hepatitis C virus genome. *Gastroenterology*, **109**, 1933-40.
102. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J.-O., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNA in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110-13.

103. Blight, K. J., Kolykhalov, A. A. & Rice, C. M. (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, **290**, 1972–4.
104. Sun, B., Pan, J., Gerber, M. & Feitelson, M. A. (1999) Evidence for consistent HCV replication in HepG2 cells. *Antiviral Therapy*, **4**(Suppl. 4), A94.
105. Ito, J., Mukaigawa, J., Zuo, J., Hirabayashi, Y., Mitamura, K. & Yasui, K. (1996) Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *Journal of General Virology*, **77**, 1043–54.
106. Ahmed, M. M., Shaw, J. C., Elias, E. & Mutimer, D. J. (1995) Isolation and culture of biliary epithelial cells (BEC) from explanted hepatitis C virus (HCV) infected liver. *Journal of Hepatology*, **23**, 97A.
107. Lorient, M. A., Bronowicki, J. P., Lagorce, D. et al. (1999) Permissiveness of human biliary epithelial cells to infection by hepatitis C virus. *Hepatology*, **29**, 1587–95.
108. Grossman, M. & Wilson, J. M. (1993) Retroviruses: delivery vehicle to the liver. *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**, 110–14.
109. Lieber, A., Vrancken Peeters, M. J., Meuse, L., Fausto, N., Perkins, J. & Kay, M. A. (1995) Adenovirus mediated urokinase gene transfer induces liver regeneration and allows for efficient retrovirus transduction of hepatocytes *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 6210–14.
110. Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1995) Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **203**, 65–83.
111. Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J.N. et al. (1995) Genomic organization of GB viruses A and B: two new members of the Flaviviridae associated with GB agent hepatitis. *Journal of Virology*, **69**, 5621–30.
112. Simons, J.N., Pilotmatias, T. J., Leary, T. P. et al. (1995) Identification of two Xavirvirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **92**, 3401–5.
113. Alter, H. J., Purcell, R., Holland, P. & Popper, H. (1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, **i**, 459–63.
114. Hollinger, F. B., Gitnick, G., Aach, R.D. et al. (1978) Non-A, non-B hepatitis transmission in chimpanzees: a project of the transfusion-transmitted viruses study group. *Intervirology*, **10**, 60–8.
115. Tabor, E., Gerety, R. J., Drucker, J. A. et al. (1978) Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. *Lancet*, **i**, 463–6.
116. Bradley, D. W., Maynard, J. E., Cook, E.H. et al. (1980) Non-A/non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees: cross-challenge and electron microscopic studies. *Journal of Medical Virology*, **6**, 185–201.
117. Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y. et al. (1997) Hepatitis C virus core protein induces hepatic steatosis in transgenic mice. *Journal of General Virology*, **78**, 1527–31.
118. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y. et al. (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine*, **4**, 1065–7.
119. Toyonaga, T., Hino, O., Sugai, S. et al. (1994) Chronic active hepatitis in transgenic mice

expressing interferon-gamma in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 614–8.

120. Wentworth, P.A., Sette, A., Celis, E. et al. (1996) Identification of A2-restricted hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitopes from conserved regions of the viral genome. *International Immunology*, **8**, 651–9.

121. Kawamura, T., Furusaka, A., Koziel, M. et al. (1997) Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology*, **25**, 1014–21.

122. Honda, A., Arai, Y., Hirota, N. et al. (1999) Hepatitis C virus structural proteins induce liver cell injury in transgenic mice. *Journal of Medical Virology*, **59**, 281–9.

123. Schinazi, R. F., Ilan, E., Black, P. L., Yao, X. & Dagan, S. (1999) Cell-based and animal models for hepatitis B and C viruses. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, **10**, 99–114.

124. Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Tokushige, K., Mizokami, M., Wakita, T., (2003) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, **125**, 1808-17.

125. Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Wakita, T., Chisari, F.V. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 9294-9.

126. Lindenbach, B.D., Meuleman, P., Ploss, A., Vanwolleghem, T., Syder, A.J., McKeating, J.A., Lanford, R.E., Feinstone, S.M., Major, M.E., Leroux-Roels, G., Rice, C.M. (2006) Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 3805-9.

127. Yi, M., Villanueva, R.A., Thomas, D.L., Wakita, T., Lemon, S.M. (2006) Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 2310-5.

128. Rice, C. M., (2003) HCV life cycle and targets for drug development. *Hepatitis Annual Update* **2003**, 123-142.

129. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R. and Kohara, M. (1998) The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol.*, **72**, 6048-55.

130. Ray, R.B. and Ray, R. (2001) Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett.* **202**, 149-56.

131. McLauchlan, J. (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes *J Viral Hepat.* **7**, 2-14.

132. Lo, S.Y., Masiarz, F., Hwang, S.B., Lai, M.M. and Ou, J.H. (1995) Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology*, **213**, 455-61.

133. Ray R. B., Steele R., Meyer K. and Ray R. (1997) Transcriptional repression of p53 promoter by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.*, **272**, 10983-6.

134. Lu W., Lo S. Y., Chen M., Wu K., Fung Y. K. and Ou J. H. (1999) Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology*, **264**, 134-41

135. Ruggieri A., Harada T., Matsuura Y. and Miyamura T. (1997) Sensitization to Fas-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *Virology*, **229**, 68-76.
136. Ray, R. B., Meyer, K., and Ray, R. (1996) Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology*, **226**, 176-182.
137. Zhang W. and Liu H. T. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.*, **12**, 9-18.
138. Chang L. and Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, **410**, 37-40.
139. Panteva M., Korkaya H. and Jameel S. (2003) Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? *Virus Res.*, **92**, 131-40.
140. Kato, N., Yoshida, H., Kioko Ono-Nita, S., Kato, J., Goto, T., Otsuka, M., Lan, K., Matsushima, K., Shiratori, Y. and Omata, M. (2000) Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology*, **32**, 405-12.
141. Caamano, J. and Hunter, C.A. (2002) NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev.*, **15**, 414-29.
142. Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-6.
143. Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C. et al. (1997) Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *Journal of Virology*, **71**, 697-704.
144. Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A. et al. (1997) Characterization of truncated forms of the hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of General Virology*, **78**, 2299-306.
145. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938-941
146. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, **21**, 5017-5025
147. Lozach PY, Lortat-Jacob H, de Lacroix de Lavalette A, Staropoli I, Fong S, Amara A, Houles C, Fieschi F, Schwartz O, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Altmeyer R (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, **278**, 20358-20366
148. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 2003, **77**, 4070-4080
149. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC (2003) L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 4498-4503
150. Hsu M, Zhang J, Flint M, Logvinoff C, Cheng-Mayer C, Rice CM, McKeating JA (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 7271-7276

151. Lin, C., Lindenbach, B.D., Pragai, B., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994a) Processing of the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology*, **68**, 5063–73.
152. Mizushima, H., Hijikata, H., Asabe, S. I., Hirota, M., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1994) Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini. *Journal of Virology*, **68**, 6215–22.
153. Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J. (2002) Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus. *J Virol*, **76**, 3720-3730
154. Premkumar, A., Wilson, L., Ewart, G.D., Gage, P.W. (2004) Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett*, **557**, 99-103
155. Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T. et al. (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, **67**, 4665–75.
156. Grakoui, A., McCourt, D. W., Wychowski, C., Feinstone, S.M. & Rice, C. M. (1993) A second hepatitis C virus encoded proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 10583–7.
157. Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, HY. et al. (1993) Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90**, 10773–7.
158. Hussy, P., Langen H., Mous, J. & Jacobsen, H. (1996) Hepatitis C virus core protein: carboxyterminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology*, **224**, 93–104.
159. Lin, C., Lindenbach, B.D., Pragai, B., McCourt, D. W. & Rice, C. M. (1994) Processing of the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *Journal of Virology*, **68**, 5063–73.
160. Yamaga, A.K., Ou, J.H. (2002) Membrane topology of the hepatitis C virus NS2 protein. *J Biol Chem*, **277**, 33228-33234.
161. Reed, K. E., Grakoui, A. R. & Rice, C. M. (1995) Hepatitis C virus encoded NS2-3: cleavage site mutagenesis and requirements for biomolecular cleavage. *Journal of Virology*, **69**, 4127–36.
162. Lorenz, I.C., Marcotrigiano, J., Dentzer, T.G., Rice, C.M. (2006) Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature*, **442**, 831-835
163. Hirowatari, Y., Hijikata, M. & Shimotohno, K. (1995) A novel method for analysis of viral proteinase activity encoded by hepatitis C virus in cultured cells. *Analytical Biochemistry*, **225**, 113–20.
164. Failla, C., Tomei, L. & DeFrancesco, R. (1995) An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 proteinase is essential for interaction with NS4A. *Journal of Virology*, **69**, 1769–77.
165. Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K. & Shimotohno, K. (1995) The N-terminal region of hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3) is essential for stable complex formation with

NS4A. *Journal of Virology*, **69**, 4255–60.

166. Shoji, I., Suzuki, T., Chieda, S. et al. (1995) Proteolytic activity of NS3 serine proteinase of hepatitis C virus efficiently expressed in *Escherichia coli*. *Hepatology*, **22**, 1648–55

167. Kim, J. L., Morgenstern, K.A., Lin, C. et al. (1996) Crystal structure of the hepatitis virus NS3 proteinase domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell*, **87**, 343–55.

167. Suzuki, T., Sato, M., Chieda, S. et al. (1995) *In vivo* and *in vitro* trans-cleavage activity of hepatitis C virus serine proteinase expressed by recombinant baculoviruses. *Journal of General Virology*, **76**, 3021–9.

168. Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H.G., Dammacco, F., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D. (2000) Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*, **74**, 2293-2304.

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

170. Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., Tschopp, J. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*, **437**, 1167-1172.

171. Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S., Hwang, L.H. (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol*, **70**, 8477-8484

172. Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., Caron, P.R. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure*, **6**, 89-100

173. Lin, C., Wu, J. W., Hsiao, K. & Su, M. S. S. (1997) The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with NS4B and NS5A proteins. *Journal of Virology*, **71**, 6465–71.

174. Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D. (2001) The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Virology*, **284**, 70-81.

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

176. Macdonald A. and Harris M. (2004) Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J Gen Virol*, **85**, 2485-502.

177. Tellinghuisen T. L., Marcotrigiano J., Gorbalenya A. E. and Rice C.M. (2004) The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem.*, **279**, 48576-87.

178. Brass V., Bieck E., Montserret R., Wolk B., Hellings J.A., Blum H.E., Penin F and Moradpour D. (2002) An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J Biol Chem.*, **277**, 8130-9.

179. Ide, Y., Zhang, L., Chen, M. et al. (1996) Characterization of the nuclear localization signal and subcellular distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *Gene*, **182**, 203–11.
180. Ide, Y., Tanimoto, A., Sasaguri, Y. & Padmanabhan, R. (1997) Hepatitis C virus NS5A protein is phosphorylated *in vitro* by a stably bound protein kinase from HeLa cells and by cAMP dependent protein kinase A-catalytic subunit. *Gene*, **201**, 151–8.
181. Appel, N., Pietschmann, T., Bartenschlager, R. (2005) Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol*, **79**, 3187-3194
182. Tan, S.L., Katze, M.G (2001) How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. *Virology*, **284**, 1-12
183. Reyes, G.R. (2002) The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci*, **9**, 187-197
184. Koonin, E. V. (1991) The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, **72**, 2197–06.
185. Buck, K. W. (1996) Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in Virus Research*, **47**, 159–251.
186. Lo, S.Y., Selby, M., Tong, M. and Ou, J.H. (1994) Comparative studies of the core gene products of two different hepatitis C virus isolates: two alternative forms determined by a single amino acid substitution, *Virology*, **199**, 124-31.
187. Lo, S.Y., Selby, M.J. and Ou, J.H. (1996) Interaction between hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *J Virol.*, **70**, 5177-82.
188. Ray, R.B., Lagging, L.M., Meyer, K. and Ray, R. (1996) Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol.* **70**, 4438-43.
189. Walewski, J. L., Keller, T.R., Stump, D.D. and Branch, A.D. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*, **7**, 710-721.
190. Varaklioti, A., Vassilaki, N., Georgopoulou, U. and Mavromara, P. (2002) Alternate translation occurs within the core coding region of the hepatitis C viral genome. *J. Biol. Chem.* **277**, 17713-17721.
191. Xu, Z., Choi, J., Yen, T.S., Strohecker, A., Lu, W., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M.J. and Ou, J. (2001) Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* **20**, 3840-3848.
192. Vassilaki, N., Mavromara, P. (2003) Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/core+1 coding open reading frame. *J. Biol. Chem.* **278**, 40503-40513.
193. Vassilaki, N., Boleti, H. and Mavromara, P. (2008) Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res.*, **133**, 123-135.
194. Choi, J., Xu, Z. and Ou, J.H. (2003) Triple decoding of hepatitis C virus RNA by programmed translational frameshifting. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1489-1497.

195. Vassilaki, N., Boleti, H. and Mavromara, P. (2008) Expression studies of the HCV-1a core+1 open reading frame in mammalian cells. *Virus Res.*, **133**, 123-135.
196. Baril, M., Gingras, L. (2005) Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at a non-AUG codon in a +1 reading frame relative to the polyprotein. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 1474-1486.
197. Boulant, S., Becchi, M., Penin, F. and Lavergne, J.P. (2003) Unusual multiple recoding events leading to alternative forms of hepatitis C virus core protein from genotype 1b. *J. Biol. Chem.* **278**, 45785-45792.
198. Yamasaki, K., Weihi, C.C. and Roos, R.P. (199) Alternative translation initiation of Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol.*, **73**: 8519-26.
199. Stacey, S.N., Jordan, D., Williamson, A.J., Brown, M., Coote, J.H. and Arrand, J.R. (2000) Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J Virol.*, **74**, 7284-97.
200. Yueh, A. and Schneider, R.J. (2000) Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev.*, **14**, 414-21.
201. Shirasaki, M., Honda, M. et al. (2010) Protein Required for Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation Is a Potential Therapeutic Target for Hepatitis C Virus Replication. *J Infect Dis*, In Press.
202. Yeh, C.T., Lo, S.Y., Dai, D.I., Tang, J.H., Chu, C.M. and Liaw, Y.F. (2000) Amino acid substitutions in codons 9-11 of hepatitis C virus core protein lead to the synthesis of a short core protein product. *J Gastroenterol Hepatol.* **15**, 182-91.
203. Ogata, S., Nagano-Fujii, M., Ku, Y., Yoon, S. and Hotta, H. (2002) Comparative sequence analysis of the core protein and its frameshift product, the F protein, of hepatitis C virus subtype 1b strains obtained from patients with and without hepatocellular carcinoma. *J Clin Microbiol*, **40**, 3625-30.
204. Wu, W.B., Shao, S.W., Zhao, L.J., Luan, J., Cao, J., Gao, J., Zhu, S.Y., Qi, Z.T. (2007) Hepatitis C virus F protein up-regulates c-myc and down-regulates p53 in human hepatoma HepG2 cells. *Intervirology.* , **50**, 341-6
205. Basu, A., Steele, R., Ray, R., Ray, R.B. (2004) Functional properties of a 16 kDa protein translated from an alternative open reading frame of the core-encoding genomic region of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* , **85**, 2299-306.
206. Fiorucci, M., Boulant, S., Fournillier, A., Abraham, J. D., Lavergne, J. P., Paranhos-Baccala, G., Inchauspe, G., and Bain, C. (2007) Expression of the alternative reading frame protein of Hepatitis C virus induces cytokines involved in hepatic injuries. *J Gen Virol.*, **88**, 1149-1162.
207. Tsao, M. L., Chao, C. H., and Yeh, C. T. (2006) Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 271-277
208. Chuang, W. C., and Allain, J. P. (2008) Differential reactivity of putative genotype 2 hepatitis C virus F protein between chronic and recovered infections. *J Gen Virol*, **89**, 1890-1900
209. Vassilaki, N., Kalliampakou K., Mavromara, P (2008) Differences in the expression of the hepatitis C virus core+1 open reading frame between a nuclear and a cytoplasmic expression system. *J Gen Virology* , **89**, 222-231.

210. Dou, J., Liu, P., Wang, J., Zhang, X (2006) Effect of hepatitis C virus core shadow protein expressed in human hepatoma cell line on human gene expression profiles. *J Gastroenterol Hepatol.*, **21**, 1794-800.
211. Latchman, D. S. (1998). Eukaryotic Transcription Factors. London, Academic Press.
212. Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, **21**, 327-35.
213. Smale, S. T. and Kadonaga, J. T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, **72**, 449-79.
214. Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, **10**, 2657-83.
215. Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Adashi, E. Y., Graves, B. J. and McKnight, S. L. (1988) Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP. *Genes Dev*, **2**, 786-800.
216. McKnight, S. L. (2001) McBindall--a better name for CCAAT/enhancer binding proteins? *Cell*, **107**, 259-61.
217. Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*, **5**, 1538-52.
218. Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O., Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J*, **9**, 1897-906.
219. Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. and Schibler, U. (1990) LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein. *Genes Dev*, **4**, 1541-51.
220. Poli, V., Mancini, F. P. and Cortese, R. (1990) IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, **63**, 643-53.
221. Roman, C., Platero, J. S., Shuman, J. and Calame, K. (1990) Ig/EBP-1: a ubiquitously expressed immunoglobulin enhancer binding protein that is similar to C/EBP and heterodimerizes with C/EBP. *Genes Dev*, **4**, 1404-15.
222. Williams, S. C., Cantwell, C. A. and Johnson, P. F. (1991) A family of C/EBP related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev*, **5**, 1553-67.
223. Ron, D. and Habener, J. F. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, **6**, 439-53.
224. Luethy, J. D., Fargnoli, J., Park, J. S., Fornace, A. J., Jr. and Holbrook, N. J. (1990) Isolation and characterization of the hamster gadd153 gene. Activation of promoter activity by agents that damage DNA. *J Biol Chem*, **265**, 16521-6.
225. Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T. and Imagawa, M. (1996) DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem*, **271**, 3891-6.
226. Lekstrom-Himes, J. A. (2001) The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of

- granulocyte differentiation. *Stem Cells*, **19**, 125-33.
227. Ramji, D. P. and Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365**, 561-75.
228. Agre, P., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1989) Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP *Science*, **246**, 922-6.
229. Nerlov, C. and Ziff, E. B. (1994) Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev*, **8**, 350-62.
230. Williams, S. C., Baer, M., Dillner, A. J. and Johnson, P. F. (1995) CRP2 (C/EBPbeta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J* **14**, 3170-83.
231. Williamson, E. A., Williamson, I. K., Chumakov, A. M., Friedman, A. D. and Koeffler, H. P. (2005). "CCAAT/enhancer binding protein epsilon: changes in function upon phosphorylation by p38 MAP kinase ,*Blood* ,**105**, 3841-7.
232. Pei, D. Q. and Shih, C. H. (1991). An "attenuator domain" is sandwiched by two distinct transactivation domains in the transcription factor C/EBP, *Mol Cell Biol*, **11**, 1480-7.
233. Angerer, N. D., Du, Y., Nalbant, D. and Williams, S. C. (1999). A short conserved motif is required for repressor domain function in the myeloid-specific transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *J Biol Chem*, **274**, 4147-54.
234. Lin, F. T., MacDougald, O. A., Diehl, A. M. and Lane, M. D. (1993). A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 9606-10.
235. Ossipow, V., Descombes, P. and Schibler, U. (1993) CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 8219-23.
236. Descombes, P. and Schibler, U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**, 569-79.
237. Xiong, W., Hsieh, C. C., Kurtz, A. J., Rabek, J. P. and Papaconstantinou, J. (2001) Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3087-98.
238. Yamanaka, R., Kim, G. D., Radomska, H. S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L. T., Antonson, P., Tenen, D. G. and Xanthopoulos, K. G. (1997). CCAAT/ enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 6462-7.
239. Ramji, D. P. and Foka, P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*, **365**, 561-75.
240. Cooper, C., Henderson, A., Artandi, S., Avitahl, N. and Calame, K. (1995). "Ilg/EBP(C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators." *Nucleic Acids Res* **23**(21): 4371-7.
241. Parkin, S. E., Baer, M., Copeland, T. D., Schwartz, R. C. and Johnson, P. F. (2002) Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ilg/EBP). *J Biol Chem*, **277**, 23563-72.

242. Gao, H., Parkin, S., Johnson, P. F. and Schwartz, R. C. (2002) C/EBP gamma has a stimulatory role on the IL-6 and IL-8 promoters. *J Biol Chem*, **277**, 38827-37.
245. Ubeda, M., Wang, X. Z., Zinszner, H., Wu, I., Habener, J. F. and Ron, D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol*, **16**, 1479-89.
246. Kinoshita, S., Akira, S. and Kishimoto, T. (1992) A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1473-6.
247. Chumakov, A. M., Grillier, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J. and Koeffler, H. P. (1997) Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol Cell Biol*, **17**, 1375-86.
248. Vallejo, M., Ron, D., Miller, C. P. and Habener, J. F. (1993) C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4679-83.
249. Shuman, J. D., Cheong, J. and Coligan, J. E. (1997) ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **272**, 12793-800.
250. Wolfgang, C. D., Chen, B. P., Martindale, J. L., Holbrook, N. J. and Hai, T. (1997) gadd153/Chop10, a potential target gene of the transcriptional repressor ATF3. *Mol Cell Biol*, **17**, 6700-7.
251. Hsu, W., Kerppola, T. K., Chen, P. L., Curran, T. and Chen-Kiang, S. (1994) Fos and Jun repress transcription activation by NF-IL6 through association at the basic zipper region. *Mol Cell Biol*, **14**, 268-76.
252. Zagariya, A., Mungre, S., Lovis, R., Birrer, M., Ness, S., Thimmapaya, B. and Pope, R. (1998) Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun. *Mol Cell Biol*, **18**, 2815-24.
253. Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*, **108**, 57-70.
254. Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G. and Hotamisligil, G. S. (2005) Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **25**, 706-15.
255. Schneider-Merck, T., Pohnke, Y., Kempf, R., Christian, M., Brosens, J. J. and Gellersen, B. (2006) Physical interaction and mutual transrepression between CCAAT/enhancer-binding protein beta and the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*, **281**, 269-78.
256. Hendricks-Taylor, L. R., Bachinski, L. L., Siciliano, M. J., Fertitta, A., Trask, B., de Jong, P. J., Ledbetter, D. H. and Darlington, G. J. (1992) The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* **14**, 12-17.
257. Antonson, P. and Xanthopoulos, K. G. (1995) Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha). *Biochem Biophys Res Commun*, **215**, 106-13.

258. Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*, **273**, 28545-8.
259. Legraverend, C., Antonson, P., Flodby, P. and Xanthopoulos, K. G. (1993) High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors." *Nucleic Acids Res*, **21**, 1735-42.
260. Timchenko, N., Wilson, D. R., Taylor, L. R., Abdelsayed, S., Wilde, M., Sawadogo, M. and Darlington, G. J. (1995) Autoregulation of the human C/EBPalpha gene by stimulation of upstream stimulating factor binding. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1192-1202.
261. Kockar, F. T., Foka, P., Hughes, T. R., Kousteni, S. and Ramji, D. P. (2001). Analysis of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein alpha gene promoter demonstrates species-specific differences in the mechanisms for both autoactivation and regulation by Sp1. *Nucleic Acids Res*, **29**, 362-72.
262. Calkhoven, C. F., Bouwman, P. R., Snippe, L. and Ab, G. (1994) Translation start site multiplicity of the CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA is dictated by a small 5' open reading frame. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5540-7.
263. Niehof, M., Manns, M. P. and Trautwein, C. (1997) CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol Cell Biol*, **17**, 3600-13.
264. Chang, C. J., Shen, B. J. and Lee, S. C. (1995). Autoregulated induction of the acute phase response transcription factor gene, *agp/ebp*. *DNA Cell Biol*, **14**, 529-37.
265. Niehof, M., Kubicka, S., Zender, L., Manns, M. P. and Trautwein, C. (2001) Autoregulation enables different pathways to control CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) transcription. *J Mol Biol*, **309**, 855-68.
266. Foka, P., Kousteni, S. and Ramji, D. P. (2001) Molecular characterization of the *Xenopus* CCAAT-enhancer binding protein beta gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 430-6.
267. Mink, S., Jaswal, S., Burk, O. and Klempnauer, K. H. (1999) The v-Myb oncoprotein activates C/EBPbeta expression by stimulating an autoregulatory loop at the C/EBPbeta promoter *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 175-84.
268. Niehof, M., Streetz, K., Rakemann, T., Bischoff, S. C., Manns, M. P., Horn, F. and Trautwein, C. (2001) Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J Biol Chem*, **276**, 9016-27.
269. Chen, C., Dudenhausen, E., Chen, H., Pan, Y. X., Gjymishka, A. and Kilberg, M. S. (2005) Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBPbeta gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence *Biochem J*, **391**, 649-58.
270. Ossipow, V., Descombes, P. and Schibler, U. (1993) CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8219-23.
271. Welm, A. L., Timchenko, N. A. and Darlington, G. J. (1999) C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol Cell Biol* **19**, 1695-704.

272. Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X. and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res*, **27**, 4517-25.
273. Welm, A. L., Mackey, S. L., Timchenko, L. T., Darlington, G. J. and Timchenko, N. A. (2000) Translational induction of liver-enriched transcriptional inhibitory protein during acute phase response leads to repression of CCAAT/enhancer binding protein alpha mRNA. *J Biol Chem* **275**, 27406-13.
274. Cleutjens, C. B., van Eekelen, C. C., van Dekken, H., Smit, E. M., Hagemeyer, A., Wagner, M. J., Wells, D. E. and Trapman, J. (1993) The human C/EBP delta (CRP3/CELF) gene: structure and chromosomal localization. *Genomics*, **16**, 520-3.
275. Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Cho, B. C., Strobel, M. C., Williams, S. C., Copeland, N. G. and Johnson, P. F. (1995). Mouse chromosomal location of the CCAAT/enhancer binding proteins C/EBP beta (Cebpb), C/EBP delta (Cebpd), and CRP1 (Cebpe). *Genomics*, **28**, 333-6.
276. Yamada, T., Tobita, K., Osada, S., Nishihara, T. and Imagawa, M. (1997) CCAAT/enhancer-binding protein delta gene expression is mediated by APRF/STAT3. *J Biochem* ,**121**,731-8.
277. Davies, G. E., Sabatakos, G., Cryer, A. and Ramji, D. P. (2000) The ovine CCAAT/enhancer binding protein delta gene: cloning, characterization, and species-specific autoregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 346-52.
278. Kinoshita, S., Akira, S. and Kishimoto, T. (1992) A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**,1473-6.
279. Alam, T., An, M. R. and Papaconstantinou, J. (1992) Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem*, **267**, 5021-4.
280. McCarthy, T. L., Ji, C., Chen, Y., Kim, K. K., Imagawa, M., Ito, Y. and Centrella, M.(2000) runt domain factor (Runx)-dependent effects on CCAAT/ enhancer-binding protein delta expression and activity in osteoblasts. *Biol Chem*, **75**, 1746-53.
281. Liu, Y. W., Chen, C. C., Tseng, H. P. and Chang, W. C. (2006). Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal*, **18**, 1492-500.
282. Huang, Y. C., Chang, W. C., Su, J. G., Cai, J. L., Chen, C. C., Hung, J. J. and Liu, Y. W. (2007) Peptidoglycan enhances transcriptional expression of CCAAT/enhancer binding protein delta gene in mouse macrophages. *J Biomed Sci* ,**14**, 407-18.
283. Yamanaka, R., Barlow, C., Lekstrom-Himes, J., Castilla, L. H., Liu, P. P., Eckhaus, M., Decker, T., Wynshaw-Boris, A. and Xanthopoulos, K. G. (1997). Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/ enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13187-92.
284. Yamanaka, R., Kim, G. D., Radomska, H. S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L. T., Antonson, P., Tenen, D. G. and Xanthopoulos, K. G. (1997) CCAAT/ enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 6462-7.

285. Yamanaka, R., Lekstrom-Himes, J. A., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A. and Xanthopoulos, K. G. (1998) CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis. *Int J Mol Med*, **1**, 213-221.
286. Chumakov, A. M., Grillier, I., Chumakova, E., Chih, D., Slater, J. and Koeffler, H. P. (1997) Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-epsilon transcription factor. *Mol Cell Biol*, **17**, 1375-86.
287. Park, D. J., Chumakov, A. M., Vuong, P. T., Chih, D. Y., Gombart, A. F., Miller, W. H., Jr. and Koeffler, H. P. (1999) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest*, **103**, 1399-408.
288. Fornace, A. J., Jr., Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J. and Holbrook, N. J. (1989). Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol*, **9**, 4196-203.
289. Park, J. S., Luethy, J. D., Wang, M. G., Fargnoli, J., Fornace, A. J., Jr., McBride, O. W. and Holbrook, N. J. (1992) Isolation, characterization and chromosomal localization of the human GADD153 gene. *Gene*, **116**, 259-67.
290. Carlson, S. G., Fawcett, T. W., Bartlett, J. D., Bernier, M. and Holbrook, N. J. (1993). Regulation of the C/EBP-related gene gadd153 by glucose deprivation. *Mol Cell Biol*, **13**, 4736-44.
291. Roayaie, S., Haim M.B., Emre, S., Fishbein, T.M., Sheiner, P.A., Miller, C.M., Schwartz, M.S. (2000) Comparison of Surgical Outcomes for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Hepatitis B Versus Hepatitis C: A Western Experience. *Annals of Surgical Oncology*, **7**, 1534-4681
292. Potempa, J., Korzus, E. and Travis, J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*, **269**, 15957–15960.
293. Carrell, R. W., Pemberton, P.A. and Boswell, D.R. (1987) The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **52**, 527-535.
294. Kalsheker, N. (1989) Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene. *Biosci. Rep.*, **9**, 129–138.
295. Rogers, J., Kalsheker, N., Wallis, S., Speer, A., Coutelle, C.H., Woods, D. and Humphries, S.E. (1983) The isolation of a clone for human alpha 1-antitrypsin and the detection of alpha 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **116**, 375–382.
296. Carlson, J. A., Rogers, B.B., Sifers, R.N., Hawkins, H.K., Finegold, M.J. and Woo, S.L. (1988) Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest*, **82**, 26–36.
297. Molmenti, E. P., Perlmutter, D.H. and Rubin, D.C. (1993) Cell-specific expression of alpha 1-antitrypsin in human intestinal epithelium. *J Clin Invest*, **92**, 2022–2034.
298. DeMeo, D. L. a. S., E.K. (2004) Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax*, **59**, 259–264.
299. Carell, R. W. a. L., D.A. (2002) a1-antitrypsin deficiency – a model for conformational diseases. *N Engl J Med*, **346**, 45–53.

300. Lomas, D. A. a. M., R. (2002) α 1-antitrypsin polymerisation and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*, **110**, 1585–1590.
301. Propst, T., Propst, A., Dietze, O., Judmaier, G., Braunsteiner, H. and Vogel, W. (1992) High prevalence of viral infection in adults with homozygous and heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency and chronic liver disease. *Ann Intern Med*, **117**, 641–645.
302. Elzouki, A.-N., Verbaan, H., Lindgren, S., Widell, A., Carlson, J. and Eriksson, S. (1997) Serine protease inhibitors in patients with chronic viral hepatitis. *J Hepatol*, **27**, 42–48.
303. Cheung, K. J., Tilleman, K., Deforce, D., Colle, I. and Van Vlierberghe, H. (2009) The HCV serum proteome: a search for fibrosis protein markers. *J Viral Hepat*, **16**, 418–429.
304. Petit, J.M., Benichou, M., Duvillard, L., Jooste, V., Bour, J.B., Minello, A., Verges, B., Brun, J.M., Gambert, P., Hillon, P. (2003) Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am J Gastroenterol.*, **98**, 1150–4.
305. Icard, V., Diaz, O., Scholtes, C., Perrin-Cocon, L., Ramière, C., Bartenschlager, R., Penin, F., Lotteau, V., André, P. (2009) Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One*, **21**, 4233–4243.
306. Nagashima, M., Kudo, M., Chung, H., Ishikawa, E. (2006) Regulatory failure of serum prohepcidin levels in patients with hepatitis C. *Hepatology Research*, **36**, 288–293.
307. Wrighting D.M, Andrews, N.C (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*, **108**, 3204–3209
308. Choi, S., Cho, Y., Kim, H., Park, J. (2007) ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP α and STAT-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **356**, 312–317.
309. Lieber, C.S. (1990) Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogens and vitamins. *Alcohol Alcohol.*, **25**, 157–76.
310. Yoshida, A. (1995) Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes related to alcohol sensitivity and alcoholic diseases. *Alcohol Alcohol.*, **29**, 693–6.
311. Chen CS, Yoshida A (1992) Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 743–7.
312. Yasunami, M., Chen, C.S., Yoshida, A. (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 761.
313. Zhi, X., Chan, E.M., Edenberg, H.J. (2000) Tissue-specific regulatory elements in the human alcohol dehydrogenase 6 gene. *DNA Cell Biol.*, **19**, 487–97.
314. Strömberg, P., Höög, J.O. (2001) Human class V alcohol dehydrogenase (ADH5): A complex transcription unit generates C-terminal multiplicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 544–9.
315. Osier, M.V., Pakstis, A.J., Soodyall, H., *et al.* (2002) A global perspective on genetic variation at the ADH genes reveals unusual patterns of linkage disequilibrium and diversity. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 84–99.

316. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, *et al.* (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.*, **36**, 40–5.

317. Kanda, T., Steele, R., Ray, R., Ray, R. B. (2008) Hepatitis C Virus Core Protein Augments Androgen Receptor-Mediated Signaling. *J. Virology.*, **82**, 11066–11072.