



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού (ή μεταβολισμού γλυκόζης) και της ιϊκής αντιγραφής σε καλλιεργούμενα κύτταρα μολυσμένα με ιούς της οικογένειας Flaviviridae υπό συνθήκες ηπατικής νορμοξίας και σε σχέση με την L-Dopa αποκαρβοξυλάση.

Κάιμου Παναγιώτα

AM: 251604

Ακαδημαϊκή υπεύθυνη: Αναπληρώτρια Καθ. κ. Βασιλακοπούλου Διδώ

Επιστημονική υπεύθυνη: Δρ. κ. Βασιλάκη Νίκη

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθ. κ. Διδώ Βασιλακοπούλου, μέλος ΔΕΠ στο τμήμα Βιολογίας, που με επέλεξε και με εμπιστεύθηκε για να αναλάβω το συγκεκριμένο επιστημονικό θέμα σε ένα διακεκριμένο εξωτερικό εργαστήριο, αυτό της Μοριακής Ιολογίας στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ.

Υπεύθυνη για την επίβλεψη και πρόοδο μου ήταν η Δρ. κ. Νίκη Βασιλάκη που με την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της συνέβαλε στην επίτευξη της εργασίας μου, την εμπλούτιση των γνώσεων μου αλλά και την παρότρυνση για την ανάπτυξη των επιστημονικών ενδιαφερόντων μου. Για τους λόγους αυτούς της οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την διδακτορική φοιτήτρια κ. Ευσεβεία Φρακολάκη που καθόλη τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου ήταν δίπλα μου και με βοήθησε να αναπτύξω τις δεξιότητες μου σε επίπεδο εργαστηριακό, ερευνητικό και γνωστικό. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου της Δρ Βασιλάκη για την άψογη συνεργασία.

Περιεχόμενα

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΜΕΡΟΣ Α : Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV).....	1
A.1.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	1
A.1.1 Ιστορικά στοιχεία	1
A.1.2 Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης.....	1
A.1.3 Πρόληψη - Διάγνωση.....	2
A.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ HCV	3
A.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου	3
A.2.2. Γονιδίωμα.....	4
A.2.3 Ιικές πρωτεΐνες	6
A.2.4. Γονότυποι.....	9
A.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ	10
A.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ HCV.....	12
A.5. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ HCV	14
ΜΕΡΟΣ Β : Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΑΓΚΕΙΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ (DENV)	15
B.1.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	15
B.1.1 Ιστορικά στοιχεία	16
B.1.2 Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης.....	16
B.1.3 Πρόληψη – Διάγνωση	18
B2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ DENV	19
B.2.1. Δομή	19
B.2.2. Γονιδίωμα.....	20
B.2.3 . Ιικές πρωτεΐνες	21
B.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ DENV	27
I. Συστήματα ρεπλικονίων	27

II. Σύστημα μόλυνσης	28
B.5. Θεραπείες για τον DENV	29
Μέρος Γ: Το ένζυμο DDC (L-Dopa Decarboxylase).....	29
Γ.1 Γενικά Στοιχεία.....	29
Γ2. Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά	31
I. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ.....	32
II. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης σε περιφερικούς ιστούς.....	33
Γ3. Προσδιορισμός της μοριακής μάζας του ενζύμου	33
Γ4. Υποστρωματική εξειδίκευση του ενζύμου	34
Γ6.Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης.....	37
I. Δομή του γονιδίου – μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση	38
Γ7. Συσχέτιση της μεταβολικής και σηματοδοτικής οδού της Ντοπαμίνης με τους ιούς Dengue και HCV.....	41
Γ8. Συσχέτιση της DDC με παράγοντες της υποξίας.....	44
Γ9.Το μονοπάτι PI3K-AKT και η εμπλοκή του στη μόλυνση με τους ιούς της οικογένειας Flaviviridae.	45
Μέρος Δ. Το μονοπάτι PI3K-AKT	46
Δ1. Γενικά στοιχεία.....	46
Δ2. Το PI3K/AKT στην αντιϊκή απόκριση	48
Δ3 Το μονοπάτι PI3K-AKT και ο ιός HCV	49
Δ4. Το μονοπάτι PI3K/AKT και ο ιός DENV	53
Μέρος Ε. Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης στην ηπατική νορμοξία.....	54
E1. Γενικά στοιχεία.....	55
E2. Παράγοντες που επάγονται στην υποξία (Hypoxia Induced Factors-HIFs) και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιικό πολλαπλασιασμό και την υποξία.....	56
E3. Η επίδραση της υποξίας στον ιικό κυτταρικό κύκλο.....	59
I. Ρύθμιση προς τα άνω των ιών σε μηχανισμό ανεξάρτητο του HIF	60
II. Επαγόμενη από τον ιό κυτταρική υποξική απόκριση και επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού	60

B. ΣΤΟΧΟΙ – ΣΚΕΠΤΙΚΟ	62
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	65
Γ1. Αντισώματα	65
Γ2. Εκκινητές	66
Γ3. Χημικές ουσίες	66
Γ4. Κυτταρικές σειρές.....	66
Γ5. Ιικές αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος	68
Γ6. Διαλύματα.....	68
Γ7. Μέθοδοι	70
Γ7.1. Καθαρισμός DNA από περιοριστικά ένζυμα με φαινόλη – χλωροφόρμιο	70
Γ7.2. Μεταγραφή in vitro	72
Γ7.3. Καθαρισμός RNA από τα ένζυμα της in vitro μεταγραφής.....	72
Γ7.4. Διαίρεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split).....	73
Γ7.5. Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων για μελλοντική χρήση	74
Γ7.6. Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων.....	75
Γ7.7. Επώαση σταθερών υπογονιδιωματικών κυτταρικών σειρών με αναστολείς.....	75
Γ7.8. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	75
Γ7.9. Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC).....	76
Γ7.10. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP	77
Γ7.11. Σύλλογή και λύση κυττάρων Huh 7 με χρήση διαλύματος Trizol.....	78
Γ7.12. Απομόνωση RNA από δείγματα που λύθηκαν με χρήση διαλύματος Trizol	78
Γ7.13. Ποσοτικοποίηση RNA με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR).....	79
Γ7.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page	80
Γ7.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυταρίνη	82
Γ7.16. Ανοσοστύπωση τύπου Western	82

Γ7.17. Εισαγωγή νουκλεϊκού οξέος σε κύτταρα θηλαστικών με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)	83
Γ7.18. Παραγωγή ιού από το stock και μόλυνση με DENV	84
Γ7.18.1. Παραγωγή του ιού	84
Γ7.18.2. Μόλυνση των κυττάρων με DENV	85
Γ7.19. Δοκιμασία πλάκας για την ογκομέτρηση του DENV	85
Γ.7.20. Ανοσοκατακρήμνιση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες	86
Γ7.22 Μόλυνση κυττάρων θηλαστικών ιϊκό RNA (infection)	90
Δ. Πειραματικό μέρος- Αποτελέσματα	90
Δ1. Χαρακτηρισμός της σχέσης ανάμεσα στην ιστική νορμοξία (3% v/v O ₂) και στον πολλαπλασιασμό του ηπατοτρόπου ιού DENV	90
Δ1.1 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνικής υποξίας (3% O ₂) με μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης	91
Δ1.2 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνικής υποξίας με ποσοτικοποίηση του ιϊκού RNA με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-QPCR).	93
Δ1.3 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνικής υποξίας με ποσοτικοποίηση ιικής πρωτεΐνης μέσω ανοσοδοκιμασίας Western	94
Δ1.4 Έλεγχος των ενδοκυττάρων επιπέδων ATP σε κύτταρα Huh7, Vero E6 και IHH μολυσμένα με τον ιό DENV παρουσία ιστικής νορμοξίας (3% O ₂).	95
Δ1.5 Διερεύνηση του σταδίου του κύκλου ζωής του DENV που ενισχύεται στην υποξία με ηλεκτροδιάτρηση της ελαττωματικής στην αντιγραφή ιικής αλληλουχίας (GND) και του υπογενωμικού ρεπλικονίου (sgDV) σε κύτταρα Huh7	98
Δ1.6 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων-δεικτών την υποξίας και της αναερόβιας γλυκόλυσης.	99
Δ1.7 Έλεγχος του ρόλου του HIF μονοπατιού στην παρατηρούμενη ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV παρουσία υποξίας.	100
Δ1.7.Α Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας και της επίδρασης των χημικών της υποξίας CoCl ₂ , DMOG, DFO στην επαγωγή του HIF και στον πολλαπλασιασμό του DENV σε κύτταρα Huh7.	101
Δ2. Εξακρίβωση του ρόλου του άξονα PI3K/AKT/HIF/γλυκόλυση στη συσχέτιση ανάμεσα στο ενδοκυτταρικό οξυγόνο και την αντιγραφή του DENV	105
Δ2.1 Έλεγχος της επίδρασης της υπερέκφρασης του HIF στο πολλαπλασιασμό του DENV σε κύτταρα Huh7 με συν-διαμόλυνση με το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του ιού (sgDV) και την αλληλουχία των ισομορφών του HIF (HIF1α/2α) και εξακρίβωση της ενεργοποίησης του HIF με ανεξάρτητη συν-διαμόλυνση με την αλληλουχία HRE και την αλληλουχία των ισομορφών του HIF (HIF1α/2α).	105

Δ.2.2 Διερεύνηση του ρόλου του μονοπατιού επιβίωσης/πολλαπλασιασμού PI3K/AKT στην εξαρτώμενη από το οξυγόνο αύξηση στο πολλαπλασιασμό του DENV και στη παραγωγή ATP.....	108
Δ.2.2.A Έλεγχος του ρόλου του PI3K-AKT μονοπατιού στην ενίσχυση στο πολλαπλασιασμό του DENV και στην αύξηση στην παραγωγή ATP παρουσία υποξίας.....	108
Δ.2.2.B Έλεγχος του ρόλου του PI3K-AKT μονοπατιού στην αύξηση στο πολλαπλασιασμό του DENV παρουσία υποξίας.....	110
Δ.2.3 Εξακρίβωση του ρόλου του γλυκολυτικού μεταβολισμού στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV παρουσία υποξίας με εναλλαγή Ενεργειακών υποστρωμάτων στο θρεπτικό υλικό και επώαση του ιού παρουσία διαφορετικών γλυκολυτικών υποστρωμάτων.....	111
Δ3. Ταυτοποίηση της L-Dopa decarboxylase (DDC) που ρυθμίζεται από το χαμηλό οξυγόνο ως ένα καινούργιο σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της αντιγραφής και της παθογονικότητας του DENV στην ηπατική νορμοξία	114
Δ.3.1 Η επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στη ρύθμιση της DDC και η σημασία του PI3K-AKT μονοπατιού στην αλληλεπίδραση αυτή.....	114
Δ.3.2. Επιβεβαίωση της επίδρασης της μόλυνσης με DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της ανενεργής μορφής της DDC παρουσία ηπατικής νορμοξίας μέχρι και τις 72h μετά τη μόλυνση.....	118
Δ.3.3 Ποσοτικοποίηση του RNA της DDC με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για τον έλεγχο των επιπέδων του RNA της στη μόλυνση με τον DENV παρουσία υποξίας.....	119
Δ.3.4 Συν(ανοσοκατακρήμνιση) για διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στη DDC και τη PI3K. Επιβεβαίωση ότι Η DDC και η PI3K αλληλεπιδρούν σε ηπατοκύτταρα.....	120
Δ.3.5 Παρακολούθηση της επίδρασης της μόλυνσης με DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της DDC παρουσία χημικής υποξίας με ανοσοδοκιμασία western.....	123
Δ.3.6 Παρακολούθηση της επίδρασης της αναστολής της DDC στην επίδραση του DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της μονομερούς DDC και της PI3K σε κύτταρα Huh7 με ανοσοδοκιμασία Western.....	126
Δ.3.7. Αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για την ανίχνευση των ισομορφών της DDC σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα.....	128
Δ4. Επιβεβαίωση του συντηρημένου ρόλου της DDC στο κύκλο ζωής των φλαβοϊών, δείχνοντας τη συσχέτιση ανάμεσα στη DDC και στην αντιγραφή του HCV στη κυτταροκαλλιέργεια και σε ηπατικό ιστό.....	130
Δ.4.1 Έλεγχος της επίδρασης της μόλυνσης με τον HCV στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών ενεργή/ανενεργή της DDC σε ηπατοκύτταρα Huh7.5 με ανοσοδοκιμασία Western.....	130
Δ.4.2 Συσχέτιση των επιπέδων του m-RNA της DDC με τα επίπεδα RNA του HCV σε δείγματα από βιοψίες ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο	132
Μέρος Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	134
ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	139

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ Α : Ο ΙΟΣ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C (HCV)

A.1.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο ιός της Ηπατίτιδας C ανήκει στο γένος *Hepacivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Το γένος *Hepacivirus* περιλαμβάνει έξι είδη, μεταξύ των οποίων και ο ιός της Ηπατίτιδας C (*Hepatitis C virus, HCV*) και οι ηπατοϊοί των μη πρωτεύοντων (σκύλων, τρωκτικών, ιπποειδών). Μέχρι πρόσφατα, ο HCV και ο GB-ιός (GBV) ήταν τα μόνα γνωστά μέλη του γένους *Hepacivirus*. Έρευνες για συναφείς ιούς σε πρωτεύοντα θηλαστικά ήταν ανεπιτυχείς, αφήνοντας την ιστορία και την καταγωγή του HCV άγνωστη. Πρόσφατα, οι εξελίξεις στις μεθόδους βαθιάς αλληλούχισης επιτάχυνε τον εντοπισμό ορισμένων συναφών ιών [1].

A.1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η ηπατίτιδα C είναι μια λοίμωξη που προσβάλλει κυρίως το ήπαρ και οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (*Hepatitis C virus, HCV*). Ο HCV περιγράφηκε αρχικά το 1975 ως ένας μεταδιδόμενος παράγοντας που προκαλεί ασθένεια του ήπατος και πήρε το όνομα ιός της ηπατίτιδας μη-A μη-B. Παρά την ανακάλυψη αυτή, οι διεθνείς ερευνητικές προσπάθειες που διεξήχθησαν την επόμενη δεκαετία για την ταυτοποίηση του ιού απέτυχαν. Το 1987 χρησιμοποιήθηκε μια νέα προσέγγιση μοριακής κλωνοποίησης για να εντοπιστεί ο άγνωστος μικροοργανισμός και να αναπτυχθεί διαγνωστικός έλεγχος. Το 1988 επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του ιού και μόλις το 1989 κατορθώθηκε η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός του γονιδιώματός του [2-6]

A.1.2 Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης

Η ηπατίτιδα C παρουσιάζει στο 20% των περιπτώσεων ήπια και ασαφή συμπτώματα συμπεριλαμβανομένων της μειωμένης όρεξης, της κούρασης, της ναυτίας, των πόνων στους μύες ή τις αρθρώσεις και της απώλειας βάρους, ενώ ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις οξείας λοίμωξης που συνδέονται με ίκτερο. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την έκθεση στον HCV μέχρι να εκδηλωθούν τα συμπτώματα της οξείας λοίμωξης είναι περίπου 7

εβδομάδες. Η λοίμωξη υποχωρεί με ή χωρίς θεραπεία στο 25% περίπου των ασθενών, συχνότερα στις νεαρές γυναίκες, ενώ στο 75% περίπου των περιπτώσεων μεταπίπτει σε χρόνια. Η χρόνια φάση είναι μη συμπτωματική για μεγάλο χρονικό διάστημα και είναι το κύριο αίτιο της κίρρωσης και του καρκίνου του ήπατος. Η κίρρωση του ήπατος μπορεί να προκαλέσει υψηλή αρτηριακή πίεση στις φλέβες που συνδέονται με το ήπαρ, συσσώρευση υγρού στην κοιλιακή χώρα, εύκολο μωλωπισμό ή αιμορραγία, διευρυμένες φλέβες ιδιαίτερα στο στομάχι και τον οισοφάγο, ίκτερο (κιτρίνισμα του δέρματος), όπως και εγκεφαλική βλάβη [7-10].

Ο HCV συνδέεται, επίσης, με αυτοάνοσα νοσήματα, με αιματολογικές διαταραχές (π.χ. χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων), με χρόνιες παθήσεις του δέρματος ή του θυρεοειδή, με σακχαρώδη διαβήτη και με λεμφοϋπερπλασία (π.χ. μη-Hodgkin λεμφώματα) [11, 12]

Ο HCV μολύνει μόνο ανθρώπους (*Homo sapiens*) και χιμπατζήδες (*Pan troglodytes*). Η ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών είναι ο κύριος τρόπος μετάδοσης στον ανεπτυγμένο κόσμο. Οι μεταγγίσεις αίματος, τα προϊόντα αίματος και οι μεταμοσχεύσεις οργάνων χωρίς έλεγχο για HCV παρουσιάζουν σημαντικό κίνδυνο για μόλυνση (10%), κυρίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο όπως και η επαγγελματική έκθεση του ιατρικού προσωπικού σε μολυσμένο υλικό (4%) [13]. Τα τατουάζ και τα τρυπήματα στο σώμα συνδέονται με δύο ή τρεις φορές υψηλότερο κίνδυνο ηπατίτιδας C (μη αποστειρωμένος εξοπλισμός).

Τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι δεν υπάρχει κίνδυνος για μετάδοση του ιού μέσω σεξουαλικής επαφής για τα ετερόφυλα ζευγάρια, που δεν έχουν άλλους σεξουαλικούς συντρόφους [14]. Η κάθετη μετάδοση της ηπατίτιδας C από τη μητέρα που έχει προσβληθεί στο παιδί της, συμβαίνει περίπου στο 5% των εγκυμοσυνών κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή κατά τον τοκετό. Και οι δύο περιπτώσεις συνδέονται με συνμόλυνση με τον HIV [15-19].

Τα αντικείμενα προσωπικής φροντίδας (π.χ. ξυραφάκια, οδοντόβουρτσες) μπορούν να έρθουν σε επαφή με το αίμα. Η κοινή τους χρήση ενέχει κινδύνους έκθεσης στον ιό HCV. Ο ιός HCV δεν μεταδίδεται μέσω της συνήθους επαφής, όπως η αγκαλιά, τα φιλιά, η ανταλλαγή σκευών τροφίμων ή μαγειρέματος. Επιπλέον, άλλοι λόγοι, όπως οι παραδοσιακοί μέθοδοι χάραξης του δέρματος, κυρίως σε χώρες της Αφρικής και οι τεχνικές περιτομής, αυξάνουν τις πιθανότητες μόλυνσης λόγω συχνής χρήσης μη αποστειρωμένων εργαλείων (1%), ενώ το αίτιο της μετάδοσης παραμένει άγνωστο στο 10% των περιπτώσεων [15].

A.1.3 Πρόληψη - Διάγνωση

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει κάποιο εμβόλιο για την ηπατίτιδα C. Τα εμβόλια είναι ακόμη υπό ανάπτυξη, ενώ ορισμένα από αυτά έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα [20]. Ένας συνδυασμός προληπτικών μέτρων, όπως τα προγράμματα ανταλλαγής βελόνων και οι θεραπείες της κατάχρησης ουσιών, μειώνουν τον κίνδυνο ηπατίτιδας C μεταξύ των χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών κατά περίπου 75%. Οι εξετάσεις των αιμοδοτών είναι απαραίτητες, ενώ σε χώρες όπου υπάρχει ανεπαρκής παροχή αποστειρωμένων συριγγών, οι υπηρεσίες υγειονομικής περίθαλψης οφείλουν να προτιμούν τη λήψη φαρμάκων δια του στόματος, αντί ενέσιμων [19, 21]. Οι άνθρωποι με χρόνια ηπατίτιδα C οφείλουν να αποφεύγουν το αλκοόλ και τα φάρμακα που είναι τοξικά για το συκώτι, ενώ θα πρέπει να εμβολιάζονται για την ηπατίτιδα A και την ηπατίτιδα B.

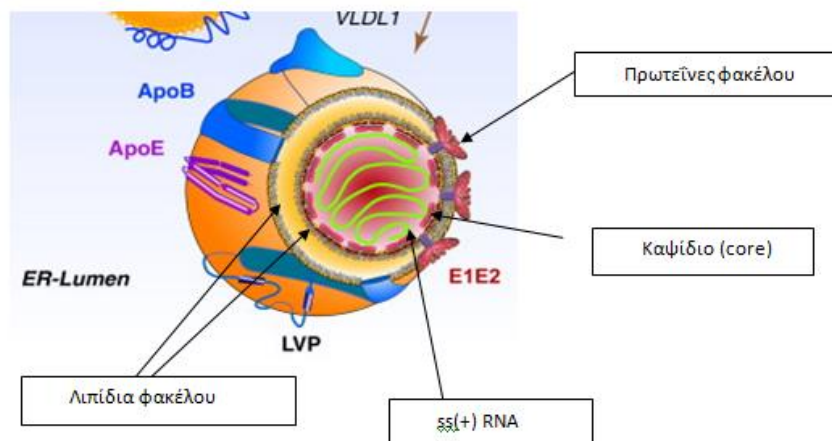
Η διάγνωση της νόσου μπορεί να γίνει με ανίχνευση στο αίμα, είτε αντι-HCV αντισωμάτων 4-10 εβδομάδες μετά την μόλυνση, είτε αντιγράφων του γενετικού υλικού του ιού 1-2 εβδομάδες μετά την μόλυνση. Μετά την αρχική εμφάνιση των αντι-HCV αντισωμάτων, τα άτομα φορείς παραμένουν οροθετικά εκτός από ορισμένες περιπτώσεις αυτόματης εξάλειψης του ιού. Η ανίχνευση των αντισωμάτων βασίζεται στην ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA ή στην ανοσοσύτωση τύπου Western, για τις οποίες κυκλοφορούν ειδικά διαγνωστικά τεστ. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση του ιικού RNA γίνεται με μεθόδους που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και μπορούν να ανιχνεύσουν λιγότερα από 1.000 αντίγραφα του ιικού RNA ανά ml δείγματος [22, 23]. Ένας ακόμη σημαντικός και απλός τρόπος ανίχνευσης ηπατίτιδας είναι η μέτρηση των επιπέδων των ηπατικών ενζύμων στον ορό (π.χ. αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, ALT). Τα ηπατικά ένζυμα μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του αρχικού διαστήματος της λοίμωξης, ενώ κατά μέσο όρο αρχίζουν να αυξάνονται 7 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη. Η εξέταση αυτή δεν μπορεί να κάνει διαχωρισμό μεταξύ οξέων και χρόνιων λοιμώξεων [19, 24]. Επιπρόσθετα, οι ηπατικές βιοψίες μπορούν να προσδιορίσουν το βαθμό βλάβης του ήπατος και να προβλέψουν την εξέλιξη της νόσου, πριν τη θεραπεία ή μετά την αποτυχία μιας αντι-ιικής θεραπείας [22, 23].

A.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ HCV

A.2.1. Δομή ιικού σωματιδίου

Όσον αφορά το μέγεθος του ιού, φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν την ύπαρξη σωματιδίων σφαιρικού σχήματος διαμέτρου 50 nm περίπου στο κυτταρόπλασμα μολυσμένων ηπατοκυττάρων [25]. Τα ιικά σωματίδια αποτελούνται από ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας μόριο RNA [(+) ssRNA] που περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικής σύστασης περίβλημα με

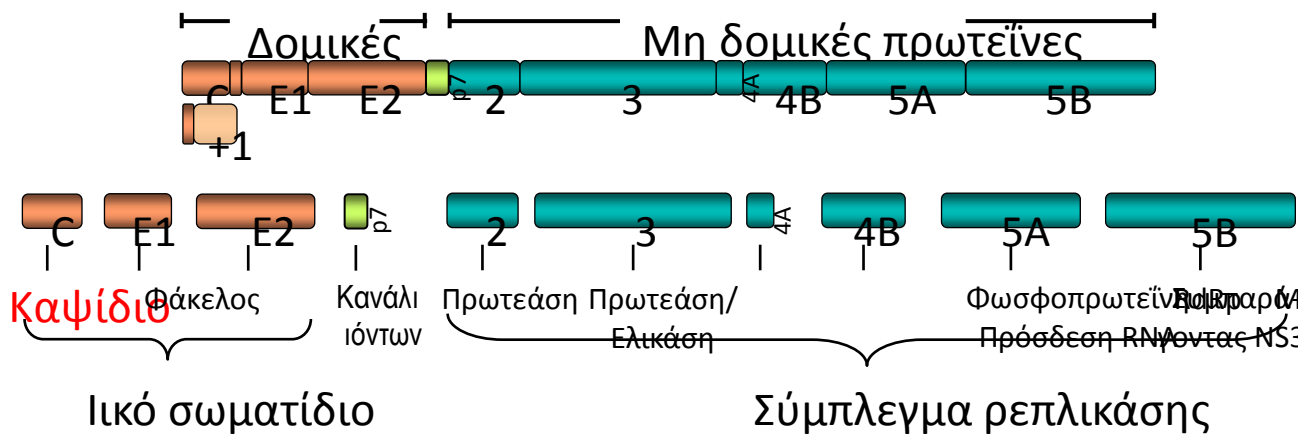
εικοσαεδρική (σφαιρική) δομή, το καψίδιο. Το νουκλεϊκό οξύ αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του καψιδίου σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο. Το νουκλεοκαψίδιο εγκλείεται περαιτέρω σε ένα λιποπρωτεϊνικής φύσης περίβλημα, το έλυτρο. Το έλυτρο είναι μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία εντοπίζονται ενσωματωμένες οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες φακέλου του ιού, ενώ έχει αποδειχθεί ότι έχει κυτταρική προέλευση και πιστεύεται ότι προέρχεται από κάποια εσωτερική μεμβράνη του ξενιστή [26]. Στο ικό σωματίδιο συνδέονται και απολιποπρωτεΐνες, όπως η ApoE [27].



Εικ.1: Δομή του νουκλεοκαψιδίου του HCV [28].

A.2.2. Γονιδίωμα

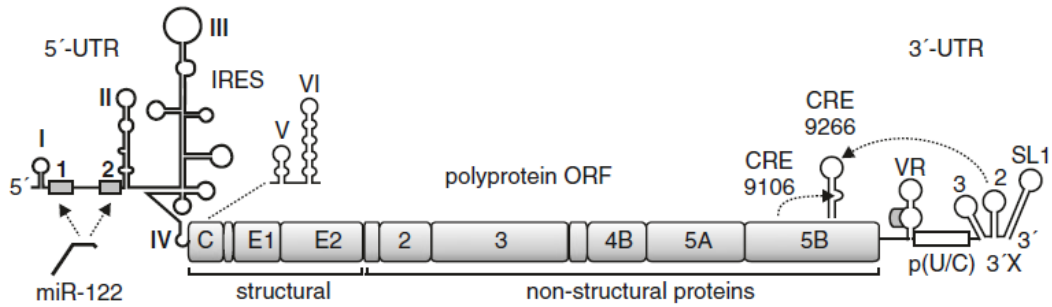
Το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από ένα (+)ssRNA μεγέθους 9.600 βάσεων το οποίο κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη 3.000 αμινοξέων περίπου. Στα άκρα του RNA βρίσκονται οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές (non translated regions - NTRs), ενώ μεταξύ των NTRs υπάρχει η κωδική περιοχή, ένα μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF) που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη. Το αρχικό προϊόν της μετάφρασης ωριμάζει συν- και μεταμεταφραστικά από κυτταρικές και ικές πρωτεάσες και δίνει τις δομικές (core, E1, E2) και τις μη δομικές (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) πρωτεΐνες του ιού, απαραίτητες για το σχηματισμό των ώριμων σωματιδίων του ή την αντιγραφή του εντός του κυττάρου ξενιστή [29-33].



Εικ. 2: Παρουσίαση των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του HCV.

Στο αμινοτελικό άκρο η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' NTR) αποτελείται από 341 νουκλεοτίδια και είναι μία από τις δύο πιο συντηρητικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος, με περίπου 90% ομολογία μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων. Η 5' NTR χαρακτηρίζεται από έντονη δευτεροταγή δομή και είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γονιδιώματος, η οποία δεν γίνεται με τη βοήθεια της δομής καπέλου (δεν υπάρχει καπέλο στο 5' άκρο) και το ριβόσωμα δεν προσδένεται στο 5' άκρο της. Ο ιός διαθέτει περιοχή εσωτερικής πρόσδεσης ριβοσωμάτων (IRES), η οποία περιλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα της 5' NTR, καθώς και τις πρώτες 44 βάσεις της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης core. Σημαντικό ρόλο στη μετάφραση του ιού μέσω IRES έχει η RNA δευτεροταγής δομή της core αλληλουχίας [34]. Επιπρόσθετα, η 5' NTR καθορίζει κι άλλες σημαντικές λειτουργίες του κύκλου του ιού, όπως η ρύθμιση της αντιγραφής, μια και η συμπληρωματική της αλληλουχία αποτελεί την περιοχή έναρξης αντιγραφής για την παραγωγή του ιικού RNA από το αρνητικής πολικότητας ενδιάμεσο μόριο, καθώς και η συγκρότηση των ιικών σωματιδίων, αφού αλληλεπιδρά με την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού [26, 35, 36].

Στο καρβοξυτελικό άκρο η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' NTR) αποτελείται από 3 διακριτές περιοχές. Πρώτα υπάρχει μια χαμηλής συντηρητικότητας περιοχή μήκους 40 βάσεων περίπου με σταθερή δομή στελέχους θηλιάς, που παίζει ρόλο στη λήξη της μετάφρασης. Ακολουθεί μια polyU/C αλληλουχία πλούσια σε πυριμιδίνες και μετά η 3' NTR καταλήγει με μια συντηρητική ουρά μήκους 98 νουκλεοτιδίων (98X). Η 98X ουρά παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αντιγραφής του ιού, μια και αποτελεί τη θέση εισόδου της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης κατά την αντιγραφή της θετικής αλυσίδας του RNA του. Επίσης, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη core και εμπλέκεται στην ρύθμιση της μετάφρασης του ιού, αφού η παρουσία της αυξάνει 3-5 φορές τα επίπεδα μετάφρασης [37-41].



Εικ.3: Δομή των 5' & 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών .

A.2.3 Ιικές πρωτεΐνες

Core: Πρόκειται για την πιο βασική και συντηρητική πρωτεΐνη του ιού. Συνδέεται στο RNA του ιού και είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση του ιικού καψιδίου. Η ώριμη core απελευθερώνεται από την ιική πολυπρωτεΐνη μέσω της δράσης δύο κυτταρικών πεπτιδασών στο 3' και 5' άκρο της. Είναι μια διμερής μεμβρανική πρωτεΐνη που σταθεροποιείται μέσω του σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού στο αμινοξύ Cys 128 [42, 43]. Αποτελείται από δύο λειτουργικές περιοχές [42]. Η αμινοτελική υδρόφιλη περιοχή 1 (D1, αμινοξέα 1-117) περιέχει ένα υψηλό ποσοστό από βασικά κατάλοιπα και έχει θεωρηθεί υπεύθυνη τόσο για τη σύνδεση με το RNA όσο και για τον ομο-ολιγομερισμό, προωθώντας έτσι την συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου. Συμμετέχει επίσης στις αλληλεπιδράσεις με πολυάριθμους κυτταρικούς παράγοντες [44]. Η περιοχή D2 αποτελείται από μια κεντρική υδρόφοβη θηλειά που συνδέει δύο αμφιπαθείς α -έλικες (περιλαμβάνει τα αμινοξέα 119-136 και 148-165) και αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια των λιπιδικών σταγονιδίων [45]. Η πρωτεΐνη NS5A θεωρείται πως παραδίδει το RNA του HCV στην core πρωτεΐνη, και αφού ως μεμβρανική άγκυρα είναι σε θέση να συνδεθεί με τη μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων των λιπιδικών σταγονιδίων, η μεταφορά του RNA πιθανώς συμβαίνει στα λιπιδικά σταγονίδια ή στην επαφή λιπιδικών σταγονιδίων και ενδοπλασματικού δικτύου και, εν τέλει, πραγματοποιείται η συγκρότηση των λιπο-ιικών σωματιδίων [46].

E1, E2: Με μήκος 192 αα και 363 αα αντίστοιχα, αποτελούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου του ιού από το οποίο προεξέχουν τα αμινοτελικά άκρα τους, ενώ τα υδρόφοβα καρβοξυτελικά άκρα τους αγκυροβολούν στο εσωτερικό του ιικού φακέλου. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι γλυκοζυλιωμένες σε μεγάλο βαθμό και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Οι 2 αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν μη ομοιοπολικό ετεροδιμερές, που λειτουργεί ως υποδοχέας που εμπλέκεται στην πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, την σύντηξη των ιικών και κυτταρικών μεμβρανών και την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωση του ιού [47-49].

p7: Περιλαμβάνει δύο διαμεμβρανικές α-έλικες που συνδέονται με μια θετικά φορτισμένη κυτταροπλασματική θηλειά, ενώ το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο είναι προσανατολισμένα προς τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου [50]. Σχηματίζει εξαμερή ή επταμερή με την ιδιότητα του καναλιού κατιόντων και διευκολύνει την παραγωγή του ιού, υποδεικνύοντας ότι ανήκει στην οικογένεια των ιικών πορινών [51-53]. Η p7 είναι απαραίτητη για τη συγκρότηση και απελευθέρωση των μολυσματικών HCV *in vitro* καθώς και για πραγματοποίηση παραγωγικής μόλυνσης *in vivo* [54]. Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία της είναι άγνωστη, φαίνεται όμως ότι η p7 δρα καταστέλλοντας την οξίνιση των κυτταρικών οργανιδίων, προστατεύοντας έτσι τα συγκροτούμενα ιικά σωματίδια από πρόωρες διαμορφωτικές αλλαγές που επάγονται από τις αλλαγές του pH του περιβάλλοντος [55].

NS2: Διαχωρισμός της πρόδρομης πολυπρωτεΐνης στην περιοχή που συνδέονται οι NS2/NS3 επιτυγχάνεται με μια πρωτεάση κυστεΐνης που κωδικοποιείται από την NS2 και της οποίας η λειτουργία ενισχύεται από το ένα τρίτο του αμινοτελικού άκρου της NS3 [56]. Η ίδια η NS2 πρωτεάση δεν είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA, αλλά η διάσπαση στην περιοχή που συνδέονται οι NS2/NS3 είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση της πλήρους λειτουργικής πρωτεΐνης NS3 και, ως εκ τούτου, για την προώθηση της ιικής αντιγραφής.

NS3: Είναι μία πρωτεΐνη 67 kDa με πολυλειτουργικό ρόλο. Το αμινοτελικό της άκρο έχει δραστηριότητα πρωτεάσης σερίνης και το καρβοξυτελικό δραστηριότητα NTPάσης/ελικάσης [57]. Η πρωτεΐνη NS3 δεσμεύεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου μαζί με την πρωτεΐνη NS4A [58]. Τα τελευταία 185 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της εμπλέκονται στον διαχωρισμό των NS3-4A, 4A-4B, 4B-5A και 5A-5B [59]. Η πρωτεΐνη NS3 αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης [60]. Η NS3 πρωτεάση σερίνης αποδείχθηκε επίσης ότι επηρεάζει και την έμφυτη κυτταρική ανοσία του ξενιστή μέσω της αναστολής σηματοδότησης των RIG-I και TLR3 [61]. Η περιοχή με δραστηριότητα NTPάσης/ελικάσης της NS3 είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA. Λειτουργίες κατά τη διάρκεια της αντιγραφής μπορεί να είναι το ξεδίπλωμα των ενδιάμεσων δίκλωνων RNA για την εξάλειψη δευτεροταγών δομών RNA ή για το διαχωρισμό του γονιδιώματος από πρωτεΐνες που συνδέονται σε νουκλεϊκά οξέα [62, 63].

NS4A: Είναι ένα πρωτεϊνικό μόριο 54 αμινοξέων, το οποίο δρα ως συμπαραγοντας για την πρωτεΐνη NS3. Η πρωτεΐνη NS4A έχει ένα αμινοτελικό άκρο εξαιρετικά υδρόφοβο και πιθανό να εμπλέκεται στη στόχευση της NS3 στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου [58]. Η NS4A απαιτείται επίσης για την φωσφορυλίωση της NS5A και μπορεί να αλληλεπιδρά άμεσα με αυτήν (NS4A-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της NS5A [64]).

NS4B: Είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη 27 kDa, εξ' ολοκλήρου μεμβρανική με 4 διαμεμβρανικές περιοχές [65]. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι η NS4B επάγει το σχηματισμό ενός μεμβρανώδους δικτύου, που αποτελείται από τοπικά περιορισμένα μεμβρανικά κυστίδια και χρησιμεύει ως ένα ικρίωμα για το σύμπλεγμα αντιγραφής του HCV [66, 67]. Η NS4B αλληλεπιδρά με την NS4A και ως εκ τούτου έμμεσα με NS3 και NS5A ενώ έχει αναφερθεί ότι δεσμεύει το RNA του ιού [68, 69]. Επιπλέον, η NS4B φαίνεται πως εμφανίζει και ιδιότητα NTPάσης, αλλά και πως συμμετέχει στην ιική συγκρότηση [70-72].

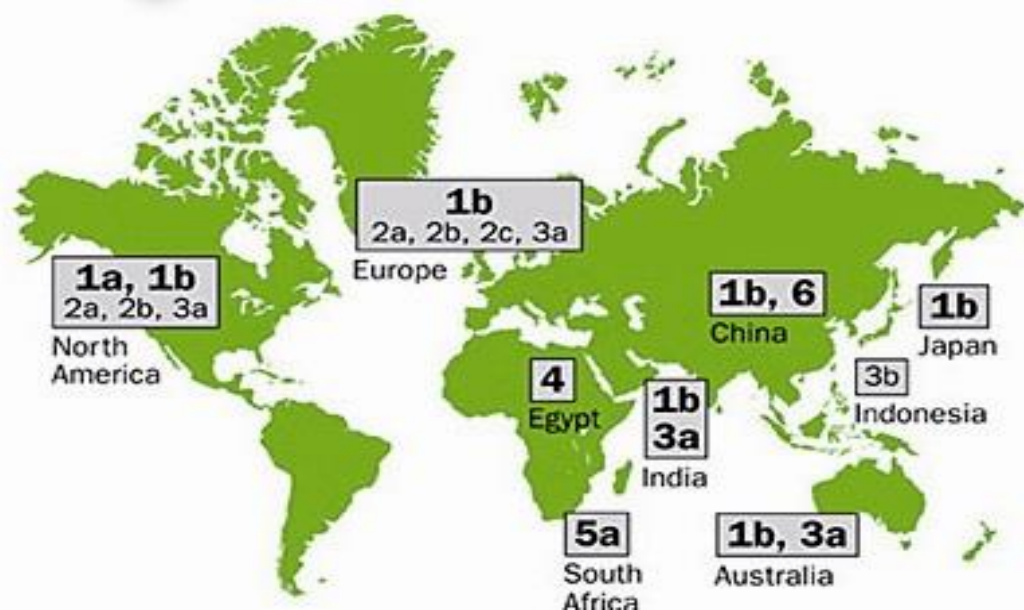
NS5A: Είναι μία υδρόφιλη φωσφοπρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή, στη ρύθμιση κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης και στην ανταπόκριση σε ιντερφερόνη [73, 74]. Η NS5A δεν περιέχει διαμεμβρανικές περιοχές, όμως μπορεί να συσχετίζεται με την μεμβράνη μέσω μίας αμφίφιλης α-έλικας στο αμινοτελικό της άκρο [75, 76], περιέχει όμως απαραίτητα ένα ιόν ψευδαργύρου, το οποίο βοηθά στην επίτευξη δομικής ακεραιότητας [77]. Η NS5A εμφανίζει μία περιοχή, η οποία προσδίδει αντίσταση του ιού σε θεραπεία με ιντερφερόνη [78] και ονομάζεται περιοχή καθορισμού ευαισθησίας σε ιντερφερόνη-α (interferon-α sensitivity-determining region, ISDR), η οποία βρέθηκε αργότερα να αλληλεπιδρά άμεσα με ένα προϊόν γονιδίου που διεγείρεται από IFN-α, αυτό της PKR πρωτεϊνικής κινάσης. Η PKR πρωτεΐνη κινάση ενεργοποιείται μέσω σύνδεσης με δίκλωνο RNA με αποτέλεσμα τη διακοπή της πρωτεϊνσύνθεσης [79]. Επίσης, η NS5A έχει προταθεί να έχει πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που επηρεάζουν την κυτταρική σηματοδότηση (MAPK, ROS οδοί και μονοπάτια σηματοδότησης της κινάσης της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης) [73].

NS5B: Η αντιγραφή του HCV γίνεται μέσω της παραγωγής μιας συμπληρωματικής RNA αλυσίδας με αρνητική πολικότητα, χρησιμοποιώντας την αλυσίδα θετικής πολικότητας ως εκμαγείο, και την επακόλουθη σύνθεση του γονιδιωματικού RNA θετικής πολικότητας από την αλυσίδα αρνητικής πολικότητας. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τα δύο αυτά βήματα είναι η NS5B RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp). Αυτό το ένζυμο με μοριακό βάρος 68 kDa που αποτελείται από 591 αμινοξέα έχει εκτεταμένα χαρακτηριστεί [80-83] και αναδειχθεί ως ένα σημαντικό στόχο για αντιική παρέμβαση. Η καταλυτική περιοχή της NS5B περιέχει μοτίβα που είναι κοινά σε όλες τις RdRps, συμπεριλαμβανομένων της κλασσικής ακολουθίας GDD εντός μοτίβου C, καθώς των υποπεριοχών με οργάνωση δεξιού χεριού (δάχτυλα, παλάμη και αντίχειρας). Η περιοχή αυτή, είναι ικανή *in vitro* να εκτελεί *de novo* και εξαρτώμενη από εκκινήτη σύνθεση του RNA, απαιτώντας μόνο δισθενή μέταλλα (μαγνήσιο ή μαγγάνιο) ως συμπαραγόντες. Τα καταλυτικά αμινοξέα Asp 220 και Asp 318, που βρίσκονται στην υποπεριοχή της παλάμης, προδένουν χημικά δύο καταλυτικά μεταλλικά ιόντα που είναι υπεύθυνα για την αντίδραση πολυμερισμού. Το μονόκλωνο RNA εκμαγείο ή το σύμπλοκο εκκινήτη-

εκμαγείου προσδένεται σε μία αύλακα ανάμεσα στη περιοχή των δακτύλων και του αντίχειρα που οδηγεί απευθείας στο ενεργό κέντρο. Τα απαιτούμενα NTPs αποκτούν πρόσβαση σε αυτήν την περιοχή μέσω μιας συγκεκριμένης σήραγγας που ξεκινά από την πίσω πλευρά της περιφέρειας και εκτείνεται μέσα στο ενεργό κέντρο που βρίσκεται στην περιοχή της παλάμης. Εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών των δακτύλων και του αντίχειρα οδηγούν σε ένα εντελώς περικυκλωμένο ενεργό κέντρο, με τον συνδετήρα (ένας σύνδεσμος 40 αμινοξέων μεταξύ της καταλυτικής περιοχής και της μεμβρανικής άγκυρας του καρβοξυτελικού άκρου) να φράσσει το ενεργό κέντρο μέσω αλληλεπίδρασης με το λεγόμενο β-φύλλο της περιοχής του αντίχειρα. [84].

A.2.4. Γονότυποι

Με βάση τις γενετικές διαφορές μεταξύ των στελεχών του ιού, ο ιός της ηπατίτιδας C κατατάσσεται σε επτά γονότυπους (1-7), με περισσότερες από 100 υποκατηγορίες-υποτύπους σε κάθε γονότυπο. Οι γονότυποι διαφέρουν μεταξύ τους κατά 30-35% καθ' όλο το μήκος του ιικού γονιδιώματος [85-87]. Οι διαφορές δεν είναι κατανεμημένες ομοιόμορφα, καθώς οι NTRs και η περιοχή της core πρωτεΐνης παρουσιάζουν την μικρότερη ποικιλομορφία, σε αντίθεση με την περιοχή του αμινοτελικού άκρου της E2 που είναι η πιο μεταβλητή, για αυτό και έχει ονομαστεί υπερμεταβλητή περιοχή. Επίσης, το μέγεθος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων [88, 89]. Οι γονότυποι 1, 2 και 3 παρουσιάζουν παγκόσμια εξάπλωση. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο γονότυπος 1 προκαλεί το 70% των περιπτώσεων, ο γονότυπος 2 το 20%, ενώ κάθε ένας από τους υπόλοιπους γονότυπους προκαλεί το 1%. Ο γονότυπος 1 είναι, επίσης, ο πιο συνηθισμένος στη Νότιο Αμερική και την Ευρώπη. Οι υπότυποι 1a και 1b βρίσκονται σε όλο τον κόσμο και προκαλούν το 60% όλων των περιπτώσεων [90].



Εικ.4: Κατανομή των γονότυπων του HCV παγκοσμίως

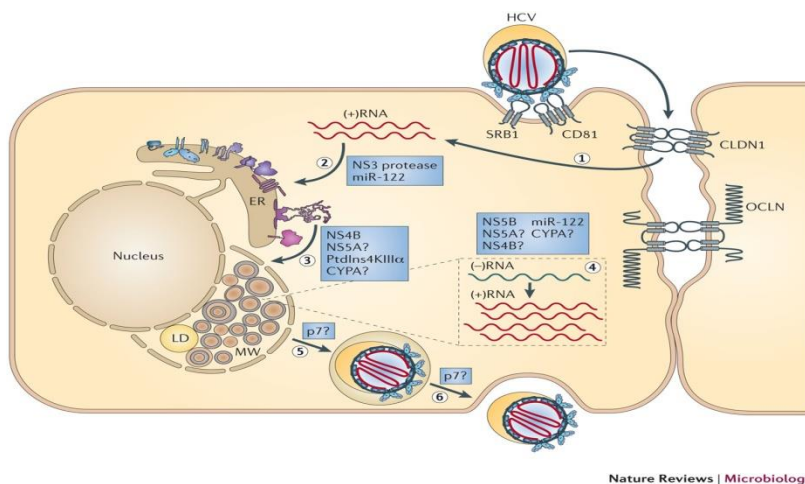
A.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ

Η αναπαραγωγή του HCV περιλαμβάνει διάφορα στάδια. Ο ιός έχει ως κύριο όργανο-στόχο το ήπαρ. Το 25-73% των ηπατοκυττάρων μπορεί να υποστηρίξει την αντιγραφή του. Βέβαια, ικό γενετικό υλικό έχει εντοπιστεί σε μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού συστήματος, πολυμορφοπύρρηνα, λευκοκύτταρα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα (παγκρέατος, θυρεοειδή, επινεφριδίων, σπλήνα, χοληφόρων), κύτταρα στοματικού βλεννογόνου, δενδριτικά κύτταρα, κύτταρα κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), χωρίς όμως να είναι επιβεβαιωμένη πάντα η ικανότητα αντιγραφής του ιού στα κύτταρα αυτά [91-93]. Εντός του ξενιστή, ο ιός της ηπατίτιδας C απαντά ως μίγμα συγγενικών αλλά διαφορετικών αλληλουχιών RNA, με ομολογία 65-70%, οι οποίες μπορούν να είναι ανθεκτικές σε αντι-ικά φάρμακα [94]. Ο πολλαπλασιασμός του ιού στα ηπατοκύτταρα και στα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος πιθανώς ευθύνεται για τα υψηλά επίπεδα των ανοσολογικών διαταραχών που βρέθηκαν σε ασθενείς με χρόνια λοίμωξη HCV [95].

Ο HCV συνδέεται με λιποπρωτεΐνες χαμηλής και πολύ χαμηλής πυκνότητας (LDL, VLDL) του ορού του αίματος, οι οποίες φαίνεται να παίζουν σημαντικούς ρόλους στην είσοδο του ιού στα κύτταρα, στη συγκρότηση του ιικού σωματιδίου και ίσως στην αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος. [96]. Ο HCV εισέρχεται στο κύτταρο-ξενιστή μέσω ειδικών υποδοχέων (LDL-R, SR-BI, DG-SIGN) και μορίων (CD81, claudin-1 και occludin) της κυτταρικής μεμβράνης

του δεύτερου [97-99]. Τα ιικά σωματίδια υφίστανται ενδοκυττάρωση, μεταφέρονται σε ενδοσώματα, όπου λόγω του όξινου περιβάλλοντος συμβαίνει συντήκεται ο ιικός φάκελος με τη μεμβράνη του ενδοσώματος απελευθερώνοντας το καψίδιο του ιού στο κυτταρόπλασμα [100].

Ο ιός υποχρεωτικά χρησιμοποιεί το κυτταρικό σύστημα μετάφρασης, αφού ούτε κωδικοποιεί, ούτε μεταφέρει δικό του αντίστοιχο σύστημα. Προκειμένου λοιπόν να αποφύγει τον ανταγωνισμό από το πλήθος των κυτταρικών μηνυμάτων, χρησιμοποιεί έναν ιδιαίτερο μηχανισμό έναρξης μετάφρασης, τον IRES μηχανισμό, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω [101-105]. Η μετάφραση του ιικού RNA οδηγεί στην παραγωγή μιας πολυπρωτεΐνης μήκους περίπου 3000 αα που ωριμάζει συν- και μετα-μεταφραστικά από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες, στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου, σε 10 ώριμες πρωτεΐνες: NH₂-core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH. Η πρωτεολυτική ωρίμανση της πολυπρωτεΐνης είναι σημαντική για τον επακόλουθο σχηματισμό του αντιγραφосώματος του ιού. Η HCV RNA αντιγραφική μηχανή είναι κυτταροπλασματική και μεμβρανοσυνδεδεμένη. Αποτελείται τουλάχιστον από τις πρωτεΐνες NS3→NS5B και από συστατικά του κυττάρου ξενιστή. Οι βασικές ενζυμικές ενεργότητες της HCV αντιγραφάσης είναι αυτή της ΝΤΡάσης/ελικάσης, που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα της NS3, καθώς και αυτή της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, που εντοπίζεται στην NS5B [106, 107].



Εικ. 5: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του HCV

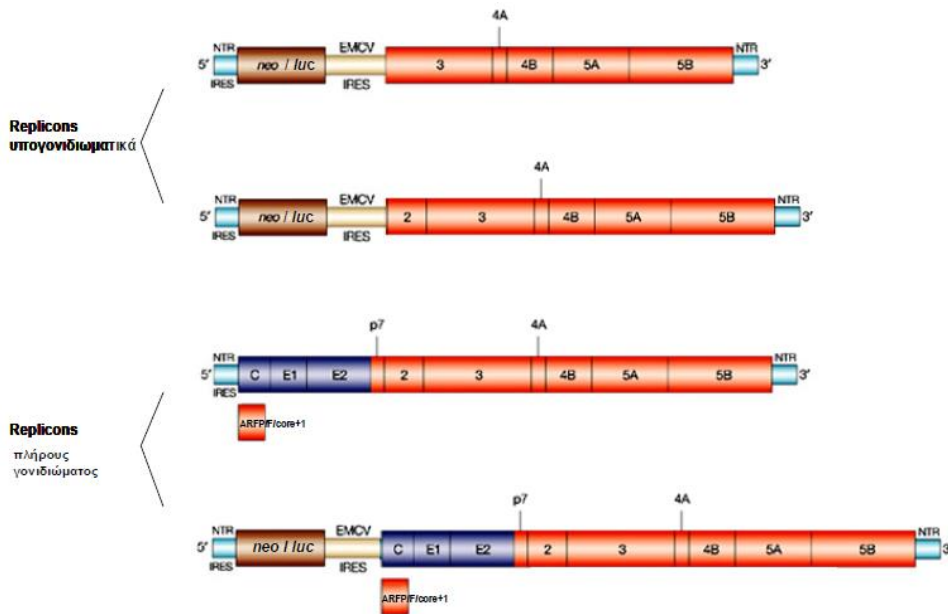
Εντός των κυστιδίων το ιικό RNA θετικής πολικότητας προστατεύεται από την αποικοδόμηση. Το πρώτο βήμα στην αντιγραφή του ιικού RNA θετικής πολικότητας RNA(+) περιλαμβάνει τη σύνθεση συμπληρωματικών μορίων RNA αρνητικής πολικότητας RNA(-). Τα μόρια RNA (-) χρησιμοποιούνται

ακολουθώς ως μήτρα για τη σύνθεση μορίων RNA(+), που μεταφράζονται ή αντιγράφονται ή πακετάρονται σε νέους ιούς. Η διαδικασία αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι επιρρεπής σε λάθη καθώς η πολυμεράση (RdRp) δεν έχει επιδιορθωτική ικανότητα [108].

Η συγκρότηση των HCV σωματιδίων προϋποθέτει αλληλεπίδραση ανάμεσα στην πρωτεΐνη core και το ιικό RNA [26]. Η έξοδος των ιικών σωματιδίων του HCV δεν απαιτεί τη λύση των κυττάρων, πράγμα που συμφωνεί με τη χρονιότητα της λοίμωξης. Ο HCV εισχωρεί σε ενδοκυτταρικά κυστίδια και ακολουθώντας την εκκριτική μηχανή του κυττάρου ελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο [109].

A.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ HCV

Σημαντικό σύστημα για τη μελέτη της αντιγραφής του HCV RNA αποτέλεσαν τα συνθετικά αυτοαντιγραφόμενα μόρια HCV RNA (ρεπλικόνια - replicons) σε κυτταροκαλλιέργεια, που περιέχουν τμήμα ή ολόκληρο το γονιδίωμα του HCV (υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια). Τα πρώτα ρεπλικόνια που κατασκευάστηκαν αποτελούνταν από ένα HCV RNA γονότυπου 1b. Τα 5' και 3' μη μεταφραζόμενα άκρα αυτών των ρεπλικονίων αντιστοιχούν σε αυτά του HCV γονιδιώματος. Αμέσως μετά το HCV IRES ακολουθεί είτε γονίδιο αναφοράς της firefly λουσιφεράσης (luc) (παροδικά ρεπλικόνια), είτε γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης (neo) (σταθερά ρεπλικόνια). Τα κύτταρα που φέρουν τα τελευταία επιλέγονται με χρήση του αντιβιοτικού νεομυκίνη (επηρεάζει την κυτταρική μετάφραση) και το αποτέλεσμα είναι η σταθερή αντιγραφή των ρεπλικονίων αυτών. Για τον έλεγχο της έκφρασης των μη δομικών πρωτεϊνών (NS2-NS5B ή NS3-NS5B) ένα ετερόλογο ιικό IRES, αυτό του ιού της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας (EMCV, Picornavirus) έχει εισαχθεί μετά το γονίδιο ανθεκτικότητας στη νεομυκίνη. Εκτός από το αρχικό υπογονιδιωματικό HCV replicon RNA του στελέχους γονότυπου 1b γνωστού ως Con1, έχουν αναπτυχθεί replicons με τη χρήση τμήματος ή πλήρων γονιδιωματικών αλληλουχιών και άλλων 1b στελεχών αλλά και άλλων γονότυπων (1a και 2a) και η αντιγραφή του HCV RNA έχει καταστεί εφικτή σε HeLa, 293, HepG2 και σε κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος ποντικού. Η κυτταρική σειρά που θεωρείται ως η καλύτερη για την εγκαθίδρυση των replicons είναι η Huh-7 (ηπατικής προέλευσης). Ακόμη, αναπτύχθηκαν παροδικά και μόνιμα HCV replicon RNAs που περιέχουν την πλήρους μήκους γονιδιωματική αλληλουχία του ιού παρουσία ή απουσία του γονιδίου αναφοράς της firefly λουσιφεράσης και παρουσία του γονιδίου της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης, αντίστοιχα [33, 67].



Εικ.6: Δομή υπογονιδιώματικών και πλήρους γονιδιώματος ρεπλικονίων

Ένα από τα μειονεκτήματα αυτού του συστήματος είναι η μικρή συχνότητα με την οποία τα RNA των ρεπλικονίων μπορούν να καθιερώσουν την αντιγραφή στα κύτταρα, οπότε δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης με στόχο τη μελέτη της αντιγραφής του ιικού RNA. Αυτή η χαμηλή συχνότητα καθιέρωσης οφείλεται στο χαμηλό ποσοστό των κυττάρων που είναι δεκτικά στον πληθυσμό των RNAs, αλλά και στην απαίτηση για προσαρμοστικές μεταλλάξεις, οι οποίες ενισχύουν την αντιγραφή του RNA στην κυτταροκαλλιέργεια (μέχρι και 10.000 φορές) και στην αλληλουχία του RNA των ρεπλικονίων, όσο και στην αντίστοιχη κυτταρική σειρά. Προσαρμοστικές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε όλη τη μη δομική περιοχή, συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών NS3, NS4B, NS5A και NS5B [110, 111].

Ωστόσο, η ανάπτυξη μολυσματικού HCV σε κυτταροκαλλιέργεια καθυστέρησε, διότι γονιδιώματα με προσαρμοστικές μεταλλάξεις αντιγράφονται με υψηλή απόδοση σε κύτταρα Huh-7, αλλά δεν υποστηρίζουν την έκκριση πρωτεΐνης core και HCV RNA, ενώ αντίθετα, πλήρους μήκους γονιδιώματα που δεν φέρουν προσαρμοστικές μεταλλάξεις αντιγράφονται σε χαμηλά επίπεδα, αλλά υποστηρίζουν την έκκριση πρωτεΐνης core και HCV RNA στο υλικό της κυτταροκαλλιέργειας. *In vivo* οι προσαρμοστικές στα κύτταρα μεταλλάξεις μειώνουν σημαντικά τη μολυσματικότητα των ικών σωματιδίων και τα κύτταρα Huh-7 πιθανά δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την συγκρότηση και την απελευθέρωση HCV σωματιδίων [111-113].

Μόλις το 2005 έγινε η ανάπτυξη του πρώτου αποδοτικού μολυσματικού HCV συστήματος, που συνίσταται από ιό στελέχους JFH-1 (γονότυπος 2a), το οποίο

απομονώθηκε από έναν ασθενή στην Ιαπωνία με οξεία ηπατίτιδα (JFH, Japan fulminant hepatitis), και την κυτταροσειρά Huh7.5, η οποία φέρει μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο dsRNA sensor retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I). Υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια που προκύπτουν από το JFH-1 cDNA δεν έχουν ανάγκη προσαρμοστικών μεταλλάξεων για αποδοτική αντιγραφή σε κυτταροκαλλιέργεια. Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό γιατί το συγκεκριμένο JFH-1 γονιδίωμα μπορεί να αντιγράφεται χωρίς προσαρμοστικές μεταλλάξεις ή πώς οι προσαρμοστικές μεταλλάξεις αποκλείουν την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι οι προσαρμοστικές στην κυτταροκαλλιέργεια μεταλλάξεις, που προάγουν την αποδοτική και εμμένουσα αντιγραφή, πιθανά στρέφουν την ισορροπία προς τη μετάφραση και την αντιγραφή σε βάρος της απελευθέρωσης του γονιδιωματικού RNA και της εγκαπιδίωσης, για τη συγκρότηση των ιικών σωματιδίων. Με την εισαγωγή του πλήρους μήκους RNA του JFH1 μέσω ηλεκτροδιάτρησης σε κύτταρα Huh7-Lunet (υποστηρίζουν υψηλά επίπεδα ιικής RNA αντιγραφής), παράγονται ιικά σωματίδια σε υψηλούς τίτλους, ικανούς να μολύνουν αποδοτικά τα ηπατοκαρκινικά κύτταρα Huh7.5 [114-118].

Τέλος, εκτός από την μελέτη μόλυνσης κυτταρικών σειρών χρησιμοποιούνται και συστήματα μελέτης σε μοντέλα ζώων. Δύο νέα μοντέλα ζώων για τη μελέτη του HCV, όμως όχι ευρέως χρησιμοποιούμενα, είναι τα διαγονιδιακά και τα χιμαιρικά ποντίκια [118, 119].

A.5. ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ HCV

Ο απότερος στόχος των θεραπειών κατά της χρόνιας λοίμωξης με τον HCV είναι να εμφανίζουν μακροπρόθεσμα ιική εξάλειψη, μια κατάσταση που περιγράφεται καλύτερα με τον όρο παρατεταμένη ιολογική ανταπόκριση (Sustained Virological Response, SVR ή SVR24), η οποία ορίζεται ως μη ανιχνεύσιμο HCV RNA στο αίμα του ασθενούς 24 εβδομάδες μετά από τη λήξη της θεραπείας.

Ωστόσο, η θεραπεία και η εξάλειψη του HCV σε χρονίως μολυσμένα άτομα παραμένουν μια πρόκληση, καθώς και το ποσοστό των SVR εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων, συμπεριλαμβανοντας τον ιικό γονότυπο, την ηλικία του ασθενούς, το φύλο, τη φυλή, γενετικούς παράγοντες, το στάδιο της ίνωσης και τη συνυπάρχουσα μόλυνση με HIV [120-124]. Παρόλο που η μέχρι πρόσφατα καθιερωμένη θεραπεία με πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη-άλφα (PEG-IFN- α) και ριμπαβιρίνη (RBV) για 24 εβδομάδες παράγει ένα SVR 75% ή περισσότερο σε ασθενείς μολυσμένους με γονότυπους 2 και 3, τα ποσοστά SVR για όσους έχουν μολυνθεί με γονότυπο 1 είναι μόνο 40-50%, παρά τη μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας (48 εβδομάδες) [125, 126]. Η πεγκυλιωμένη-IFN δεν στοχεύει απευθείας τον ιό HCV, αλλά ενεργοποιεί ανοσολογικούς μηχανισμούς με στόχο την εξάλειψή του, παράγοντας όπως μια σωρεία δυσμενών παρενεργειών. Μάλιστα ο προσδιορισμός της πιθανότητας απόκρισης σε θεραπεία με

ιντερφερόνη και της απαιτούμενης διάρκειας μιας τέτοιας θεραπείας εξαρτάται από το είδος του γονότυπου με τους 1 και 4 να είναι λιγότερο δεκτικοί σε ιντερφερόνη από ότι οι άλλοι γονότυποι (2, 3, 5 και 6) [127, 128]. Έτσι οι νεότεροι στόχοι όσον αφορά τη θεραπεία του HCV είναι να βρεθεί μία θεραπευτική αγωγή βραχείας διάρκειας, με δοσολογία μία φορά την ημέρα, χωρίς συμμετοχή ιντερφερόνης, με χορήγηση μέσω στόματος, με εξαιρετικά ποσοστά ανταπόκρισης και με ελάχιστη εμφάνιση τοξικότητας, αν όχι ανύπαρκτη. Σε αυτές τις θεραπείες συμπεριλαμβάνονται φάρμακα με ειδικούς ιικούς στόχους που απαιτούνται για την αντιγραφή του ιού (direct-acting antivirals, DAAs). Αυτή τη στιγμή είναι διαθέσιμες δια του στόματος αντι-ιικές αγωγές που δεν περιλαμβάνουν ιντερφερόνη για όλους τους γονότυπους (π.χ. Elbasvir-Grazoprevir για τους γονότυπους 1 και 4). Ωστόσο η θεραπεία ασθενών μολυσμένων με τον γονότυπο 3 και με κίρρωση περιλαμβάνει ακόμα και μέχρι σήμερα χορήγηση και ιντερφερόνης [129]. Ελπιδοφόρες προς την κατεύθυνση αυτή, θεραπείας δηλαδή χωρίς ιντερφερόνη ακόμα και για τον γονότυπο 3 αποτελούν δύο πρόσφατοι συνδυασμοί. Ο συνδυασμός sofosbuvir με τον NS5A αναστολέα velpatasvir, είναι αποτελεσματικός κατά όλων των γονότυπων πετυχαίνοντας έως και 99% παρατεταμένη ιολογική απόκριση (SVR). Ωστόσο αναφέρθηκαν 47 ανεπιθυμητες παρενέργειες μικρής όμως σημασίας [130-132]. Ο συνδυασμός BT-493 και ABT-530 είναι αποτελεσματικός έναντι όλων των γονότυπων ακόμα και του 3 με SVR 96 - 100% για τον γονότυπο 2. Για τον συνδυασμό αυτό δοκιμές φάσης 3 βρίσκονται σε εξέλιξη.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από τα DAAs, μελετούνται και αναστολείς που στοχεύουν κυτταρικούς παράγοντες, όπως η κυκλοφιλίνη ή το miR122, προσφέροντας εναλλακτικές όσον αφορά τις θεραπείες έναντι του HCV [133].

ΜΕΡΟΣ Β : Ο ΙΟΣ ΤΟΥ ΔΑΓΚΕΙΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ (DENV)

B.1.ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο ιός του δάγκειου πυρετού (DENV) ανήκει στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Το γένος *Flavivirus* αποτελείται από πάνω από 70 ιούς που κυρίως μεταδίδονται από κουνούπια ή τσιμπούρια. Μεταξύ αυτών ανήκουν και οι West Nile virus (WNV), Japanese encephalitis virus (JEV), Zika virus (ZIKV), Tick-borne encephalitis virus (TBEV), Yellow fever virus (YFV). Οι ιοί αυτοί είναι ενδημικοί σε πολλές περιοχές του κόσμου και χιλιάδες ζωές χάνονται κατά τη διάρκεια επαναλαμβανόμενων κρουσμάτων. Λόγω της παγκοσμιοποίησης και των βαθμιαίων αλλαγών του κλίματος, οι ιοί

εμφανίζονται σε νέες γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς, κι ως εκ τούτου υπάρχει επείγουσα ανάγκη να βρεθούν νέα φάρμακα για την καταπολέμηση αυτών των αναδυόμενων απειλών.

B.1.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι πρώτες επιδημίες δάγκειου πυρετού, συνέβησαν μεταξύ 1779-1780 στην Ασία, την Αφρική και τη Βόρεια Αμερική, γεγονός που υποδηλώνει ότι το έντομο - φορέας είχε εξαπλωθεί ήδη πριν από το δέκατο όγδοο αιώνα [134]. Η ιική αιτιολογία και η μετάδοση μέσω του κουνουπιού δείχθηκαν το 1907, ενώ μέχρι τον Β' Παγκόσμιο πόλεμο απομονώθηκαν οι δύο πρώτοι ορότυποι, γεγονός που ακολουθήθηκε από την απομόνωση των δύο υπόλοιπων ορότυπων το 1954 [135-137]. Σημαντικές οικολογικές και δημογραφικές αλλαγές που προκλήθηκαν από τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο διευκόλυναν την εξάπλωση τόσο του κουνουπιού-φορέα όσο και του ιού στην περιοχή της Ασίας – Ειρηνικού [138]. Η ανεξέλεγκτη αστικοποίηση, τα ανεπαρκή απόβλητα, η κακή διαχείριση των αποχετεύσεων, καθώς και η έλλειψη ελέγχου του φορέα οδήγησε τελικά σε μια τεράστια αύξηση της επιδημίας και την εμφάνιση του DHF (dengue hemorrhagic fever). Σήμερα, οι ασιατικές χώρες με το μεγαλύτερο αριθμό των περιπτώσεων δάγκειου πυρετού είναι οι Φιλιππίνες, η Ταϊλάνδη, το Βιετνάμ και η Κίνα. Η τρέχουσα επιδημιολογική κατάσταση δάγκειου στην Αμερική είναι επίσης ανησυχητική, ενώ στην Ευρώπη τα πρώτα κρούσματα λοίμωξης παρατηρήθηκαν στη Γαλλία και Κροατία το 2010, που μεταδόθηκε από το *Aedes albopictus*. Η ανθεκτικότητα των αυγών του είδους αυτού σε χαμηλές θερμοκρασίες συνέβαλλε στην εξάπλωσή του στις ευρωπαϊκές χώρες.

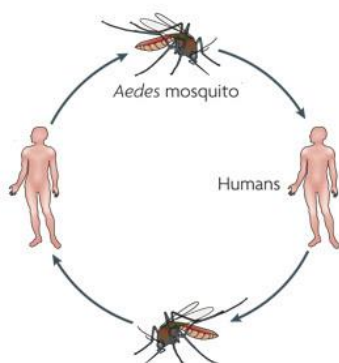
B.1.2 Κλινική Εικόνα - Τρόποι μετάδοσης

Μόλυνση από τον ιό του δάγκειου πυρετού (DENV) μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των δύο σαφώς καθορισμένων συνδρόμων, δάγκειου πυρετού (DF) και σύνδρομο αιμορραγικού πυρετού/δάγκειου κλονισμού (DHF/DSS), και μια σειρά από ενδιάμεσες αντιδράσεις ή ακόμα και καμία κλινική απόκριση. Τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως 24-48 ώρες μετά την ιαμμία που προκαλείται από την μεταφορά του ιού στους λεμφαδένες. Η πιο συχνά αναφερόμενη συμπτωματική έκβαση της λοίμωξης είναι το DF σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από αιφνίδια έναρξη πυρετού και μια ποικιλία από μη ειδικά συμπτώματα όπως κεφαλαλγία, μυαλγία, πόνους στο σώμα, οπισθοκογχικό πόνο, εξανθήματα και πόνους στις αρθρώσεις [139]. Η ασθένεια είναι γενικά αυτοπεριοριζόμενη με την οξεία φάση να διαρκεί έως 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από μία φάση ανάρρωσης που εκτείνεται σε αρκετές εβδομάδες. Ορισμένες εκτιμήσεις δείχνουν ότι μεταξύ 1%

και 70% των ασθενών που πάσχουν από λοίμωξη DENV έχουν ήπιες αιμορραγικές εκδηλώσεις (πετέχειες, πορφύρα, εκχυμώσεις, και επίσταξη) [140]. Σε έως και 2% των περιπτώσεων (κυρίως σε παιδιά κάτω των την ηλικία των 15) [141], η ασθένεια μπορεί να εξελιχθεί σε DHF, ένα πιο σοβαρό και απειλητικό για τη ζωή σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από ηπατική βλάβη, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα, θρομβοπενία και αιμορραγικές εκδηλώσεις στο δέρμα, τη μύτη, τα ούλα και το γαστρεντερικό σωλήνα [141, 142]. Το DSS σύνδρομο, η πιο σοβαρή μορφή της DHF, χαρακτηρίζεται από αδύναμο σφυγμό και απότομη πτώση της αρτηριακής πίεσης, η οποία είναι το αποτέλεσμα της κατάρρευσης του αγγειακού συστήματος λόγω της μείωσης του όγκου του αίματος που προκαλείται από διαρροή των αγγείων [143].

Η μόλυνση με έναν ετερόλογο ορότυπο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη σοβαρής μορφής της νόσου. Υποστηρίζεται ότι αυτό οφείλεται στην εξαρτώμενη από αντίσωμα ενίσχυση (ADE) [144]. Έτσι, τα αντισώματα από μια πρωτογενή λοίμωξη αντιδρούν με άλλους ορότυπους του DENV, αλλά δεν εξουδετερώνουν τη μόλυνση και αντιθέτως οδηγούν στην αύξηση της αντιγραφής του ιού και της απελευθέρωσης κυτοκινών. Αυτές φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ανοσοπαθογένεια του DENV που οδηγούν από προφλεγμονώδεις αντιδράσεις στην αύξηση της διαπερατότητας των τριχοειδών [145]. Ωστόσο υποστηρίζεται πως παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες, όπως η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, η λοιμογόνος δράση του ιού και γενετικοί παράγοντες [146], [147], [139].

Ο DENV μεταδίδεται στον άνθρωπο από το τσίμπημα μολυσμένων κουνουπιών του γένους *Aedes*, το οποίο περιλαμβάνει μια σειρά από είδη κουνουπιών. Από τα είδη αυτά, ο κύριος φορέας του ιού του δάγκειου πυρετού είναι το είδος *Aedes aegypti*. Ο ιός του δάγκειου πυρετού μεταδίδεται μέσω ενός κύκλου μετάδοσης που ακολουθεί την πορεία από άνθρωπο - σε κουνούπι - σε άνθρωπο [148].



Εικ.7: Κύκλος μετάδοσης του ιού του δάγκειου πυρετού[149].

B.1.3 Πρόληψη – Διάγνωση

Προσπάθειες για την ανάπτυξη εμβολίων άρχισαν περίπου πριν από 90 χρόνια, αλλά η πρόοδος μέχρι στιγμής, ήταν περιορισμένη. Ένα σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη εμβολίου είναι ότι τα εμβόλια θα πρέπει να οδηγούν σε ανοσολογική απόκριση έναντι και των τεσσάρων ορότυπων του DENV, να είναι δηλαδή τετραδύναμα. Εάν η προστασία έναντι ενός ή περισσοτέρων ορότυπων παραμείνει ανεπαρκής, τότε η μόλυνση με έναν από αυτούς τους ορότυπους μπορεί να οδηγήσει σε επιδεινωμένη ασθένεια στα "εμβολιασμένα" άτομα, λόγω της εξαρτώμενης από αντίσωμα ενίσχυση (ADE). Πρόσφατα δημοσιευμένες φάσης τρία κλινικές δοκιμές ενός τετραδύναμου εμβολίου δάγκειου είχαν ανάμεικτα αποτελέσματα [150]. Ένα μερικώς αποτελεσματικό τετραδύναμο εμβόλιο εγκρίθηκε το 2016 σε Φιλιππίνες και Ινδονησία και είναι πλέον εγκεκριμένο και σε άλλες χώρες (Μεξικό, Βραζιλία, Παραγουάη, Ελ Σαλβαδόρ και Κόστα Ρίκα) [151]. Το εμβόλιο αυτό είναι ένα ζωντανό εξασθενημένο τετραδύναμο εμβόλιο που βασίζεται στο 17D εμβόλιο του YF. Μέσω τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες prM και E του στελέχους 17D αντικαταστάθηκαν με εκείνα των τεσσάρων ορότυπων του DENV [152, 153]. Χορηγείται υποδοριώς σε τρεις δόσεις και ανά έξι μήνες. Παρουσιάζει χαμηλότερο ηπατοτροπισμό και νευρομολυσματικότητα από το 17D εμβόλιο. Μάλιστα, ενώ μερικές μέρες μετά την πρώτη δόση μπορεί να παρουσιαστεί ιαιμία στα άτομα που εμβολιάστηκαν, δεν μπορούν να μολυνθούν κουνούπια-φορείς και να μεταδώσουν τον ανασυνδυασμένο ιό [154, 155].

Επίσης η πρόληψη για την ασθένεια αφορά την αποφυγή τσιμπήματος από κουνούπια-φορείς, μέσω κοινών πρακτικών όπως κουνουποκτόνα, και τη χρήση χημικών εντομοκτόνων ενδείκνυνται σε περιόδους επιδημίας, καθώς υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κουνουπιών έναντι των εντομοκτόνων.

Οι μέθοδοι διάγνωσης του DENV περιλαμβάνουν:

Απομόνωση του ιού: Ο ορός χρησιμοποιείται συχνά για την απομόνωση του ιού από το πλάσμα, τα λευκοκύτταρα, το πλήρες αίμα και τους ιστούς που λαμβάνονται κατά την αυτοψία. [156], [157]. Μετά το πέρας μιας περιόδου επώασης προκειμένου ο ιός να πολλαπλασιαστεί, ο ιός ανιχνεύεται με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα με ανοσοφθορισμό και αναλύσεις PCR [158].

Ορολογικές δοκιμές: Είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος, ως πιο οικονομική. Χρησιμοποιείται για την διάγνωση πρωτογενούς αλλά και δευτερογενούς λοίμωξης από διαφορετικούς ορότυπους του ιού. Βασίζεται στην εξής θεώρηση: Όταν συμβαίνει μια μόλυνση σε άτομα που έχουν βιώσει μια προηγούμενη μόλυνση από διαφορετικό ορότυπο του ιού, λαμβάνει χώρα μια δευτερεύουσα ανοσολογική απάντηση, η οποία δημιουργεί υψηλά επίπεδα IgG

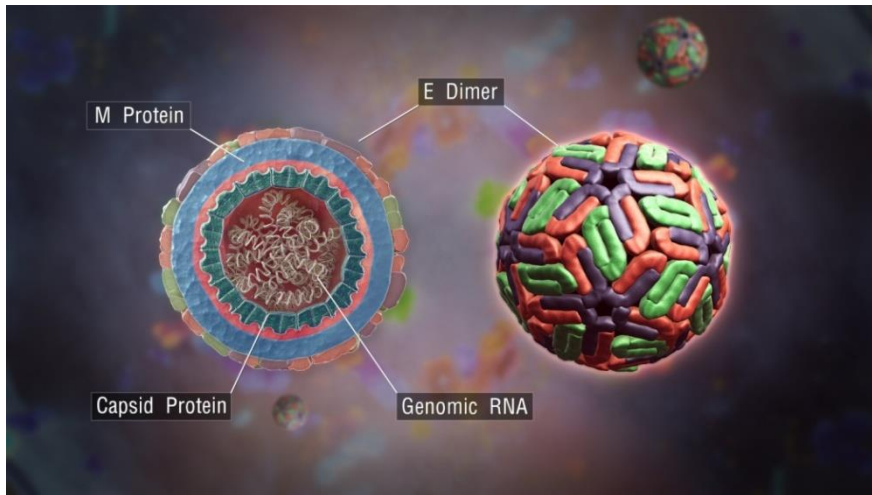
μέσω της διέγερσης των B κυττάρων μνήμης (από την προηγούμενη μόλυνση) καθώς και παραγωγή IgM λόγω απόκρισης στην τρέχουσα λοίμωξη. Επειδή υψηλά επίπεδα IgG ανταγωνίζονται με IgM για την πρόσδεση αντιγόνου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δοκιμασία σύλληψης IgM. Η τεχνική που ευρέως χρησιμοποιείται είναι η MAC-ELISA. Επίσης χρησιμοποιείται ένα μίγμα τεσσάρων αντιγόνων του ιού [159].

Δοκιμασίες ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων: Περιλαμβάνει τεχνικές όπως τις reverse transcription (RT)-PCR και real-time RT-PCR. Με την πρώτη δοκιμασία στοχεύονται διαφορετικά γονίδια και χρησιμοποιούνται διαφορετικές διαδικασίες ενίσχυσης. Τα προϊόντα αυτών των αντιδράσεων διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, η οποία επιτρέπει στους ορότυπους του δάγκειου να διαφοροποιούνται βάσει του μεγέθους τους. Η δεύτερη δοκιμασία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του ιού. Μπορεί να προσδιορίσει έναν ή πολλαπλούς ορότυπους ανά αντίδραση [160].

B2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ DENV

B.2.1. Δομή

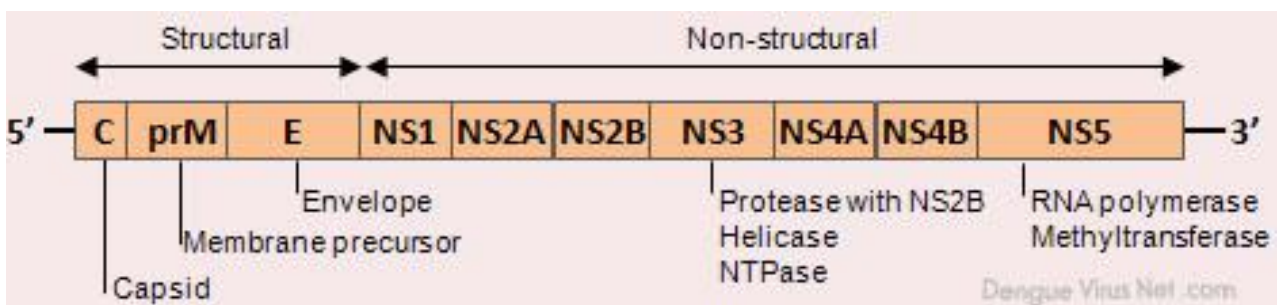
Το σωματίδιο του DENV αποτελείται από ένα εσωτερικό νουκλεοκαψίδιο με εικοσαεδρική συμμετρία μεγέθους 50 nm το οποίο σε εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει τη μορφή ηλεκτρονιόπυκνου πυρήνα. Το νουκλεοκαψίδιο περιέχει ένα μονό αντίγραφο του RNA γονιδιώματος, (+)ssRNA, το οποίο συνδέεται με 180 αντίγραφα της πρωτεΐνης του καψιδίου (μοριακό βάρος 12 kDa) [161] και περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα που περιέχει 180 αντίγραφα της E (53 kDa) και prM (9 kDa) πρωτεΐνης, σχηματίζοντας έτσι ένα λείο εξωτερικό λιποπρωτεϊνικό κέλυφος. Η λιπιδική διπλοστιβάδα σε εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει μορφή μιας σχετικά λείας επιφάνειας με διάμετρο περίπου 500 Å.



Εικ.8: Δομή του ιικού σωματιδίου του DENV [162].

B.2.2. Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του ιού είναι ένα (+)ssRNA, με μήκος περίπου 10.7 kb. Κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται από πρωτεάσες του ξενιστή (φουρίνη, σηματούση) και από ιογενείς πρωτεάσες στις μη δομικές (NS) και δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια συναρμολογούνται για να σχηματίσουν νέα ιικά σωματίδια. Οι δομικές πρωτεΐνες του DENV βρίσκονται στο N-τελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες φακέλου (E), καψιδίου (C), και την πρόδρομο πρωτεΐνη της μεμβράνης (prM). Προς το καρβοξυτελικό άκρο, ακολουθούν οι μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες αριθμούνται σύμφωνα με τη θέση τους εντός της πολυπρωτεΐνης (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Επίσης το γονιδίωμα περιλαμβάνει σύντομες μη μεταφραζόμενες περιοχές των 5' και 3' άκρων.



Εικ.9: Δομή του γονιδιώματος του ιού με τα δομικά και μη δομικά γονίδια [163].

Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή έχει μήκος 100 νουκλεοτιδίων (nts) και διαθέτει δομή καπέλου. Στο 5' άκρο σχηματίζονται δύο δευτεροταγείς δομές, οι SLA (stem-loop A) και SLB (stem-loop B), που διαχωρίζονται από μια poly-U αλληλουχία. Η πρώτη είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και την έναρξη της σύνθεσης του ιικού RNA από το 3' άκρο του θετικής πολικότητας κλώνου RNA [164], παρέχοντας την απαραίτητη αλληλουχία για την πρόσδεση της NS5 πρωτεΐνης [165]. Η δεύτερη δομή είναι απαραίτητη για τις RNA-RNA αλληλεπιδράσεις μεγάλης κλίμακας (5' με 3' αλληλεπίδραση), μέσω της ανάρρους AUG περιοχής (AUG upstream region, AUR) που περιέχει [166]. Άλλα δύο cis δρώντα στοιχεία, τα CS και CCR1 επηρεάζουν την ιική αντιγραφή, επιδρώντας στη δομή του 5' άκρου και την σύνθεση του ιικού σωματιδίου αντίστοιχα [167], [168].

Η 3' αμετάφραστη περιοχή έχει μήκος 450 nts στερείται poly-A ουράς. Είναι ένα εξαιρετικά δομημένο στοιχείο RNA [169], [170], που μπορεί να χωριστεί σε τρεις περιοχές. Η περιοχή I αμέσως μετά την κωδική αλληλουχία είναι το πιο μεταβλητό μέρος του 3'-UTR με μεγάλες διακυμάνσεις του μεγέθους της μεταξύ των διαφόρων ορότυπων. Η περιοχή II περιέχει δύο διαδοχικά επαναλαμβανόμενες δομές αλτήρα (DB1 και DB2) που φέρουν συντηρητικές αλληλουχίες CS2 και RCS2 [171], οι οποίες μέσω δημιουργίας δομών ψευδοκόμπου ρυθμίζουν την αντιγραφή και τη μετάφραση [172]. Η περιοχή III περιέχει την πολύ συντηρημένη CS1 αλληλουχία που συμβάλει στην κυκλοποίηση του RNA κατά την αντιγραφή, [173] και την 3'-SL. Και οι δύο αλληλουχίες είναι απολύτως απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού RNA.

Και τα δύο άκρα είναι απαραίτητα για την μετάφραση του ιού και αλληλεπιδρούν εκτεταμένα για το σχηματισμό δευτερογενών δομών απαραίτητων για την αντιγραφή του ιικού RNA.

Ειδικές δομές στο 3' άκρο του ιικού γονιδιώματος του δάγγειου ιού υπηρετούν αναγκαίους ρόλους στη ιική αντιγραφή, ειδικά η τελική stem-loop δομή (3' SL). Η σημασία της 3' SL για τον δάγγειο και άλλους φλαβοϊούς υποστηρίζεται από πληθώρα πειραματικών αποδείξεων [174, 175]. Εκτός από το ιικό γονιδίωμα (gRNA), μία μάζα υπογενωμικών RNA από το 3' UTR έχουν βρεθεί σε μολυσμένα κύτταρα με DENV [176]. Το μικρό μη κωδικό RNA είναι μοναδικό χαρακτηριστικό του γένους Flavivirus και πιθανά να έχει σημαντική επίδραση στην αλληλεπίδραση ιού ξενιστή στον ιικό κυτταρικό κύκλο. [177] Ο μηχανισμός παραγωγής αυτού του μικρού μη κωδικού RNA και η λειτουργία του στον κύκλο ζωής του DENV παραμένουν άγνωστα [177].

B.2.3 . Ιικές πρωτεΐνες

capsid protein (C): Είναι μία μικρή άκρως βασική πρωτεΐνη, που μαζί με το γονιδίωμα του ιού αποτελεί το νουκλεοκαψίδιο. Σχηματίζει ομοδιμερή με κάθε υπομονάδα να περιλαμβάνει τέσσερις α έλικες [178]. Τα διμερή έχουν ασύμμετρη κατανομή των φορτισμένων καταλοίπων τους (NMR analysis). Τα μισά από τα βασικά κατάλοιπα εντοπίζονται στην μια πλευρά των διμερών, γεγονός που επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με το ιικό RNA, ενώ τα υδρόφοβα κατάλοιπα σχηματίζουν μια μη πολική επιφάνεια επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τις μεμβράνες [179]. Η πρωτεΐνη του καψιδίου δεσμεύεται με το ιικό RNA με υψηλή συγγένεια και έχει δραστικότητα chaperone RNA [180].

prM: Συντελεί μια σημαντική ρυθμιστική λειτουργία κατά την είσοδο, συναρμολόγηση και έξοδο του ιού. Η ώριμη πρωτεΐνη M έχει μια N-τελική περιοχή δομής α -έλικας (MH) και δύο διαμεμβρανικές περιοχές (MT1 και MT2) στην C-τελική περιοχή [181]. Συντίθεται στο ER και μπορεί να εκκρίνεται ως σύμπλοκο ολιγομερών στο εξωκυττάριο περιβάλλον ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [182]. Στο ER αλληλεπιδρά με την E πρωτεΐνη προς σχηματισμό ετεροδιμερών, πλεγμάτων στη συνέχεια και εν τέλει στο σχηματισμό ανώριμων ιικών σωματίων [183]. Η ωρίμανση της πρόδρομης prM, στο διαλυτό pr πεπτιδίο και στην μεμβρανοσυνδεδεμένη ώριμη M πρωτεΐνη, γίνεται κατά τη μεταφορά των ιικών σωματιδίων μέσω του trans-Golgi στην πολύ συντηρητική περιοχή RR(D/E)KR [184], [185] μέσω της φουρίνης.

E protein: Είναι μεμβρανοσυνδεδεμένη 56 kDa πρωτεΐνη, που εμπλέκεται στην μορφογένεση του ιικού σωματιδίου, την σύνδεση με τον υποδοχέα, και τη σύντηξη μεμβρανών. Η E βρίσκεται ως διμερές στον φάκελο του DENV πριν την σύντηξη ενώ ως τριμερές κατά την σύντηξη για την είσοδο του ιικού σωματιδίου στο κύτταρο-ξενιστή. Το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τρεις τομείς (DI, DII και DIII) που περιέχουν πολλούς β -κλώνους. Ειδικά για τον τομέα DII, φέρει στο άκρο του έναν υδρόφοβο βρόγχο σύντηξης ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αγκυροβόληση του ιικού σωματιδίου στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή [186]. Το C-τελικό άκρο έχει μία περιοχή άγκυρας που περιέχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές και είναι υπεύθυνες για την αγκυροβόληση της E στην ιική μεμβράνη και μια περιοχή στελέχους. Το στέλεχος περιέχει δύο α -έλικες και συνδέει την διαμεμβρανική άγκυρα με τον βρόγχο σύντηξης του τομέα DII. Η περιοχή στελέχους παίζει σημαντικό ρόλο στον ετεροδιμερισμό της prM και τη δέσμευση του ιού στην κυτταρική μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης στο τριμερές που τελικά επηρεάζουν τη συναρμολόγηση του ιού, την μολυσματικότητα και τις ιδιότητες εισόδου [187].

NS1: Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 46 kDa απαραίτητη για την ιική αντιγραφή. Εντοπίζεται στον αυλό του ER και εκκρίνεται ως ένα ολιγομερές σύμπλοκο. Τα 24 αμινοξέα που προηγούνται της NS1 αρκούν ως σήματα πεπτιδικής εισόδου στον αυλό του ER και πεπτιδικής ωρίμανσης και διαχωρισμού από την E

πρωτεΐνη [188], ενώ ένα οκταπεπτίδιο στο C-τελικό της άκρο είναι απαραίτητο για τον διαχωρισμό των NS1-2A [189]. Έχει δύο θέσεις γλυκοζυλίωσης (N130 και N207), απαραίτητες για την αποτελεσματική έκκριση και ανιχνεύεται ως εξαμερές που αποτελείται από τρία ομοδιμερή. Το κάθε εξαμερές σχηματίζει μια δομή κοίλου βαρελιού, το κεντρικό κανάλι του οποίου καταλαμβάνεται από λιπίδια [190]. Η σύνθεση των λιπιδίων αυτών μοιάζει με εκείνη των κυτταρικών λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL), και όταν ανασταλεί το μονοπάτι σύνθεσής τους μειώνεται και η έκκριση της NS1. Το γεγονός αυτό δείχνει ένα σημαντικό ρόλο των λιπιδίων του ξενιστή στην έκκριση της NS1 [190].

NS2A: Είναι ενσωματωμένη πρωτεΐνη στη μεμβράνη (22 kDa) και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού RNA. Η NS2A περιέχει πέντε διαμεμβρανικές έλικες με το N-άκρο στον αυλό του ER και του C-τελικό άκρο στο κυτταρόπλασμα [191].

NS2B: Είναι μια μεμβρανοσυνδεδεμένη 14 kDa πρωτεΐνη, απαραίτητη ως συμπαράγοντας της NS3 πρωτεάσης/ελικάσης, την οποία στρατολογεί στην μεμβράνη. Διαθέτει δύο διαμεμβρανικές έλικες στην N-τελική περιοχή που ακολουθείται από ένα υδρόφιλο κυτταροπλασματικό τομέα και μια C-τελική μεμβρανοσυνδεδεμένη περιοχή [192].

NS3: Είναι μια πολυλειτουργική μεμβρανοσυνδεδεμένη (λόγω της NS2B) πρωτεΐνη (69 kDa) που περιέχει μια αμινοτελική επικράτεια πρωτεάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή που έχει λειτουργικότητα NTPάσης, RTPase και ελικάσης [193-196]. Η περιοχή με λειτουργικότητα πρωτεάσης βρίσκεται κάτω από τη θέση πρόσδεσης του ATP της ελικάσης [197]. Πολλά κατάλοιπα εντός της NS2B [198] και της NS3 βρέθηκαν να είναι κρίσιμα για την δραστικότητα πρωτεάσης και την ειδικότητα υποστρώματος [199-201]. Η επικράτεια πρωτεάσης είναι υπεύθυνη επίσης για την απελευθέρωση των NS4A, NS4B, και NS5 από την πολυπρωτεΐνη και αλληλεπιδρά με τη συνθάση λιπαρών οξέων, γεγονός που ενισχύει τη δραστικότητα της [202]. Η NS5 ρυθμίζει τη δραστικότητα NTPάσης της NS3 μέσω υδρόλυσης του ATP [194]. Η δραστικότητα RTPάσης, είναι απαραίτητη για την αφαίρεση του γ-φωσφορικού του 5'-τριφωφορυλιωμένου RNA κατά την προσθήκη του 5' cap [203], [204]. Η δραστικότητα ελικάσης είναι εξαρτώμενη από δισθενή κατιόντα και ATP [193, 195]. Απαιτεί μόνο ένα ελεύθερο 3' άκρο RNA [205].

NS4A: Αποτελεί ενσωματωμένο συστατικό της πρωτεϊνικής μεμβράνης, μεγέθους 16 kDa και συνεντοπίζεται με την NS3 και ιικά dsRNA σε διακριτές κυτταροπλασματικές εστίες, που πιθανώς περιέχουν σύμπλοκα ιικής αντιγραφής. Παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό κυστιδίων αντιγραφής [206]. Περιέχει τρεις περιοχές α-έλικας, οι δύο εκ των οποίων βρίσκονται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα, όπου και καλύπτουν τη

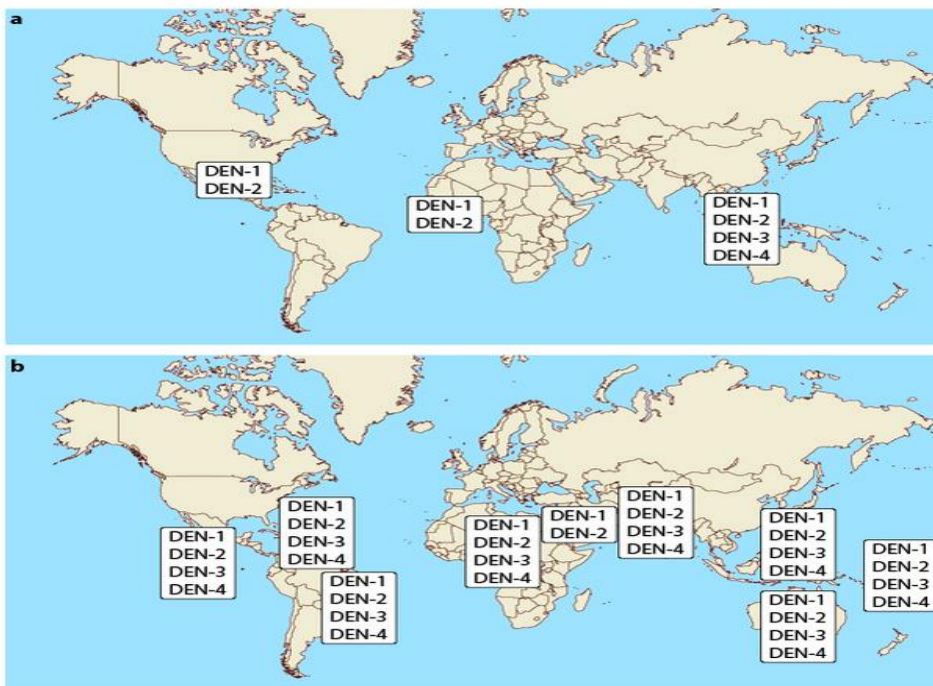
μεμβράνη ενώ οι α-έλικες ασκούν πίεση με τέτοιο τρόπο ώστε να αλληλεπιδρούν πλευρικά με το ER της λιπιδικής διπλοστιβάδας [206].

NS4B: Η πρόδρομος μορφή της πρωτεΐνης (30 kDa) μέσω πρωτεολυτικής ωρίμανσης, που καταλύεται από την ιική NS3 πρωτεάση [200] και από την σηματοδότηση (πρωτεάση του ξενιστή), παράγει την ώριμη NS4B με φαινομενικό μοριακό βάρος 28 kDa [207]. Συνεντοπίζεται με την NS3 και ιικά dsRNA σε θέσεις ιικής αντιγραφής του ER. Περιλαμβάνει τρία διαμεμβρανικά τμήματα όπως και τμήματα στον αυλό του ER και κυτταροπλασματικά αμινοτελικά και καρβοξυτελικά τμήματα [208]. Αλληλεπιδρά με την ελικάση NS3 ενισχύοντας την ενεργότητά της και παίζει ρόλο στην εκδήλωση παθογένειας του ιού [209].

NS5: Είναι η μεγαλύτερη (105 kDa) και η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη του DENV. Εμπλέκεται στη σύνθεση του RNA του ιού και αναστέλλει το μονοπάτι της εξαρτώμενης από ιντερφερόνη-α (IFN- α) μεταγωγής σήματος κατά την μόλυνση [210]. Η αμινοτελική περιοχή της NS5 περιέχει ενεργότητες μεθυλοτρανσφεράσης (MTase) [211] και γουανυλιοτρανσφεράσης (GTase) [212], ενώ η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει ενεργότητα RdRp [210]. Εντοπίζεται σε μεμβρανο-συνδεδεμένα σύμπλοκα του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων και φαίνεται να μετακινείται μεταξύ των δύο αυτών διαμερισμάτων [213, 214]. Επάγει την έκκριση της IL-8, μιας προφλεγμονώδους κυτοκίνης που εμπλέκεται στην χημειοταξία [215]. Αλληλεπιδρά με την NS3 [216, 217], μέσω ενός μηχανισμού που καθορίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της NS5 [216]. Η φωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιείται από την κινάση PKG και είναι σημαντική για την ιική αντιγραφή [218]. Η αλληλεπίδραση NS3-NS5 ενισχύει τις δραστηριότητες NTPάσης και RTPase της NS3 [194, 219]. Τα υψηλά επίπεδα της πυρηνικής NS5 δεν είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιού σε καλλιέργεια κυττάρων [213]. Η MTase αποτελείται από τρεις υποπεριοχές. Η πρώτη (αμινοτελική περιοχή) φέρει τη θέση πρόσδεσης GTP, που προσδένει την γουανοσίνη της cap δομής, ενώ η δεύτερη, η υποπεριοχή του πυρήνα, περιέχει την καταλυτική δραστηριότητα και τη λειτουργία πρόσδεσης της S-αδενοσυλο-μεθειονίνης (S-Adenosyl methionine, SAM). Η SAM χρησιμοποιείται ως δότης μεθυλομάδων κατά την μεθυλίωση της δομής του καπέλου (cap) αλλά και τις μεθυλιώσεις σε εσωτερικές θέσεις. Τέλος η τρίτη υποπεριοχή περιλαμβάνει την συνδετική αλληλουχία μεταξύ των δύο προηγούμενων υποπεριοχών που συνδέει το ιικό RNA. Η λειτουργικότητα μεθυλάσης (MTase) [220] και γουανυλιοτρανσφεράσης (GTPase) [212] που διαθέτει είναι απαραίτητες για την δημιουργία του 5' cap (τύπος I: m⁷GpppAmG). Η δομή της RdRp του DENV έχει την κλασική δομή δεξιού χεριού, με περιοχές παλάμης, δαχτύλων και αντίχειρα [221, 222].

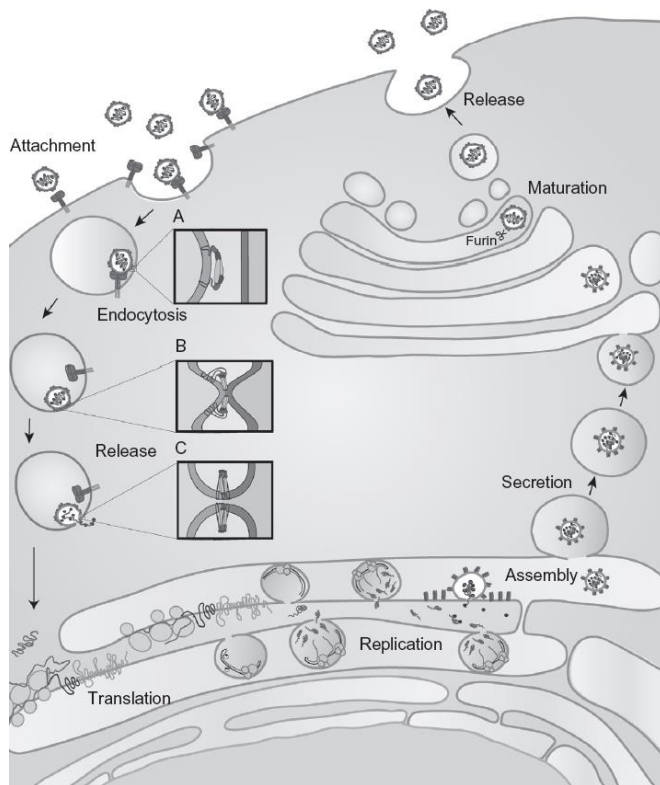
B.2.4. Ορότυποι

Οι μολύνσεις από δάγκειο πυρετό προκαλούνται από τέσσερις ιούς που ονομάζονται DEN-1, DEN-2, DEN-3, και DEN-4. Αυτοί οι ιοί καλούνται ορότυποι γιατί παρουσιάζουν διαφορετική αλληλεπίδραση με τα αντισώματα του ορού του ανθρώπινου αίματος. Οι τέσσερις αυτοί ορότυποι έχουν κοινό το 65% του γονιδιώματός τους, αλλά εντός κάθε ορότυπου υπάρχει ποικιλομορφία. Παρά τις διαφορές τους προκαλούν την ίδια ασθένεια αποκλίνοντας στα συμπτώματα. Στη δεκαετία του 1970, τόσο ο DEN-1 όσο και ο DEN-2 βρέθηκαν στην Κεντρική Αμερική και την Αφρική, ενώ και οι τέσσερις ορότυποι ήταν παρόντες στη Νοτιοανατολική Ασία. Μέχρι το 2004, ωστόσο, η γεωγραφική κατανομή των τεσσάρων ορότυπων είχε διευρυνθεί. Τώρα όλοι οι τέσσερις ορότυποι περικυκλώνουν τροπικές και υποτροπικές περιοχές σε όλο τον κόσμο. Οι επιστήμονες υποθέτουν ότι ο ιός του δάγκειου πυρετού εξελίχθηκε σε μη ανθρώπινα πρωτεύοντα θηλαστικά και μεταδόθηκε από αυτά στον άνθρωπο στην Αφρική ή τη Νοτιοανατολική Ασία 500-1.000 χρόνια πριν. [223, 224].



Εικ.10: Η κατανομή των ορότυπων του δάγκειου πυρετού το 1970 (α) και το 2004 (β) [225].

B.3. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ



Εικ.11: Κύκλος ζωής του ιού του δάγκειου πυρετού [226].

Οι πρωτογενείς στόχοι της ιικής μόλυνσης σε ανθρώπους και μοντέλα ποντικών είναι τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, καθώς επίσης και B και T λεμφοκύτταρα [227]. Κάποια άλλα κύτταρα μη-αιμοποιητικής προέλευσης, όπως τα ηπατοκύτταρα και κύτταρα Kupffer ή οι νευρώνες και η μικρογλοία μπορεί να είναι ανεκτικά στον πολλαπλασιασμό του DENV κατά τη διάρκεια της φυσικής μόλυνσης [228]. Επιπλέον, αυτοψίες έχουν τεκμηριώσει τη μόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECS) [229]. Κουνούπια που τρέφονται από ιαμικά άτομα μολύνονται και ο ιός μεταφέρεται στο μεσέντερο και από κει στους σιελογόνους αδένες και μετά από 4-12 ημέρες γίνονται μολυσματικά [230].

Καθώς τα κουνούπια-φορείς (γένος *Aedes*) τρέφονται, μεταφέρουν υποδοριώς τον ιό ο οποίος αποτελεί στόχο των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Τα πρώτα κύτταρα που μολύνονται είναι τα μακροφάγα και τα δερματικά δενδριτικά κύτταρα Langerhans (DCS) [231]. Η μόλυνση των κυττάρων αυτών οδηγεί σε δύο σημαντικά γεγονότα. Αρχικά, η ενεργοποίηση και η μετανάστευσή τους μέσω του λεμφικού συστήματος φέρνει τον DENV σε θέσεις όπου λαμβάνει χώρα μια ισχυρή αντιγραφή του ιού (δευτερογενή λεμφοειδή ιστό) και αφετέρου, στην έκφραση των κυτοκινών και την επαγόμενη από τις χημειοκίνες στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού [227]. Τελικά τα γεγονότα αυτά οδηγούν σε ιαμιά [232].

Η μόλυνση ξεκινά με την προσάρτηση των ιικών σωματιδίων στην επιφάνεια ευαίσθητων κυττάρων και συγκεκριμένα σε υποδοχείς που έχουν ένα μεγάλο εύρος συγγένειας πρόσδεσης, επιτρέποντας την ενδοκύττωση τους. Η οξίνιση

των ενδοσωμάτων προκαλεί αναδιάταξη των Μ και Ε πρωτεϊνών, σύντηξη των μεμβρανών κυττάρου και ιού και απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα [233]. Το νουκλεοκαψίδιο διασπάται και το ιικό γονιδίωμα μεταφράζεται στα ριβοσώματα του αδρού ER. Η πολυπρωτεΐνη που παράγεται υφίσταται πρωτεολυτική ωρίμανση. Οι μη δομικές πρωτεΐνες μαζί με κυτταρικές πρωτεΐνες δημιουργούν εγκολλώσεις στον αυλό του ER οι οποίες επικοινωνούν με το κυτταρόπλασμα μέσω πόρων [234]. Στο εσωτερικό αυτών των κυστιδίων βρίσκεται η NS5 RdRp, που δημιουργεί μια αρνητικής πολικότητας αλυσίδα-μήτρα για την παραγωγή πολλαπλών γονιδιωματικών αντιγράφων. Αυτά συνδέονται με πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου και συγκροτούνται σε ιικά σωματίδια σε πλούσιες σε πρωτεΐνες Ε και Μ περιοχές των εγκολλώσεων του ER. Τα ώριμα ιικά σωματίδια μεταφέρονται μέσω της συμβατικής εκκριτικής οδού στο εξοκυττάριο περιβάλλον, ενώ κατά τη μεταφορά τους στο trans-Golgi η φουρίνη εκεί διασπά την pM στην ώριμη Μ πρωτεΐνη, παράγοντας ώριμα μολυσματικά ιικά σωματίδια.

B.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΟΥ DENV

I. Συστήματα ρεπλικονίων

Τα υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια αναφοράς περιλαμβάνουν την κωδική αλληλουχία των μη δομικών πρωτεϊνών και τα cis-δρώντα στοιχεία στο 5' και το 3' UTR, απαραίτητα για την αντιγραφή και μεταγραφή του DENV. Λόγω της απουσίας των μη δομικών γονιδίων, επιτρέπουν την μελέτη της ιικής RNA αντιγραφής ανεξάρτητα από τη συγκρότηση του ιικού σωματιδίου. Η σύζευξη του με γονίδιο αναφοράς, όπως της firefly λουσιφεράσης (Fluc) που αντικαθιστά τα δομικά γονίδια [235], βοηθούν στην ποσοτικοποίηση των επιπέδων αντιγραφής του ιού. Το Fluc γονίδιο συζεύγεται στο 34 αμινοξύ του αμινοτελικού άκρου της C πρωτεΐνης, ενώ στην αλληλουχία του ρεπλικονίου διατηρούνται τα 24 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της E πρωτεΐνης (TM αλληλουχία), προκειμένου να διατηρηθεί η τοπολογία της NS1 στο ER. Ο ορθός διαχωρισμός του γονιδίου αναφοράς από την ιική πολυπρωτεΐνη εξασφαλίζεται από την εισαγωγή των αλληλουχιών δράσης της πρωτεάσης 2A από τον ιό FMDV, μεταξύ της TM και του καρβοξυτελικού τελικού άκρου του Fluc [236]. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το Rluc (Renilla luciferase) [235]. Το σύστημα αυτό παρέχει σταθερή έκφραση της κατασκευής σε κύτταρα, μέσω της εισαγωγής γονιδίου ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό στο ιικό γονιδίωμα όπως η πουρομυκίνη (puromycin) [237].

Τα πλήρους γονιδιωματικής αλληλουχίας ρεπλικόνια αναφοράς χρησιμοποιούνται για την μελέτη διάφορων σταδίων του κύκλου ζωής του ιού, τα οποία αδυνατεί να μελετήσει το σύστημα των υπογονιδιωματικών

ρεπλικονίων, λόγω απουσίας των δομικών πρωτεϊνών. Το πλήρες γονιδίωμα του ιού, συζεύχθηκε με γονίδιο Rluc και στο οποίο εισήχθηκε το IRES του EMCV, σταθεροποιήθηκε σε κυτταροσειρές και έδειξε παραγωγή μεγαλύτερου τίτλου στην μητρική παρά στις 24 και 48 ωρών καλλιέργειες [238]. Η σύντηξη με GFP, παρόλα αυτά, επηρέασε τη μολυσματικότητα του ιού και τα επίπεδα αντιγραφής του [239] και οδήγησε σε απάλειψη του GFP γονιδίου [240], ενώ μόνο σύντηξη με Fluc, παρείχε μεγαλύτερο τίτλο ιού στο τρίτο έως πέμπτο passage σε σχέση με τα δύο πρώτα [240], καταδεικνύοντας και τις προσαρμοστικές μεταλλάξεις του NS4B γονιδίου. Ωστόσο το σύστημα GFP-DENV ρεπλικονίου παρέχει αρκετές δυνατότητες, όπως την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεταγραφής μέσω τεχνικών απεικόνισης φθορισμού και την ταυτοποίηση της ποσότητας των παραγόμενων πρωτεϊνών, του τροπισμού και των ρυθμών αντιγραφής μέσω της τεχνικής της διαλογής ενεργοποιούμενων από φθορισμό κυττάρων.

II. Σύστημα μόλυνσης

Οι μολυσματικοί ιικοί κλώνοι είναι πολύτιμα εργαλεία που επιτρέπουν την μελέτη των σταδίων του κύκλου ζωής του ιού και πώς οι αλλαγές στο γονιδίωμα του επηρεάζουν την βιολογία του. Επίσης το σύστημα αυτό επιτρέπει τον έλεγχο και την ταυτοποίηση ενώσεων που θα μπορούσαν δυνητικά να θεραπεύσουν μολύνσεις από DENV. Η διαδικασία περιλαμβάνει την παραγωγή του ιού και στη συνέχεια την μόλυνση του συστήματος πάνω στο οποίο μελετάται ο ιός. Για παράδειγμα για τον χαρακτηρισμό μεταλλάξεων όπως μιας μετάλλαξης της E πρωτεΐνης (E6) κατασκευάστηκε cDNA κλώνος χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα του DENV2 (στέλεχος 1409). Με το στέλεχος αυτό μολύνθηκαν κύτταρα C6/36 που προέρχονται από τις προνύμφες του είδους *Aedes albopictus* [241]. Επίσης για μελέτες ελέγχου ενώσεων δραστικών έναντι του DENV, χρησιμοποιώντας το γονιδίωμα του ιού DENV-R2A (στέλεχος 16681) [242], παρήχθηκε ιός σε κύτταρα Vero E6 (νεφρικά κύτταρα από την πράσινη αφρικάνικη μαιμού) ή BHK-21 (νεφρικά κύτταρα από χάμστερ) και κύτταρα Huh7 (ανθρώπινα ηπατοκύτταρα) μολύνθηκαν [243].

III. Ζωικά μοντέλα

Οι προσπάθειες για εύρεση μοντέλων μελέτης του δάγκειου έχουν εδώ και 60 χρόνια μικρή πρόοδο καθώς ακόμα και οι πιο συγγενή πρωτεύοντα δεν παρουσιάζουν συμπτώματα κατόπιν εμβολιασμό τους με τον ιό [244]. Τα ζωικά μοντέλα είναι απαραίτητα για την μελέτη της δραστηριότητας συγκεκριμένων φαρμάκων ως αναστολείς πολλαπλασιασμού, της αποτελεσματικότητας πιθανών εμβολίων και του καθορισμού της τοξικότητας αυτών. Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιούνται συστήματα όπως πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων, ιογενείς μολυσματικοί κλώνοί [245], κουνούπια [246],

ανοσοκατεσταλμένα μεταμοσχευμένα βλαστητικά κύτταρα [247] και IFN – ανεπαρκή ποντίκια [248].

Διαφορές στον πολλαπλασιασμό σε καλλιέργειες μονοκύτταρων και δενδριτικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας κλώνους δάγκειου της Νοτιοανατολικής Ασίας με περιοχές υποκατεστημένες από στέλεχος της Αμερικής, έδειξαν τρεις περιοχές του γονιδιώματος (5', 3' UTRs και το αμινοξικό κατάλοιπο στη θέση 390 της πολυπεπτιδικής αλληλουχίας της E πρωτεΐνης) ως υπεύθυνες για την αύξηση των επιπέδων αντιγραφής και ιαμίας σε ασθενείς [245].

Τα συστήματα μόλυνσης ποντικών παρουσιάζουν μεγαλύτερους ρυθμούς αντιγραφής αλλά και κάποια, περιορισμένα μεν, συμπτώματα της μόλυνσης. Έτσι δίνουν τη δυνατότητα για δοκιμές φαρμάκων και ταυτοποίηση τοξικότητας εμβολίων. Ωστόσο απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία συστημάτων που εμφανίζουν συμπτώματα ή δείκτες για τον καθορισμό της ανοσοπαθολογίας της νόσου. Πρόσφατα προσπάθειες για την παραγωγή ποντικών με μεταμοσχευμένα αιμοποιητικά κύτταρα φαίνονται ελπιδοφόρα για την μελέτη του ιού και της νόσου [249].

B.5. Θεραπείες για τον DENV

Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες για εύρεση αναστολέων ειδικών για τον DENV, βασιζόμενοι σε κάποιο ιικό στόχο αλλά και στο κύτταρο. Ειδικές βιοχημικές δοκιμές χρησιμοποιούνται για την εύρεση αναστολέων που βασίζονται σε κάποια ιική πρωτεΐνη (πχ πρωτεάση, ελικάση), όπως το στοχευμένο σε ενζυμικές ενεργότητες HTS (High-throughput screening), το βασιζόμενο στη δομή in silico docking και τον ορθολογικό σχεδιασμό. Για αναστολείς που βασίζονται στο κύτταρο χρησιμοποιείται το σύστημα HTS (δοκιμές μόλυνσης με DENV [250] και δοκιμές με replicon [251]). Οι ενώσεις που θα βρεθούν δραστικές στο σύστημα HTS μπορούν να ελεγχθούν σε ενζυμικές δοκιμές για την ταυτοποίηση των ικών τους στόχων. Εναλλακτικά οι ικοί στόχοι μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω ελέγχου ανάπτυξης ανθεκτικότητας [252].

Μέρος Γ: Το ένζυμο DDC (L-Dopa Decarboxylase)

Γ.1 Γενικά Στοιχεία

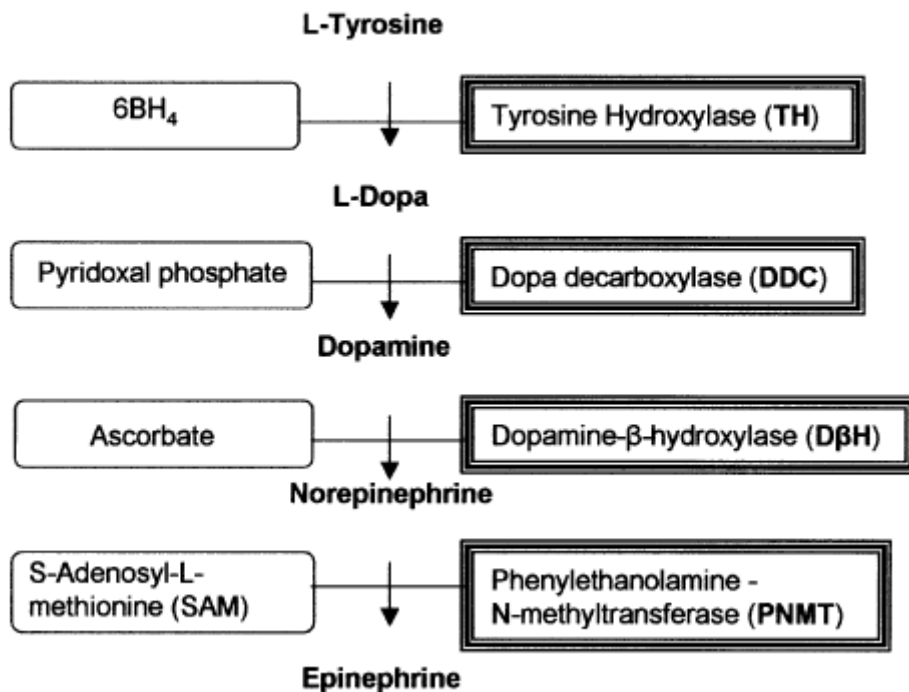
Το ένζυμο L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη αποκαρβοξυλάση (L-Dopa αποκαρβοξυλάση, L-Dopa decarboxylase ή DDC) αρχικά εντοπίστηκε σε νεφρό

θηλαστικού και αποτέλεσε το πρώτο ένζυμο που μελετήθηκε στο βιοχημικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών στα θηλαστικά [253].

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

Το ίδιο ένζυμο υποστηρίζεται ότι συμμετέχει και στη βιοσύνθεση της 5-υδροξυ-τρυπταμίνης (ή σεροτονίνης, serotonin ή 5-HT) [254, 255]. Η μεταβολική αυτή οδός περιλαμβάνει: α) υδροξυλίωση της τρυπτοφάνης σε 5-υδροξυ-τρυπτοφάνη από το ένζυμο υδροξυλάση της τρυπτοφάνης (Tryptophan Hydroxylase) και β) αποκαρβοξυλίωση της 5-υδροξυ-τρυπτοφάνης σε 5-υδροξυ-τρυπταμίνη από το ένζυμο L-Dopa αποκαρβοξυλάση.

Στα θηλαστικά, το ένζυμο που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa θεωρείται επιπλέον το μόνο ένζυμο που εμπλέκεται στην παραγωγή αμινών, μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των αρωματικών L-αμινοξέων, L-φαινυλαλανίνη, L-τυροσίνη και L-τρυπτοφάνη. Οι παραγόμενες αμίνες («αμίνες ίχνη», trace amines) θεωρούνται ενδογενείς παράγοντες ρύθμισης της νευροδιαβιβαστικής λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) [256-258].



Εικόνα 12 [259] Ο καταρράκτης βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Η υδροξυλάση τυροσίνης (TH) απαιτεί 6BH₄ (6R-L-ερυθρο-5,6,7,8 τετραϋδοπτερίνη) ως απαραίτητο συμπάραγοντα για τη βιοσύνθεση της της L-τυροσίνης και της L-Dopa η οποία στη παρουσία φωσφορικής πυριδοξάλης, μετατρέπεται από την L-Dopa Decarboxylase (DDC) σε ντοπαμίνη. Αυτός ο μεταβολίτης χρησιμοποιείται από τη β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (DβH) στη παρουσία ασκορβικού για να σχηματιστεί νορεπινεφρίνη. Η μεθυλτρανσφεράση N φαινυλαιθανολαμίνης (Phenylethanolamine N- methyltransferase- PNMT) καταλύει ειδικά την αντίδραση προς επινεφρίνη στη παρουσία της S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνης (SAM).

Γ2. Παρουσία και ρόλος της DDC στα θηλαστικά

Στα θηλαστικά, η DDC εντοπίζεται τόσο σε ιστούς νευρικής προέλευσης, όπου συμμετέχει στη βιοσύνθεση των μονοάμινο νευροδιαβιβαστών ντοπαμίνη και σεροτονίνη [260]όσο και σε ιστούς μη νευρικής προέλευσης, όπου φαίνεται να έχει ενεργότητα μη ειδικής αποκαρβοξυλάσης και μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστος ο βιολογικός της ρόλος [261]

I. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ

Οι μελέτες για τον εντοπισμό του ενζύμου στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) αφορούν κυρίως σε εγκέφαλο ανθρώπου και αρουραίου. Η παρουσία της DDC σε ντοπαμινεργικούς και σεροτονεργικούς νευρώνες έχει επιβεβαιωθεί με διάφορες πειραματικές μεθόδους όπως μέτρηση ενεργότητας [262], *in situ* υβριδοποίηση [263] και ανοσοϊστοχημεία [264]. Η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη στα θηλαστικά διαδραματίζουν ρόλο σε μια σειρά φυσιολογικές διεργασίες. Η δράση της σεροτονίνης σχετίζεται με τη διάθεση, τον πόνο, τον ύπνο, τη μάθηση και τη μνήμη, ενώ η ντοπαμίνη, μεταξύ άλλων, φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς παθογένεσης ψυχιατρικών καταστάσεων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η σχιζοφρένεια [265], η νόσος του Parkinson [266] καθώς και ο εθισμός σε ναρκωτικές ουσίες, όπως η κοκαΐνη [267].

Υψηλή ενεργότητα της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στο ΚΝΣ εντοπίζεται στον υποθάλαμο, στην επίφυση, στο ραβδωτό σώμα, όπου περικλείεται στις νευρικές απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων, στον υπομέλανα τόπο, στον οσφρητικό βολβό και στον αμφιβληστροειδή χιτώνα (Park et al., 1986).

Η παρουσία του ενζύμου στον υποθάλαμο και την επίφυση υποδεικνύει σύνδεση με τη νευροενδοεκκριτική του δράση. Συγκεκριμένα, τα διάφορα νευροδιαβιβαστικά συστήματα του υποθαλάμου και του μεσεγκεφάλου μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη σύνθεση και την έκκριση των υποθαλαμικών νευροεκκριτικών ορμονών. Είναι πιθανόν η ντοπαμίνη να έχει την ικανότητα να τροποποιεί την έκκριση των γοναδοτροπινών, της προλακτίνης και της αυξητικής ορμόνης [268, 269]. Η ύπαρξη και δράση της DDC, του τελευταίου ενζύμου στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης των κατεχολαμινών, σε αυτά τα συστήματα φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αντίστοιχων φυσιολογικών διεργασιών. Η παρουσία και δράση της DDC στους νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού είναι αναγκαία για την παραγωγή ντοπαμίνης, δεδομένου ότι μόνο η L-Dopa μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και όχι η ντοπαμίνη.

Υπάρχουν παρόλα αυτά ενδείξεις για την παρουσία του ενζύμου σε νευρικά κύτταρα τα οποία στερούνται των ενζύμων υδροξυλάση της τρυπτοφάνης και υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) [270]. Τα κύτταρα αυτά ονομάστηκαν “D κύτταρα” (D cells) και υποστηρίζεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa σε ασθενείς με τη νόσο του Parkinson [271].

Τέλος, το ένζυμο έχει εντοπιστεί σε μια σειρά νευρώνων του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, όπου δεν παρατηρείται σύνθεση ή αποθήκευση σεροτονίνης και ντοπαμίνης ή των παραγώγων της ντοπαμίνης, νοραδρεναλίνη και αδρεναλίνη [270]. Σε αυτούς τους νευρώνες, το ένζυμο πιθανά χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την τυροσίνη μετατρέποντάς την σε τυραμίνη, που φέρεται να δρα ως νευροδιαβιβαστής [272].

II. Παρουσία της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης σε περιφερικούς ιστούς

Υψηλή ενεργότητα της DDC έχει εντοπιστεί περιφερικά και συγκεκριμένα σε ήπαρ, πάγκρεας, νεφρό, πνεύμονες, σπλήνα, στομάχι, σιελογόνους αδένες, καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν αιμοφόρα αγγεία, όπου φαίνεται να χρησιμοποιεί ως υποστρώματα την L-Dopa και την 5-HTP [273-275]. Το ένζυμο εντοπίζεται σε όλο το μήκος του πεπτικού σωλήνα [276]. Πολλά από αυτά τα κύτταρα της περιφέρειας που περιέχουν DDC ανήκουν στο σύστημα Πρόσληψης και Αποκαρβοξυλίωσης Πρόδρομων Αμινών (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation system, APUD) [277]. Αυτά τα κύτταρα εντοπίζονται στο έντερο και άλλα όργανα και παράγουν πεπτιδικές ορμόνες και αμίνες. Προσλαμβάνουν πρόδρομα μόρια βιογενών αμινών, όπως την L-Dopa και την 5-HTP, τις αποκαρβοξυλιώνουν και αποθηκεύουν τα προϊόντα σε εκκριτικά κυστίδια. Η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία της DDC και ενός μεταφορέα μονοαμινών, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά της ντοπαμίνης και τη σεροτονίνης σε εκκριτικά κυστίδια (Dockray et al., 1996).

Η υψηλότερη ενεργότητα και παρουσία του ενζύμου, σε σχέση με τους υπόλοιπους περιφερικούς ιστούς, εντοπίζεται στο ήπαρ και στον νεφρό, όπου δεν βιοσυντίθενται μονοαμίνες. Αν και η φυσιολογική σημασία του ενζύμου σε αυτούς τους ιστούς δεν είναι γνωστή, είναι πιθανόν να παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό άλλων αρωματικών αμινοξέων [275].

Γ3. Προσδιορισμός της μοριακής μάζας του ενζύμου

Γενικά υπήρξε μία σύγχυση στον προσδιορισμό της μοριακής μάζας του ενζύμου και μία σειρά από αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αρχικά, η DDC που απομονώθηκε από νεφρό χοίρου θεωρήθηκε ότι αποτελείται από τρεις υπομονάδες με μοριακές μάζες 57.000, 40.000 και 21.000 Da [255]. Δεδομένα με τα οποία συμφώνησαν και άλλοι ερευνητές [278]. Δύο διαφορετικές ομάδες ωστόσο [254, 279], μελετώντας το ένζυμο από νεφρό χοίρου, θεώρησαν ότι αποτελείται από δύο διαφορετικές υπομονάδες μοριακής μάζας 50.000 και 40.000 Da. Νεότερες εργασίες υποστηρίζουν ότι το μόριο είναι ομοδιμερές, καθώς το ένζυμο που απομονώθηκε από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [280, 281] και νεφρό [282] παρουσίασε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μια πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα περίπου 50.000 Da. Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε σε ένζυμο που απομονώθηκε από ήπαρ και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου [283] και η μοριακή μάζα της υπομονάδας προσδιορίστηκε στα 50.000 Da. Απομόνωση της DDC από εγκέφαλο βοός με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος, επίσης, παρουσίασε σε SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μία πρωτεϊνική ζώνη που αντιστοιχούσε σε μοριακή μάζα 50.000 Da [284]. Η μοριακή μάζα της υπομονάδας του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό αρουραίου

προσδιορίστηκε στα 48.000 Da [285], ενώ της υπομονάδας του ενζύμου που απομονώθηκε από ιστούς βοός προσδιορίστηκε στα 56.000 Da [286] και στα 50.000 Da [287].

Άλλοι ερευνητές [288, 289], αναλύοντας την αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου που απομονώθηκε από νεφρό χοίρου, υπολόγισαν τη μοριακή μάζα της υπομονάδας στα 53.858 Da και 54.000 Da, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη μοριακή μάζα που αναμένεται από την αμινοξική αλληλουχία που δίνουν τα cDNA που έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς.

Η DDC σήμερα θεωρείται ότι αποτελεί ένα ομοδιμερές μόριο με μοριακή μάζα υπομονάδας 50.000 – 55.000 Da (μοριακή μάζα ολοενζύμου 100.000 – 110.000 Da). Τα παλαιότερα αποτελέσματα που οδήγησαν σε ασυμφωνία έχουν αποδοθεί σε ατελή καθαρισμό ή/και παρουσία προϊόντων αποικοδόμησης του ενζύμου. Μελέτες κρυσταλλογραφίας σε ανασυνδυασμένη ενζυμική πρωτεΐνη επιβεβαίωσαν τη συγκρότηση του ενζύμου ως ομοδιμερές και επέτρεψαν την περαιτέρω μελέτη των δομικών του χαρακτηριστικών [290]. Συμπερασματικά το ένζυμο DDC είναι δομικά και λειτουργικά διμερές ενώ το μονομερές της αποτελεί την ανενεργή μορφή του ενζύμου [291]

Γ4. Υποστρωματική εξειδίκευση του ενζύμου

Ένα σημαντικό ερώτημα που γεννάται φύρω από αυτό το ένζυμο, είναι αυτό της υποστρωματικής εξειδίκευσης. Επιπλέον αξιοσημείωτη είναι και η διερεύνηση για την παρουσία ενός ή περισσότερων ενζύμων τα οποία ευθύνονται για την αποκαρβοξυλίωση ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων.

Σύμφωνα με τα δεδομένα αρκετών ερευνητικών ομάδων, το ένζυμο που απομονώνεται από ιστούς θηλαστικών αποκαρβοξυλιώνει τόσο την L-Dopa, όσο και την 5-υδροξυ-τροπτοφάνη, παράγοντας ντοπαμίνη και σεροτονίνη, αντίστοιχα [254, 292].

Το ένζυμο που απομονώθηκε από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα αποκαρβοξυλιώνει, εκτός από τα αμινοξέα L-Dopa και 5-HTP, το συνθετικό αμινοξύ L-threo-Dops (L-threo-3,4-διυδροξυ-φαινυλ-σερίνη) που θεωρείται συνθετική πρόδρομος ουσία της νοραδρεναλίνης [292]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι η 5-HTP αναστέλλει την ενεργότητα του ενζύμου που απομονώνεται από ανθρώπινο νεφρό ως προς την L-Dopa [274]. Τέλος, πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι η κατανομή της ενεργότητας ως προς την L-Dopa διαφέρει από την κατανομή της ενεργότητας ως προς την 5-HTP μεταξύ διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου του αρουραίου και του βοός, ενώ τα δύο μόρια αποκαρβοξυλιώνονται κάτω από διαφορετικές άριστες συνθήκες [286, 293]. Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στις τιμές του Km και του Vmax της DDC σε διάφορους ιστούς ή ακόμα και σε ίδιους ιστούς αλλά σε διαφορετικά είδη και πιθανόν να οφείλονται στη χρήση ενζυμικών παρασκευασμάτων διαφορετικού βαθμού καθαρότητας αλλά και διαφορετικής μεθοδολογίας καθαρισμού.

Γενικά, οι τιμές V_{max} για την L-Dopa είναι σταθερά πιο υψηλές από αυτές για την 5-HTP και οι τιμές του K_m για την L-Dopa είναι 5 φορές μεγαλύτερες από ό,τι για την 5-HTP [286].

Μέχρι και σήμερα η επιστημονική κοινότητα διαφωνεί σχετικά με τη μοναδικότητα του ενζύμου που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa και την 5-HTP. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι είναι διαφορετικά τα ένζυμα που καταλύουν την αποκαρβοξυλίωση των δύο υποστρωμάτων. Αρχικά, στον εγκέφαλο αρουραίου οι βέλτιστες συνθήκες του pH, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης του υποστρώματος διαφέρουν ως προς την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa και της 5-HTP. Σε πειράματα διαπίδυσης ομογενοποιημένου εγκεφάλου που έγιναν παρουσία και απουσία πυριδοξίνης, ενώ η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της 5-HTP χάνεται ολοκληρωτικά ή σχεδόν ολοκληρωτικά, η ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa παραμένει αμετάβλητη. Αυτό υποδεικνύει μία διαφορετική ευαισθησία στην έλλειψη πυριδοξίνης [293].

Αντιθέτως, άλλη ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι στους ίδιους ιστούς η ενεργότητα της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης ήταν πιο επιρρεπής στην έλλειψη 5-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) από ό,τι η ενεργότητα της 5-HTP αποκαρβοξυλάσης [294]. Εάν ισχύει η υπόθεση της ύπαρξης ενός μοναδικού ενζύμου, τότε η αναλογία των ενζυμικών ενεργοτήτων ως προς την L-Dopa και την 5-HTP θα έπρεπε να είναι παρεμφερής σε όλους τους ιστούς. Ωστόσο, η αναλογία της αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP στους ιστούς δεν είναι πάντα σταθερή [275, 293]. Επιπρόσθετα, στον εγκέφαλο η ενεργότητα του ενζύμου ως προς την αποκαρβοξυλίωση της 5-HTP είναι εξίσου κατανομημένη μεταξύ του διαλυτού και σωματιδιακού (particulate) κλάσματος, σε αντίθεση με την αποκαρβοξυλίωση ως προς την L-Dopa, η οποία είναι κυρίως διαλυτή [295]. Αυτή η ανόμοια υποκυτταρική κατανομή της ενεργότητας αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και 5-HTP επιβεβαιώνει την ύπαρξη ισοενζύμων της DDC στον εγκέφαλο [294, 296].

Στο παρελθόν έχει προταθεί, σε αντίθεση με τις παραπάνω παρατηρήσεις, ότι υπάρχει ένα μοναδικό ένζυμο με ένα μόνο καταλυτικό κέντρο, αλλά με διακριτές θέσεις δέσμευσης των δύο υποστρωμάτων [297]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από πολλές μελέτες και κυρίως από τη διερεύνηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν τη σύνθεση της DDC. Ως προς την αναλογία της ενεργότητας αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP, υπάρχουν διαφορετικά δεδομένα. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η αναλογία των δύο αυτών ενεργοτήτων αποκαρβοξυλίωσης παρέμεινε σταθερή σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου γάτας [298], καθώς και ότι η κατανομή της ενεργότητας αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP είναι σχεδόν πανομοιότυπη σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων διάφορων περιοχών του εγκεφάλου αρουραίου [299]. Περαιτέρω, τα ένζυμα που έχουν απομονωθεί από διάφορους ιστούς, όπως νεφρό χοίρου [254], νεφρό ινδικού χοιριδίου [300],

νεφρό αρουραίου [272], ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [292] και εγκέφαλο βοός [284] μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν και τα δύο αυτά υποστρώματα.

Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση που έχει απομονωθεί από το ραβδωτό σώμα, το μυελό των επινεφριδίων, την επίφυση, το ήπαρ και το νεφρό αρουραίου είναι πανομοιότυπη ως προς την ανοσολογική αντίδραση και τη μοριακή μάζα [285]. Αντιορός που παρασκευάστηκε έναντι της DDC που είχε απομονωθεί είτε από επινεφρίδιο βοός ή από νεφρό αρουραίου ανέστειλε εξίσου την ενεργότητα αποκαρβοξυλίωσης ως προς την L-Dopa και ως προς την 5-HTP [285]. Έμμεσες ενδείξεις που υποστήριζαν περαιτέρω την υπόθεση του «μοναδικού ενζύμου» προήλθαν από *in vivo* μελέτες δύο ερευνητικών ομάδων [301, 302]. Οι Dairman *et al.* (1975) έδειξαν ότι στον εγκέφαλο γάτας, αγωγή με 6-υδροξυτοπαμίνη, φαρμακευτική ουσία η οποία καταστρέφει επιλεκτικά κατεχολαμινεργικούς νευρώνες, έχει ως αποτέλεσμα την σχετικά αντίστοιχη μείωση των ενεργοτήτων αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και της 5-HTP. Αντίστοιχη απώλεια των ενζυμικών ενεργοτήτων παρατηρήθηκε, επίσης, στο νωτιαίο μυελό αρουραίων που υποβλήθηκαν σε ενδοεγκεφαλική αγωγή με την σεροτονική νευροτοξίνη 5,7-διυδροξυ-τροπταμίνη [302].

Ενδείξεις που υποστήριζαν περαιτέρω την ύπαρξη ενός μοναδικού ενζύμου, προέρχονται από έρευνες χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας. Πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση cDNA ιχνηθέτη συμπληρωματικού ως προς το mRNA της DDC του επινεφριδίου βοός, υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός μοναδικού mRNA στο ήπαρ, νεφρό και επινεφρίδιο βοός, στο ήπαρ, εγκέφαλο και φαιοχρωμοκύτωμα αρουραίου, καθώς και σε ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [303]. Αποτελέσματα πειραμάτων *in situ* υβριδοποίησης για τον εντοπισμό του mRNA της DDC, υπέδειξαν την έκφραση του γονιδίου της DDC σε ντοπαμινεργικούς και σεροτονικούς νευρώνες στον εγκέφαλο γάτας [263]. Το πλήρους μήκους ανθρώπινο cDNA που κωδικοποιεί τη DDC έχει απομονωθεί από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα [304]. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη DDC αποκαρβοξυλιώνει τόσο την 5-HTP σε σεροτονίνη όσο και την L-Dopa σε ντοπαμίνη, που αποτελεί ένδειξη ότι ένα μοναδικό ένζυμο μπορεί να αποκαρβοξυλιώνει και τα δύο υποστρώματα [305]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν για το ανασυνδυασμένο ένζυμο από αρουραίο [306]. Η ανάλυση με τη χρήση ιχνηθετών που αντιστοιχούν στην πλήρη κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA της DDC από φαιοχρωμοκύτωμα (S1 mapping analysis), έδειξε ότι η πρωτοταγής αλληλουχία της DDC σε νευρικούς και μη-νευρικούς ιστούς είναι πανομοιότυπη [307]. Μετά από μικροέγχυση mRNA που κωδικοποιεί την DDC σε ωοκύτταρα *Xenopus laevis* από μυελό επινεφριδίων βοός, εκφράστηκε ανασυνδυασμένη DDC. Η ενζυμική ενεργότητα του ανασυνδυασμένου ενζύμου ήταν στερεοειδική για την L-5-HTP και την L-Dopa και μπορούσε να ανασταλλεί από το NSD-1015. Θέρμανση του ενζύμου στους 55°C είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια ενεργότητας του ενζύμου ως προς τα δύο υποστρώματα [308]. Το πλήρους μήκους ανθρώπινο cDNA που κωδικοποιεί τη

DDC απομονώθηκε από ανθρώπινο πλακούντα και κλωνοποιήθηκε για την παραγωγή ανασυνδυασμένου ανθρώπινου ενζύμου [309]. Η ενεργότητα της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης DDC ως προς την L-Dopa αναστέλλεται από την 5-HTP, που αποτελεί ένδειξη ότι η ανασυνδυασμένη DDC την χρησιμοποιεί ως εναλλακτικό υπόστρωμα. Επομένως, τα δεδομένα αυτά αποτελούν σαφείς ενδείξεις ότι η ενζυμική αποκαρβοξυλίωση και των δύο υποστρωμάτων πραγματοποιείται από μία πρωτεΐνη που εκφράζεται από ένα γονίδιο και ένα μήνυμα.

Γ5. Χημικές ουσίες που επηρεάζουν την ενεργότητα του ενζύμου

Η ενεργότητα της DDC αναστέλλεται από ουσίες όπως η καρβιντόπα (carbidopa), η οποία χορηγείται ευρέως παράλληλα με την L-Dopa κατά της ασθένειας του Parkinson, το L-3-(3,4 διυδροξυφαινυλ)-2-υδραζιν-μεθυλπροπιονικό οξύ (α-MDH) που είναι συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου [310], η 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη (NSD-1015) [311], η α-μονοφλουορο-μέθυλ-Dopa (MFMD) [312], η ουσία βενσεραζίδη (benzerazide), η οποία διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μειώνει την ενεργότητα της DDC στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου του αρουραίου [313] και η α-μεθυλ-Dopa (AMD) [314]. Τελευταία έχει δειχθεί ότι οι πολυφαινόλες από πράσινο τσάι αναστέλλουν την DDC με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο επώασης και από τη συγκέντρωσή τους [315].

Γ6. Δομή του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης

Η πλήρης αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης έχει καθοριστεί από νευρικού τύπου ιστό, και συγκεκριμένα φαιοχρωμοκύττωμα [316], καθώς και από μη-νευρικού τύπου ιστό, από ανθρώπινο ήπαρ [280]. Το ανθρώπινο γονίδιο της DDC αποτελείται από 15 εξόνια και καταλαμβάνει έκταση 85 kb [316]. Υπάρχει σε ένα αντίγραφο στο απλοειδές γονιδίωμα και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 (Bruneau et al., 1990b), στη χρωμοσωμική ζώνη 7p12.1 – p12.3, κοντά στην περιοχή που εδράζεται το γονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Η θέση αυτή έχει επιβεβαιωθεί με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης [317], ενώ οι Scherer *et al.* (1992) [318], με αντίστοιχα πειράματα, εντόπισαν το γονίδιο στο χρωμόσωμα 7, στη θέση p11 [318]. Το μήκος των εξονίων κυμαίνεται από 20 bp ως 400 bp, ενώ το μήκος των εσωνίων από 1 kb ως 17,7 kb.

Όσον αφορά στη λειτουργική οργάνωση του γονιδίου της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης από αρουραίο, το γονίδιο αποτελείται από δύο υποκινητές και 16 εξόνια που καταλαμβάνουν περισσότερο από 80 kb στο γονιδίωμα [319].

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

Το ανθρώπινο γονίδιο που εκφράζει την DDC έχει απομονωθεί, κλωνοποιηθεί και η αλληλουχία του έχει προσδιοριστεί πλήρως [304]. Όπως αναφέρθηκε, αποτελείται από 15 εξώνια, όπου το σημείο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στο δεύτερο εξώνιο, ενώ το σημείο λήξης στο δέκατο τέταρτο εξώνιο. Στο συγκεκριμένο γονίδιο εντοπίστηκαν ορισμένες διαφορές στην 5' UTR (μη μεταφραζόμενη περιοχή) [280], οι οποίες φαίνεται να προκύπτουν από εναλλακτική συρραφή στην 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή. Η εναλλακτική αυτή συρραφή επάγεται από την επίδραση διαφορετικών υποκινητών και οδηγεί στη δημιουργία δύο διαφορετικών τύπων mRNA. Το πρώτο εξώνιο διαφέρει ανάλογα με τον ιστό και διαφοροποιεί το μετάγραφο του γονιδίου σε νευρικού τύπου και μη-νευρικού τύπου [280]. Συγκεκριμένα, το νευρικού τύπου μετάγραφο φέρει ως πρώτο εξώνιο το N1, που απέχει 17,7 kb από το δεύτερο εξώνιο, ενώ το μη-νευρικού τύπου μετάγραφο φέρει ως πρώτο εξώνιο το L1, που απέχει 22 kb από το δεύτερο εξώνιο. Το N1 έχει μήκος 83 bp, ενώ το L1 έχει μήκος 200 bp. Ο μηχανισμός αυτός έχει δειχθεί ότι είναι υπεύθυνος για την ιστοειδική έκφραση του γονιδίου, με πειράματα *in situ* υβριδοποίησης [320].

Έχει θεωρηθεί ότι η κατανομή των δύο τύπων mRNA, λόγω εναλλακτικής συρραφής στην 5'UTR και χρήση διαφορετικού υποκινητή, ακολουθεί ένα πρότυπο ιστοειδικότητας. Στο ήπαρ εντοπίζεται μόνο το μη-νευρικού τύπου mRNA, ενώ στον εγκέφαλο, στα επινεφρίδια και σε νεοπλασίες που συνδέονται με υπερπαραγωγή κατεχολαμινών εντοπίζεται το νευρικού τύπου μήνυμα. Ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει το γεγονός ότι στο νεφρό και στον πλακούντα συνυπάρχουν τα δύο είδη mRNA, ενώ η αιτιολογία αυτού του φαινομένου δεν είναι ακόμα γνωστή [280] [309]. Επίσης, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι σε περιφερικά ανθρώπινα λευκοκύτταρα, που είναι μη νευρικής προέλευσης, εκφράζονται τα νευρικού και μη νευρικού τύπου μετάγραφα της DDC [321]. Οι παρατηρήσεις αυτές δημιουργούν ερωτήματα για τη λειτουργική σημασία της ταυτόχρονης έκφρασης των δύο μεταγράφων, ενώ φαίνεται ότι η έκφραση των δύο τύπων mRNA της DDC δεν είναι αλληλοαποκλειόμενη [321] [309], όπως εθεωρείτο.

Το εξώνιο 3, είναι το πιο συντηρημένο μεταξύ των ειδών. Μολονότι η οργάνωση του γονιδίου στη Δροσόφιλα είναι διαφορετική, ένα τμήμα παρόμοιο με το εξώνιο αυτό εντοπίζεται στο τελευταίο εξώνιο. Το τμήμα αυτό παρουσιάζει 79 % αμινοξική ομολογία και 78% ομοιότητα νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με το ανθρώπινο εξώνιο 3 [322] [304]. Είναι, επομένως, πολύ πιθανό αυτή η περιοχή να είναι κρίσιμης σημασίας για την ενζυμική δράση.

Μία πληθώρα παραγόντων έχουν δειχθεί ότι μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του mRNA της DDC, μολονότι δεν είναι γνωστό ακόμα εάν αυτή η

ιδιότητά τους είναι ιστοειδική. Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της DDC επιτελείται από ειδικούς αναστολείς, τους MAO αναστολείς (Monoamine oxidase inhibitors) [323]. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς MAO τύπου B, όπως το (-)-διπρενύλιο, η παργουλίνη και ο MDL 72,974 A [323, 324], η διξαμεθασόνη [325], η ιντερλευκίνη-1β και η προσταγλανδίνη E2 (PGE2)[326], ο NSD-1015 [327], ανταγωνιστές των ντοπαμινεργικών υποδοχέων [328], η διζοκιλίνη ([329]), η ρεσερπίνη [330], η παργουλίνη [323] και η αντι-ιική ουσία αμανταδίνη [331] φαίνεται να αυξάνουν τα επίπεδα του mRNA της DDC. Από την άλλη πλευρά, οι αμφεταμίνες και η βιγκαπατρίνη [332], όπως και ο νευρικός αυξητικός παράγοντας (NGF) [333] αναστέλλουν την έκφραση του mRNA της DDC. Μελέτη της δράσης του νευρικού αυξητικού παράγοντα στη γονιδιακή έκφραση του ενζύμου που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa στην κυτταρική σειρά φαιοχρωμοκυτώματος PC12, αποκάλυψε ότι ο NGF καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης [333]. Καθώς ο NGF επηρεάζει την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των νευρώνων (Thoenen and Barde, 1980), η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του NGF και του γονιδίου της DDC μπορεί να προσφέρει μία καινούρια προσέγγιση για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως τη νόσο του Parkinson [333].

Από τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι λίγα πράγματα είναι γνωστά για τη γονιδιακή ρύθμιση της ιστοειδικής έκφρασης του ενζύμου που αποκαρβοξυλιώνει την L-Dopa στα θηλαστικά.

Εκτεταμένες μελέτες πάνω στο ανθρώπινο γονίδιο της DDC αποκάλυψαν πως γίνεται εναλλακτική συρραφή και εντός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου. Οι O'Malley et al (1995) [334] ανέφεραν ότι δύο ισομορφές ενζύμου μπορούν να δημιουργηθούν στον ανθρώπινο οργανισμό με εναλλακτική συρραφή εντός της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου: μία που προκύπτει από το πλήρες μετάγραφο, έχει ενζυμική ενεργότητα ως προς την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa και της 5-HTP και συμβολίζεται ως DDC480, και μία ισομορφή που προκύπτει από τη μετάφραση του μεταγράφου που του λείπει το εξόνιο 3, δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα και συμβολίζεται ως DDC442, όπου 480 και 442 καταδεικνύουν τον αριθμό των αμινοξέων των δύο αυτών ισομορφών του ενζύμου, αντιστοίχως [334]. Και οι δύο ισομορφές εκφράζονται ευρύτατα με την DDC442 να αποτελεί μάλιστα την κύρια μορφή σε πολλούς νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς, αν και είναι άγνωστος ο φυσιολογικός της ρόλος από τη στιγμή που δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα. Έχει προταθεί ότι η DDC442 ισομορφή μπορεί να καταλύει την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων φαινολαανίνη, m-τυροσίνη και p-τυροσίνη με μεγαλύτερη συγγένεια από την DDC480.

Οι Chang *et al.* (1996) [335] αναφέρουν τον εντοπισμό δύο τύπων μεταγράφων της DDC σε νευρικούς και μη νευρικούς ιστούς. Το ένα μετάγραφο κωδικοποιεί το πλήρους μήκους ένζυμο, ενώ το μικρότερο μετάγραφο, από το οποίο έχει

απαλειφθεί το εξόνιο 3, οδηγεί στη σύνθεση μίας ανενεργής ισομορφής, λόγω διαφορετικής υποστρωματικής εξειδίκευσης ή συγγένειας για συμπαράγοντα [335]. Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα δεν επαληθεύουν την παρατήρηση αυτή, καθώς αποκάλυψαν την έκφραση του νευρικού τύπου μεταγράφου της DDC στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 (human histiocyte lymphoma), από την οποία απουσίαζε το εξόνιο 3 και κωδικοποιούσε την παραγωγή ενεργής πρωτεϊνικής ισομορφής. Η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε στα 4,2 mUnits/mg [336]. Το νευρικού τύπου μετάγραφο από το οποίο απουσιάζει το εξόνιο 3 έχει εντοπιστεί και στα ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα και ο ρόλος του πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανοσοβιολογικής απόκρισης [321]. Προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος έχουν εντοπιστεί και στο πάγκρεας και έχουν συσχετιστεί με το Αυτοάνοσο Πολυενδοκρινικό Σύνδρομο τύπου I (APS I) [337].

Επιπλέον, πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός μικρότερου μεταγράφου του ενζύμου στον ανθρώπινο πλακούντα, μήκους 1,8 kb. Κλωνοποίηση αυτού του εναλλακτικού μεταγράφου έδειξε ότι δεν περιέχει τα εξόνια 10 έως 15, ενώ περιλαμβάνει ένα εναλλακτικό εξόνιο 10 που εντοπίζεται μέσα στο εσόνιο 9. Το μετάγραφο αυτό περιέχει το νευρικού τύπου εξόνιο 1 και κωδικοποιεί ένα μικρότερο πολυπεπτίδιο από τη DDC, 338 αμινοξέων, εκ των οποίων τα πρώτα 315 είναι ταυτόσημα με αυτά της αποκαρβοξυλάσης της L-Dopa. Η ισομορφή αυτή ονομάστηκε Alt-DDC και εντοπίστηκε σε ανθρώπινο νεφρό, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα ενεργότητας [338].

Ως κύριος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργότητας της DDC έχει προταθεί η φωσφορυλίωση. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε από μια σειρά παρατηρήσεων. Η πρώτη παρατήρηση αφορά στον εντοπισμό στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης μιας σειράς μοτίβων φωσφορυλίωσης από cAMP-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (PKA), από πρωτεϊνικές κινάσες C (PKC), από ασβέστιο-καλμοντουλίνη εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες II (Ca-CM PK II) και από κατευθυνόμενες από προλίνη πρωτεϊνικές κινάσες (proline-directed protein kinases) [308, 339]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι αύξηση της φωσφορυλίωσης του ενζύμου προκαλεί αύξηση της ενζυμικής του ενεργότητας, ενώ αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν πως η PKA φωσφορυλιώνει περισσότερες από μία θέσεις της DDC (Young et al., 1993). Χορήγηση φορσκολίνης, που ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση και αυξάνει τα επίπεδα του κυκλικού AMP (cAMP), καθώς και χορήγηση 8-Bromo-cAMP, ενός ενεργοποιητή της PKA, αυξάνουν την ενεργότητα της DDC στον εγκέφαλο ποντικού [340]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι μια cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση φωσφορυλιώνει την DDC, αυξάνοντας παροδικά το V_{max} του ενζύμου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από την ύπαρξη στο μόριο του ενζύμου δύο καταλοίπων σερίνης (Ser220 και Ser336) που μπορούν να φωσφορυλιωθούν από cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση [339].

Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός ρύθμισης περιλαμβάνει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Χορήγηση φορβολικών εστέρων, που ενεργοποιούν την PKC, αυξάνουν παροδικά τη δραστηριότητα του ενζύμου και η αλλαγή αυτή χαρακτηρίζεται από αύξηση του V_{max} και μικρή μεταβολή του K_m ως προς L-Dopa και PLP [341]).

Η φωσφορυλίωση της PKA, που προκαλεί αύξηση της ενεργότητας της DDC, ρυθμίζεται από τους D2 προσυναπτικούς υποδοχείς της ντοπαμίνης. Όταν ανταγωνιστές δεσμευτούν στους D2 υποδοχείς, επάγεται άρση της καταστολής της αδενυλικής κυκλάσης και αύξηση των επιπέδων cAMP. Το cAMP προκαλεί τη φωσφορυλίωση της PKA που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την DDC αυξάνοντας την ενεργότητά της [342].

Γ7. Συσχέτιση της μεταβολικής και σηματοδοτικής οδού της Ντοπαμίνης με τους ιούς Dengue και HCV.

Μικρομοριακές ενώσεις με δομές παρόμοιες με αυτές των βενζοδιαζεπινών που αποτελούν γνωστούς ανταγωνιστές των υποδοχέων ντοπαμίνης και σεροτονίνης έχουν διερευνηθεί εκτενώς για την επίδρασή τους στην ενεργοποίηση και τη σηματοδότηση μέσω αυτών των υποδοχέων. [343, 344]. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως μία ομάδα μικρομοριακών ενώσεων, οι διϋδροβενζοθειεπίνες (dihydrodibenzothiepinines-DHBTs) που μοιάζουν δομικά με γνωστούς ανταγωνιστές ντοπαμινεργικών και σεροτονεργικών υποδοχέων έχει αναφερθεί να έχουν αντιϊκή δραστηριότητα έναντι του δάγκειου ιού και μάλιστα να επηρεάζουν την αντιγραφή του DENV μέσω ανταγωνισμού της DRD4 σηματοδότησης και επακόλουθης αναστολής της προς τα κάτω ERK σηματοδότησης [345].

Συγκεκριμένα, οι ερευνητές έδειξαν πως οι αντιϊκές δράσεις ενός υψηλά ενεργού συστατικού αυτών των ενώσεων, του 7-φλουορο-11-(4μεθυλπιπεραζιν-1-υλ)-10-11-διυδροδιβενζοδια(β,φ,) θιεπιν-2-ολ (αναφέρεται ως SKI-417616) συμβαίνουν νωρίς στον ιϊκό κύκλο κατά το στάδιο της εσωτερίκευσης του ιού[345]. Βασιζόμενοι στη δομή των DHBTs, που μοιράζονται μια κοινή στις διυδροβενζοδιαζεπίνες δομή, διερεύνησαν τους ρόλους των υποδοχέων της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης στη δράση των DHBTs έναντι του δάγκειου ιού. Είδαν πως τα DHBTs έχουν αντιϊκή δράση αλλά στη προσπάθειά τους να δημιουργήσουν μεταλλάξεις ανθεκτικότητας του ιού στο SKI-417616, με διαδοχικές ανακαλλιέργειες παρουσία του αναστολέα, δεν είχαν επιτυχία συμπεραίνοντας πως η αναστολή αφορά περισσότερο πρωτεΐνη του ξενιστή παρά του ιού. Επιπλέον βρήκαν πως συμβαίνει σε αρχικό στάδιο του ιϊκού κύκλου ζωής αφού μεταξύ άλλων η προσθήκη του αναστολέα ταυτόχρονα με τη μόλυνση είχε καλύτερη ανασταλτική δράση από ότι αν τον προσέθεταν 2 ή 6 ώρες μετά τη μόλυνση [345]. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν κύτταρα HEK-293 που εκφράζουν κυρίως τον υποδοχέα σεροτονίνης 2A (Serotonin receptor 2a-

5HTR2A) και τον υποδοχέα ντοπαμίνης D4 (D4 Dopamine receptor) [345] και με ειδικούς ανταγωνιστές για τον κάθε υποδοχέα και διαπίστωσαν πως μόνο η αναστολή του DRD4 οδήγησε σε δραματική μείωση της παραγωγής μολυσματικών ιών δάγκειου πυρετού οροτύπου 2. Επίσης με τη τεχνική RNA αποσιώπησης είχαν το ίδιο αποτέλεσμα με δράση μόνο αν αποσιωπήσουν τον DRD4 [345].

Με βάση το ειδικό προφίλ έκφρασης και την ειδικότητα των υποδοχέων ντοπαμίνης υπέθεσαν πως ο DRD4 δεν λειτουργεί ως υποδοχέας πρόσδεσης για τον δάγκειο αλλά εξυπηρετεί ένα μονοπάτι σηματοδότησης αναγκαίο για την εσωτερικοποίησή του. Προς τα κάτω του DRD4 υπάρχουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης και επακόλουθης ενεργοποίησης του ERK και της καταστολής του cAMP[346]. Προκειμένου να διαπιστώσουν αν η θεραπεία με DHBTs δρα σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια έδωσαν ντοπαμίνη στα HEK293 παρουσία του SKI-417616 και παρουσία διαλύτη(DMSO) και παρατήρησαν πως παρουσία του SKI-417616 αναστέλλεται η επαγόμενη από τη ντοπαμίνη ενεργοποίησης της ERK ενεργότητας. Επειδή ο αναστολέας εμποδίζει την ενεργοποίηση της ERK υπέθεσαν πως η αντιική του δράση ίσως οφείλεται εν μέρει σε αυτό. Για να το εξακριβώσουν χρησιμοποίησαν τον ειδικό αναστολέα έναντι της φωσφορυλίωσης της ERK U0126. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της ERK οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη αναστολή του DENV-2 υποδηλώνοντας πως τα DHBTs επηρεάζουν την αντιγραφή του DENV μέσω ανταγωνισμού της DRD4 σηματοδότησης και της επακόλουθης αναστολής της προς τα κάτω ERK σηματοδότησης [345]. Έτσι φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στη μόλυνση με τον ιό του δάγκειου πυρετού και τον υποδοχέα 4 της ντοπαμίνης (DRD4).

Επίσης, ξανά μέσω φαρμακευτικού παράγοντα, έχει βρεθεί και συσχέτιση του DENV με τον υποδοχέα 2 της ντοπαμίνης (D2R). Η προχλωροπρομαζίνη (PCZ) ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα 2 της ντοπαμίνης (D2R) και εγκεκριμένο φάρμακο εναντίον της ναυτίας, του πονοκέφαλου και του εμετού που αποτελούν συχνά συμπτώματα σε ασθενείς μολυσμένους με τον DENV [347] έχει αναφερθεί να έχει αντιική δράση έναντι του ιού τόσο σε επίπεδο *in vitro* όσο και σε επίπεδο *in vivo*. Η αποτελεσματικότητά της στηρίζεται στην αναστολή της μεσολαβούμενης από κλαθρίνη ενδοκύττωσης του ιού [348]. Στη μελέτη που έγινε οι ερευνητές χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι του DENV παρατήρησαν πως παρουσία της PCZ εμποδίζεται η μεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωση του ιού σε δόσοεξαρτώμενο τρόπο [348] οπότε διαπίστωσαν πως ο αναστολέας εμποδίζει τη πρόσδεση του ιού στη κυτταρική επιφάνεια. Για να ελέγξουν το ρόλο του D2R στην παρατηρούμενη αναστολή της πρόσδεσης του ιού στην κυτταρική επιφάνεια παρουσία του αναστολέα, χρησιμοποίησαν ειδικό αντίσωμα και ειδικό προσδέτη για τον D2R και είδαν επίσης μείωση της πρόσδεσης του ιού, οπότε συμπέραναν πως η PCZ εμποδίζει τη πρόσδεση του δάγκειου στη κυτταρική επιφάνεια σε D2R-εξαρτώμενο τρόπο. Για να εξακριβώσουν κατά πόσο η ανασταλτική δράση της PCZ εξαρτάται από

τον D2R έλεγξαν την αντιϊκή της δράση σε κύτταρα που εκφράζουν τον D2R και σε κύτταρα που τον έχουν σιγήσει οπότε και είδαν αντιϊκή δράση μόνο στα πρώτα. Έτσι η PCZ, εμποδίζοντας την μεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωση, μπορεί να αναστείλει τη πρόσδεση του DENV στον D2R στη κυτταρική επιφάνεια και να εμποδίζει την ιϊκή είσοδο [348].

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως η PCZ, που ανήκει στη τάξη των φαινοθειαζινών των αντιψυχωτικών παραγόντων [349] έχει αποδειχθεί δραστική και έναντι του HCV που επίσης ανήκει στους φλαβοϊούς, στοχεύοντας την ιϊκή είσοδο στο κύτταρο [350]. Συγκεκριμένα ένα συστατικό με δομή παρόμοια με τη PCZ, η χλωροπρομαζίνη έχει αναφερθεί να εμποδίζει την εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκύττωση του HCV [351], η οποία είναι σημαντική για την είσοδο των μελών της οικογένειας Flaviviridae. [351, 352].

Μία άλλη συσχέτιση ανάμεσα στους ιούς της οικογένειας Flaviviridae και της μεταβολικής οδού της ντοπαμίνης εμφανίζεται μέσω των micro-RNAs και συγκεκριμένα μέσω του miR491 που έχει δειχθεί αφενός να ενισχύει την αντιγραφή του HCV και αφετέρου να μειώνει την έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) [353] [354]. Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικά RNAs μήκους περίπου 21 νουκλεοτιδίων. Ρυθμίζουν περίπου το 30% του DNA στο γονιδίωμα [355] και μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση σε πολλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένου του μεταγραφικού, μετα-μεταγραφικού, μεταφραστικού και σε επιγενετικό επίπεδο, συμμετέχοντας έτσι στην ανάπτυξη των ειδών, την εμβρυονική ανάπτυξη, τον μεταβολισμό και την εμφάνιση ασθενειών [355].

Όπως έχει δειχθεί, το miRNA 491 καταστέλλοντας το μονοπάτι PI3K-AKT και ενισχύντάς την αντιγραφή του HCV, εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντιγραφής του. [353]. Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν το miR 491 να προκαλεί μία αξιοσημείωτη μείωση στην έκφραση του μεταφορέα της ντοπαμίνης (DAT) ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση των εξωκυττάρων επιπέδων της ντοπαμίνης [354], δρώντας στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και επηρεάζοντας έτσι τη νευρωνική μεταβίβαση της ντοπαμίνης. Ο DAT έχει καθοριστικό ρόλο στο τερματισμό της σηματοδότησης της ντοπαμίνης και στην επαναπλήρωση των κυστιδίων [356] και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον μεταφορέα ντοπαμίνης είναι το μέλος 3 της οικογένειας φορέα διαλυτής ουσίας 6 (solute carrier family 6 member 3-SLC6A3) που ανήκει στην SLC6 οικογένεια των μεταφορέων [357, 358]. Η 3' UTR του SLC6A3 mRNA περιέχει μία διαδοχική επανάληψη 40 βάσεων που αναφέρεται ως πολυμορφισμός ποικίλλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (Variable number tandem repeat-VNTR) [359] και η περιοχή δράσης του miR-491 είναι στη VNTR αλληλουχία στη 3 UTR του DAT. Πιο συγκεκριμένα η ρυθμιστική δράση του miR491 εξαρτάται από τον αριθμό επαναλήψεων της VNTR.

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε οι ερευνητές χρησιμοποιώντας βιοπληροφορική πρόβλεψη, ανάλυση της δραστηριότητας της εκφραζόμενης λουσιφεράσης, μελέτη των επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών και των επιπέδων ενεργότητας βρήκαν ότι το miRNA 491 στοχεύει τη SLC6A3 3' UTR και

ρυθμίζει την έκφραση του DAT στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο και ακόμη πως το miR-491 στοχεύει τη VNTR περιοχή στη 3' UTR του SLC6A3 [360].

Συγκεκριμένα κατασκευάστηκαν πλασμίδια με το γονίδιο SLC6A3 με διαφορετικές επαναλήψεις (VNTRs) και ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση τα οποία μεταφέρθηκαν σε SK-N-SH κύτταρα και ελέγχθηκε η έκφραση της λουσιφεράσης 24 ώρες μετά τη μόλυνση με τα miRNA. Οι ερευνητές παρατήρησαν πως σε επίπεδο RNA το miR 491 μείωσε τα επίπεδα mRNA του SLC6A3 κατά 67% και ο αναστολέας του miR491 αύξησε σημαντικά τα επίπεδα του mRNA κατά 78%. Συνολικά τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως το miR491 μείωσε σημαντικά τη νευρωνική επαναπρόσληψη ντοπαμίνης κατά 53% [360].

Επομένως το miRNA 491 βρέθηκε να ρυθμίζει τον μεταφορέα ντοπαμίνης, ενώ τα αποτελέσματά της μελέτης έδειξαν πως τα miRNAs έχουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση και τη λειτουργία του DAT, ενός στοιχείου-κλειδιού στη σηματοδότηση της ντοπαμίνης [360].

Γ8. Συσχέτιση της DDC με παράγοντες της υποξίας

Έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στη DDC και σε παράγοντες της υποξίας. Συγκεκριμένα αναφέρεται πως απαιτείται ένα βασικό επίπεδο λειτουργίας του HIF-2α για τη φυσιολογική αναπτυξιακή έκφραση της DDC και της DbH σε κύτταρα προγονικά των συμπαθομιμητικών και πως η απώλεια αυτής της λειτουργίας οδηγεί σε προβληματική βιοσύνθεση κατεχολαμινών [361].

Οι Brown et al [362] με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης διαπίστωσαν πως ο HIF προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου της DDC ο οποίος περιέχει δύο σχετιζόμενα με την υποξία στοιχεία (HRE-elements) [362]. Οι ερευνητές δημιουργώντας συνθήκες υποξίας είδαν σε κύτταρα χρωματοφίνης (chromaffin cells: MAH κύτταρα) πως η χρόνια υποξία (2% O₂) επάγει τον HIF 2α αλλά η έκφραση του περιοριστικού ενζύμου υδροξυλάση τυροσίνης και τα επίπεδα των κατεχολαμινών μένουν αμετάβλητα [361]. Επίσης παρατήρησαν πως σε κύτταρα με έλλειψη στον HIF2α υπήρξε δραματική μείωση (5-12 φορές) στα επίπεδα της ντοπαμίνης και της νοραδρεναλίνης σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου ακόμα και στη νορμοξία(21%) κάτι που συνέδεσαν με μείωση στην έκφραση της DDC και της υδροξυλάσης β της ντοπαμίνης (DbH) αλλά όχι της υδροξυλάσης τυροσίνης [361].

Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές χρησιμοποιώντας τεχνικές παρεμβολής στο RNA (RNA interference τεχνικές) για να αποσιωπήσουν το HIF2α δείχνουν σε αυτή τη κυτταροσειρά μια βασική απαίτηση για λειτουργία της HIF 2α για την ανάπτυξη βασικών επιπέδων κατεχολαμινών. Επιπλέον, η καταγεγραμμένη μείωση των επιπέδων κατεχολαμινών στα HIF 2α knockdown κύτταρα είναι λόγω εκλεκτικής ρύθμισης προς τα κάτω των περιφερικών ενζύμων DDC και DbH και όχι του περιοριστικού ενζύμου TH. Ως συμπέρασμα ανάγεται πως ο

HIF-2α απαιτείται για την ανάπτυξη του κατεχολαμινεργικού φαινοτύπου στα συμπαθοαδρενεργικά κύτταρα [361].

Γ9. Το μονοπάτι PI3K-AKT και η εμπλοκή του στη μόλυνση με τους ιούς της οικογένειας *Flaviviridae*.

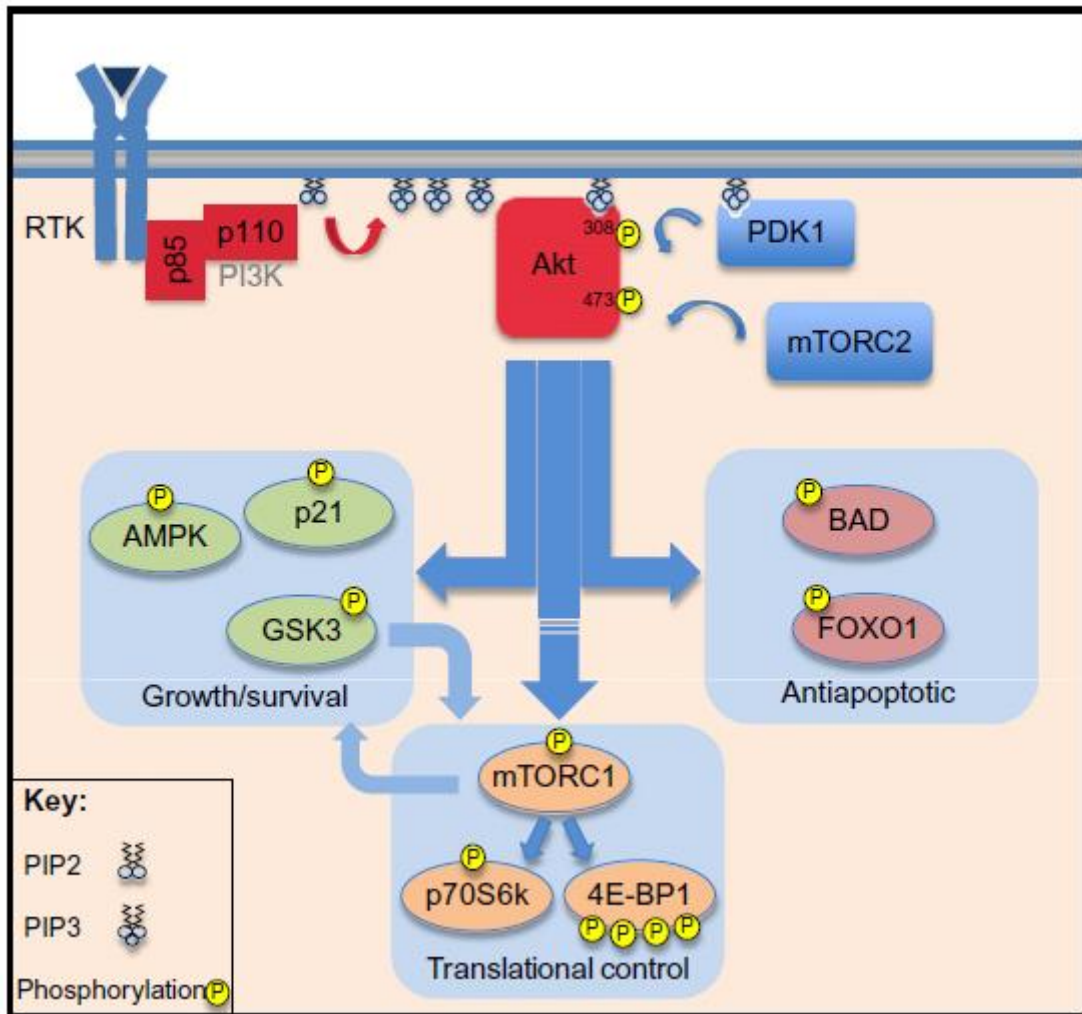
Μια πτυχή ελέγχου της ιϊκής παθογένεσης και της ιϊκής αντιγραφής είναι η εξάρτηση τους στα κύτταρα που μολύνουν. Σε αντίθεση με άλλα παθογόνα όπως τα βακτήρια και οι μύκητες που είναι ικανά για αυτόνομη ανάπτυξη, οι ιοί βασίζονται πλήρως στις κυτταρικές διεργασίες για την αναπαραγωγή τους. Είναι από καιρό γνωστό ότι οι ιοί βασίζονται στο κυτταρικό μηχανισμό για πρωτεϊνσύνθεση : νουκλεοτίδια και δομικά στοιχεία πρωτεϊνών, πολυμεράσες ριβονουκλεϊκού (RNA) και δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) και μεμβράνες. Πιο πρόσφατα έγινε κατανοητό ότι οι ιοί βασίζονται επίσης στην ενδοκυττάρια επικοινωνία [363, 364]. Ειδικότερα, οι ιοί φαίνεται να είναι έμπειροι στον έλεγχο καταρρακτών φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών για δική τους χρήση. Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι οι ιοί απαιτούν τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών για να αναπαραχθούν. Αυτό θα πρότεινε αρχικά ότι οι ιοί θα κέρδιζαν ένα πλεονέκτημα στην αντιγραφή αν προωθούσαν γενικά τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Ωστόσο, απλά η προώθηση της φωσφορυλίωσης όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών δεν είναι πιθανό να είναι πλεονεκτική για τους ιούς, αφού η δραστηριότητα ορισμένων κινασών του ξενιστή(και τα επακόλουθα γεγονότα φωσφορυλίωσης) είναι γνωστά να ανταγωνίζονται την ιϊκή αντιγραφή. Έτσι μια μη ειδική αύξηση της φωσφορυλίωσης θα πυροδοτούσε αντιϊκή απάντηση. Οι ιοί έχουν ανάγκη για ειδικότητα στην ενεργοποίηση των κινασών και των φωσφατασών του ξενιστή. Έτσι, συμπεραίνουμε πως οι ιοί χρειάζονται να ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που προωθούν την αντιγραφή τους [365, 366] και να μπλοκάρουν ή να αποφεύγουν αντιϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια [367]. Ο έλεγχος της δραστηριότητας των κινασών μπορεί να προάγει τη μετάφραση πρωτεϊνών [368], να αυξήσει τη μεταβολική δραστηριότητα, να οδηγήσει τη κυτταρική διαίρεση και να εμποδίσει τη κυτταρική απόπτωση. Όλα αυτά είναι πλεονεκτικά για την ιϊκή αντιγραφή. Επιπλέον, πολλοί ιοί παράγουν ιϊκές πρωτεΐνες που χρειάζονται άμεση φωσφορυλίωση για να λειτουργήσουν σωστά αλλά δεν κωδικοποιούν κινάση που θα πραγματοποιήσει τη φωσφορυλίωση[367]. Αυτό υπαγορεύει ότι πρέπει να στρατολογήσουν τη δραστηριότητα κινάσης από το ξενιστή τους. Με το κεντρικό ρόλο που διαδραματίζει το μονοπάτι PI3K-AKT στον έλεγχο των κυτταρικών λειτουργιών, είναι λογικό ότι ο έλεγχος ενός τέτοιου σηματοδοτικού κόμβου θα ήταν εξαιρετικά ωφέλιμο σε έναν εισβολέα ιό ο οποίος εξαρτάται από κυτταρικές λειτουργίες.

Μέρος Δ. Το μονοπάτι PI3K-AKT

Δ1. Γενικά στοιχεία

Ο καταρράκτης μεταγωγής του σήματος PI3K-AKT είναι ένας κλασσικός καταρράκτης φωσφορυλίωσης που χρησιμοποιεί τη φωσφορυλίωση τυροσίνης, λιπιδίων και σερίνης-θρεονίνης, για να μετατρέψει εξωτερικά σήματα σε ενδοκυτταρικές αποκρίσεις (εικονα12). Κανονικά η σηματοδότηση μέσω αυτής της οδού ξεκινάει από τη διέγερση ενός υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (RTK) από μια κυτοκίνη ή έναν αυξητικό παράγοντα στην επιφάνεια του κυττάρου.

Η ενεργοποίηση του RTK στρατολογεί και ενεργοποιεί τη PI3K (phosphoinositide-3 kinase). Η PI3K είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από μία καταλυτική p110 και μία ρυθμιστική p85 υπομονάδα [369]. Η PI3K είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της 4-5 διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PIP2) σε 3,4,5-τριφωσφορυλιωμένη φωσφοϊνοσιτίδη (PIP3). Οι περιοχές της μεμβράνης που είναι πλούσιες σε PIP3 χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες που περιέχουν περιοχή ομολογίας πλεκστρίνης όπως το AKT (protein kinase B). Η στρατολόγηση της ανενεργής πρωτεΐνης AKT σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης πλούσιες σε PIP3, οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης της που εκθέτει το βρόγχο ενεργοποίησης του AKT [370]. Σε μικροεπικράτειες πλούσιες σε PIP3 στρατολογείται επίσης και η εξαρτώμενη σε φωσφοϊνοσιτίδη πρωτεϊνική κινάση 1 (PDK1), η κινάση ενεργοποίησης του AKT [371]. Η PDK1 φωσφορυλιώνει το AKT στη θρεονίνη 308 (Thr308) του εκτεθειμένου βρόγχου ενεργοποίησης, ενεργοποιώντας το AKT και οδηγώντας σε δεύτερη φωσφορυλίωση του AKT στη σερίνη 473 (Ser73) από μία κινάση που θεωρείται να είναι η mTORC2 που επιπλέον ενισχύει τη δραστηριότητα κινάσης [370, 372]. Το ενεργοποιημένο AKT μπορεί να ελέγξει τη σηματοδότηση πολλών μονοπατιών κλειδιών που υποστηρίζουν διαφορετικού τύπου κυτταρικές λειτουργίες (εικονα12). Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT προωθεί τη κυτταρική ανάπτυξη, το πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση μέσω της φωσφορυλίωσης και της απενεργοποίησης αναστολέων κινασών του κυτταρικού κύκλου όπως το p21 και της αδρανοποίησης παραγόντων μεταγραφής που μπορούν να αναστείλουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και να προωθήσουν την απόπτωση όπως είναι η οικογένεια των πρωτεϊνών των πτερυγίων (πχ FOXO1) [373]. Το AKT μπορεί επίσης να παρεμποδίσει τις δράσεις κατασταλτικών μεταβολικά κινασών όπως η AMPK1 κι έτσι μπορεί να οδηγήσει στη προς τα άνω ρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας στο κύτταρο.[374]



Εικόνα 13. Επισκόπηση του PI3K/AKT μονοπατιού. Η εικόνα δείχνει τις 2 υπομονάδες του PI3K/AKT (p85 και p110) προσδεδεμένες σε ένα ενεργό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (κλασσικό παράδειγμα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και του υποδοχέα ινσουλίνης). Η ενεργή PI3K καταλύει τη πρόσδεση μιάς φωσφορικής ομάδας στη 3 θέση του PIP4,5-διφωσφό ώστε να δημιουργηθεί PIP3. Η τριφωσφορική ινοσιτόλη εξυπηρετεί ως προσδέτης συγγένειας για την ομολογία πλεκστρίνης της κινάσης του AKT PDK1 και του AKT, με τη πρόσδεση του PIP3 από την επικράτεια PH του AKT να εξυπηρετεί την ελευθέρωση της επικράτειας ενεργοποίησης του AKT. Η φωσφορυλίωση από την PDK1 στη θέση T308 οδηγεί σε δεύτερη φωσφορυλίωση στη S473. Το ενεργό AKT θα φωσφορυλιώσει διάφορες πρωτεΐνες-στόχους προς τα κάτω που ελέγχουν τη κυτταρική αύξηση (AMPK, p21 και GSK3 παρουσιάζονται) και τον έλεγχο της μετάφρασης (mTOR και οι προς τα κάτω τελεστές p70S6K και 4E-BP1 παρουσιάζονται) και θα δράσει για να εμποδίσει την απόπτωση (η αναστολή της φωσφορυλίωσης των BAD και FOXO1 παρουσιάζονται) [375]

Το AKT προάγει επίσης τη κυτταρική μετάφραση μέσω της φωσφορυλίωσης της GSK3 και της ενεργοποίησης του mTORC1, ενός συμπλόκου κινάσης που ενεργοποιεί τη ριβοσωμική S6 κινάση και αναστέλλει το μεταφραστικό καταστολέα eIF4E-BP1 (4E-BP1) [376]. Η ενεργοποίηση του AKT από το mTORC1 είναι έμμεση. Το AKT φωσφορυλιώνει και καταστέλλει το σύμπλοκο

χαμαρτίνης και τουμπερίνης(TSC1 και TSC2) [377]. Η αναστολή του TSC1/TSC2 επιτρέπει Rheb-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης του συμπλόκου mTORC1. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάση (p70S6K) και απενεργοποιεί το καταστολέα της μετάφρασης 4EBP1, οδηγώντας σε αυξημένη μετάφραση.

Η δραστηριότητα του AKT ανταγωνίζεται την αποπτωτική σηματοδότηση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω άμεσων δράσεων όπως η αναστολή προαποπτωτικών παραγόντων (πχ φωσφορυλίωση και αναστολή του BAD [378], ενός προαποπτωτικού μέλους της BCL-2 οικογένειας) και μέσω πιο έμμεσων δράσεων, όπως η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα πυρηνικού παράγοντα κάπα Β (NF-κΒ) [379] και όπως αναφέρθηκε νωρίτερα την απενεργοποίηση του FOXO1. Με δράσεις που επηρεάζουν πολλαπλούς καταρράκτες φωσφοπρωτεϊνών που εμπλέκονται σε διαφορετικές βασικές πλευρές της κυτταρικής λειτουργίας, το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT είναι ένας βασικός υποψήφιος για μια κινάση «διανομέα» της οποίας η ενεργοποίηση έχει ένα διαφορετικό σύνολο συνεπειών, όλες εκ των οποίων επικεντρώνονται στη προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης και στην αύξηση της μεταβολικής ικανότητας του κυττάρου.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, ο έλεγχος ενός τέτοιου σηματοδοτικού κόμβου όπως είναι το μονοπάτι PI3K/AKT από έναν εισβολέα ιό, ο οποίος εξαρτάται από τις κυτταρικές λειτουργίες, θα ήταν εξαιρετικά ωφέλις. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από εκτενή έρευνα η οποία βρίσκει ιϊκή κυριαρχία σε αυτό το μονοπάτι σε διάφορα πλαίσια. [363, 380].

Όπως πολλοί ιοί, οι φλαβοιοί DENV και ο ιός της εγκεφαλίτιδας[381] πυροδοτούν την ενεργοποίηση της PI3K/AKT μέσα στις πρώτες ώρες της μόλυνσης [381]. Γι αυτούς τους ιούς ο μηχανισμός της ενεργοποίησης είναι άγνωστος, αλλά η ενεργοποίηση φαίνεται να είναι παροδική και περιέργως δε φαίνεται να επηρεάζει την ιϊκή αντιγραφή με κανένα τρόπο. Η ηπατίτιδα C, ένας άλλος φλαβοϊός έχει δειχθεί να προωθεί τη κυτταρική επιβίωση μέσω της ενεργοποίησης ενός προς τα κάτω τελεστή της PI3K/AKT, της mTOR κινάσης [382]. Αυτή η ενεργοποίηση πραγματοποιείται από τη μη δομική πρωτεΐνη NS5A η οποία έχει την ικανότητα να προσδέεται άμεσα στο FKBP38, έναν αρνητικό ρυθμιστή του mTOR [383]. Η συσχέτιση του FKBP38 με το mTORC1 μπλοκάρεται από τη πρόσδεση της NS5A, πυροδοτώντας έτσι τη mTORC1 δραστηριότητα, προωθώντας τη μετάφραση και περιορίζοντας την απόπτωση.

Δ2. Το PI3K/AKT στην αντιϊκή απόκριση

Το μονοπάτι PI3K είναι ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται στη κυτταρική άμυνα απέναντι σε εισβολείς παθογόνα. Όπως αναφέρθηκε προωτέρα τα σήματα φωσφορυλίωσης είναι ο σκελετός της αντιϊκής απάντησης. Η σηματοδότηση μέσω του AKT αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο να έχει ένα ρόλο σε αυτή την απόκριση [384]. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σωστό για την απόκριση

του ξενιστή σε ιντερφερόνη όπου η PI3K και η AKT σηματοδότηση ενισχύουν τη μετάφραση γονιδίων που διεγείρουν την ιντερφερόνη μέσω των δράσεων των mTOR και p70S6K που πυροδοτούν τη μετάφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε ιντερφερόνη [385]. Επίσης, το AKT μέσω της συνεισφοράς στην ενεργοποίηση του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα, έχει ρόλο και στη πυροδότηση της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών [386].

Δ3 Το μονοπάτι PI3K-AKT και ο ιός HCV

Η σχέση ανάμεσα στον HCV και το μονοπάτι PI3K-AKT έχει μελετηθεί εκτενώς. Είναι γνωστό ότι στη μόλυνση με τον HCV υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση της μη δομικής ιϊκής πρωτεΐνης NS5A και της υπομονάδας p85 της PI3K που οδηγεί στην ενεργοποίησή της και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT [387] [388]. Επιπλέον η πρωτεΐνη core του HCV μπορεί να επάγει τη φωσφορυλίωση της σερίνης 473 του AKT χωρίς εμφανή επίδραση στη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 308 και συνεπώς να εξασθενήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης [389, 390]. Ωστόσο λίγα ήταν γνωστά σχετικά με το πως η επίδραση του HCV στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT θα μπορούσε να επηρεάζει την ιϊκή αντιγραφή. Σε πρόσφατη σχετικά μελέτη αναφέρεται πως ο HCV ενεργοποιεί το AKT γρήγορα και παροδικά στα πρώτα στάδια της μόλυνσης προκειμένου να ενισχύσει την είσοδό του στα κύτταρα. Αυτή η ενεργοποίηση πυροδοτείται από την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην E2 πρωτεΐνη του φακέλου του HCV και των συνυποδοχέων αυτής CD81 και claudin-1 [391].

Σε άλλη, πρόσφατη σχετικά μελέτη αναφέρεται το μονοπάτι PI3K/AKT, γνωστό για το ρόλο του στη κυτταρική επιβίωση [392, 393] να έχει καθοριστικό ρόλο σε ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της χρόνιας μόλυνσης με τον HCV που είναι η σταθερή, χαμηλών επιπέδων ιϊκή αντιγραφή [394]. Συγκεκριμένα αναφέρεται οι ενεργότητες των PI3K και AKT, όπως και η δράση του προς τα κάτω στόχου τους mTOR, να είναι αυξημένες σε κύτταρα που εκφράζουν το ρεπλικόν του HCV σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα ελέγχου και πως η αποσιώπηση του PI3K/AKT μονοπατιού οδηγεί σε αύξηση της αντιγραφής του ιού [394]. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρείται και σε σίγηση του mTOR [394].

Αν και η υπεύθυνη κινάση για τη φωσφορυλίωση της NS5A παραμένει να ταυτοποιηθεί *in vivo*, ο στόχος των AKT και mTOR, p70S6 φωσφορυλιώνει την NS5A *in vitro* και η αναστολή της ενεργότητας του mTOR από τη ραπαμυκίνη μειώνει τη φωσφορυλίωση της NS5A [395]. Έτσι προτείνεται πως η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-AKT-mTOR επάγει τη φωσφορυλίωση της NS5A, οδηγώντας σε μειωμένη αντιγραφή του HCV [394].

Όπως είναι γνωστό, σε σταθερές κυτταρικές σειρές που περιέχουν την αυτοαντιγραφόμενη υπογονιδιωματική αλληλουχία του HCV (HCV replicon) και που καλλιεργούνται για μακρές χρονικές περιόδους τα επίπεδα της αντιγραφής του ιού είναι συνεχή [394] κάτι που υποδηλώνει ότι ο ιός αναπτύσσει

ένα μηχανισμό για να διατηρεί χαμηλά και σταθερά τα επίπεδα αντιγραφής του [396] [397].

Οι Mannova και Baretta [394] για να διερευνήσουν αυτό το μηχανισμό καλλιέργησαν παρουσία και απουσία ορού, κύτταρα huh7 που εκφράζουν σταθερά το ρέπλικον του HCV γονοτύπου 1β και μη μολυσμένα κύτταρα ελέγχου και παρατήρησαν αυξημένα επίπεδα του pAKT στα κύτταρα που εκφράζουν τον HCV και στις 2 συνθήκες σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Σε συμφωνία με αυτό, τα κύτταρα με το ρέπλικον του HCV ήταν ανθεκτικά στην επαγόμενη από λιμοκτονία, λόγω έλλειψης ορού, απόπτωση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου όπως προσδιορίστηκε με την συγκέντρωση της κασπάσης 3 [394]. Παράλληλα, δίνοντας την ίδια συγκέντρωση του ειδικού αναστολέα της PI3K Ly294002 σε κύτταρα με το ρέπλικον και σε κύτταρα ελέγχου είδαν αναστολή της ενεργότητας του AKT μόνο εν μέρει στα κύτταρα με το ρέπλικον σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, όπου αντίθετα ήταν εξαιρετικά χαμηλά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του AKT, ενώ δεν επηρεάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της AKT. Για να προσδιοριστεί η επίδραση της PI3K στην αντιγραφή του HCV καλλιέργησαν κύτταρα με ρέπλικον παρουσία του ειδικού αναστολέα της PI3K Ly294002 για 4-24 ώρες και είδαν σε επίπεδο RNA και σε επίπεδο ιϊκής πρωτεΐνης NS5A πως η αναστολή της PI3K οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα του HCV μετά από 16 και 24 ώρες [394].

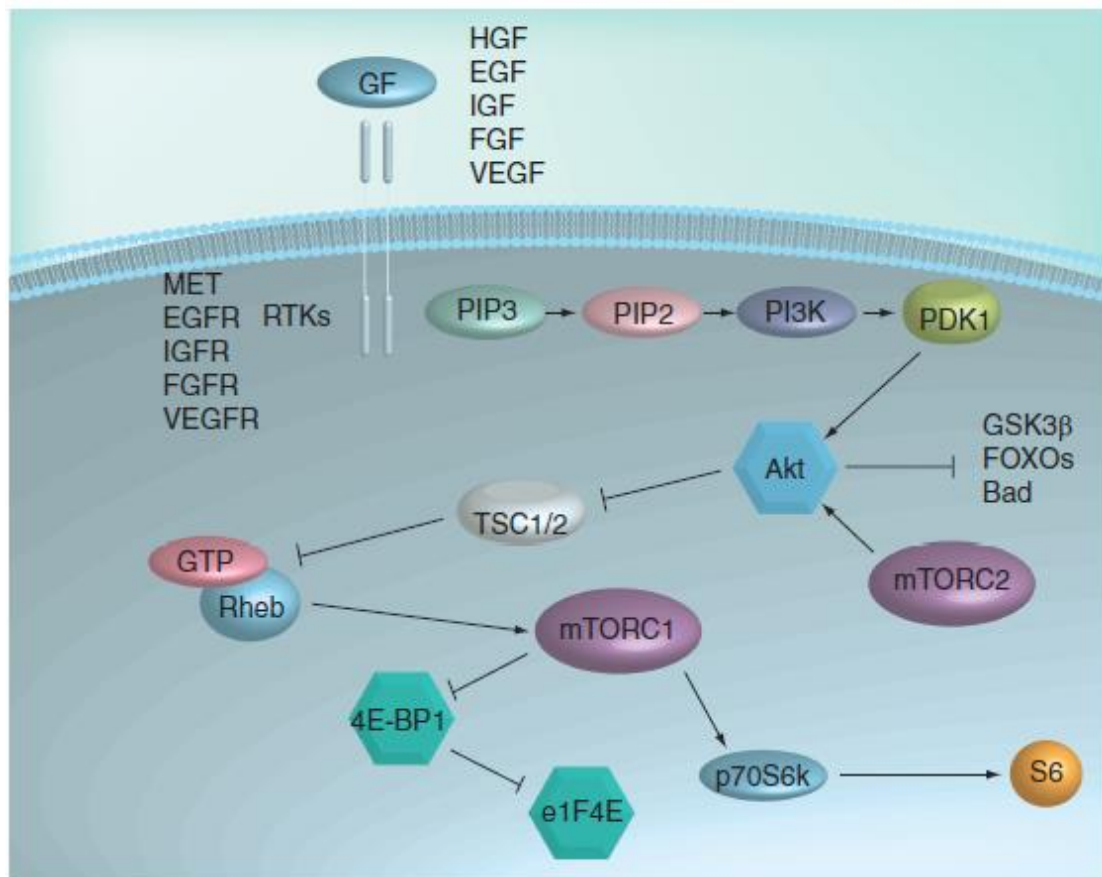
Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα, στην ίδια μελέτη, βρέθηκε με πρωτεομική προσέγγιση πως το N-Ras που είναι γνωστός ενεργοποιητής του μονοπατιού PI3K/AKT [398] είναι ενισχυμένο στα μολυσμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη μολυσμένα κύτταρα ελέγχου [394]. Στον αντίποδα, η τεχνικά επαγόμενη μείωση της έκφρασης του N-Ras οδήγησε σε αυξημένη αντιγραφή του HCV. Μια παρόμοια αύξηση παρατήρησαν στην αντιγραφή του HCV σε κύτταρα που τους έβαλαν τον αναστολέα της PI3K LY294002 και σε κύτταρα όπου σίγησαν το mTOR (με mTOR-siRNA). Έτσι αναφέρουν πως η N-Ras σηματοδότηση μέσω του PI3K-AKT μονοπατιού και του mTOR συνεισφέρει στη διατήρηση σταθερών επιπέδων της αντιγραφής του HCV [394].

Αυξανόμενες είναι οι αποδείξεις που υποδεικνύουν ανώμαλη ενεργοποίηση του PI3K/AKT/mTOR σηματοδοτικού μονοπατιού στο HCC καρκίνο. Ως γνωστόν, η μόλυνση με HCV είναι η δεύτερη πιο κοινή αιτία ηπατοκυτταρικού (HCC)καρκίνου, μετρώντας κατά προσέγγιση 20% των περιπτώσεων όλων των ηπατοκυτταρικών καρκίνων[399]. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ενεργοποίηση ορισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών ίσως συνεισφέρει στη χημειοαντίσταση στον HCC. Ανάμεσα σε αυτά, η ενεργοποίηση του PI3K-AKT-mTOR σηματοδοτικού μονοπατιού έχει δειχθεί να συνεισφέρει στην αντίσταση σε ταξάνες και άλλα φάρμακα που δρουν σε μικροσωληνίσκους [400]. Εις βάθος γονιδιακές αναλύσεις καρκίνου αποκάλυψαν πρόσφατα ότι στοιχεία του μονοπατιού PI3K-AKT συχνά μεταλλάσσονται σε διάφορες ανθρώπινες κακοήθειες, περιεχομένου του HCC καρκίνου. Ο Sahin (Sahin et al.) έδειξε ότι η φωσφορυλίωση του mTOR και η έκφραση του προς τα κάτω τελεστή

p70S6k είναι ρυθμισμένες προς τα άνω στο 45% των περιπτώσεων ηπατοκυτταρικού καρκίνου[401].

Ενδιαφέρον είναι πως μία πρόσφατη μελέτη από τον Zhou (Zhou et al.) έδειξε πως το μονοπάτι PI3K/mTOR/AKT είναι σημαντικά πιο ενεργοποιημένο σε υψηλού βαθμού όγκους και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με HCC [402]. Έδειξε με ανοσοϊστοχημεία πως η φωσφορυλίωση των AKT και S6 ήταν ισχυρά συσχετισμένη με φτωχή πρόγνωση και φτωχό προσδόκιμο επιβίωσης [402].

Ορισμένοι μηχανισμοί του μονοπατιού PI3K/AKT-mTOR που απορρυθμίζονται στον HCC είναι: μεταλλαγή αύξησης της λειτουργίας ή ενίσχυση της PIK3CA, της p110α καταλυτικής υπομονάδας [403], ενίσχυση ή αυξημένη δραστηριότητα της PIK3CB, της p110β καταλυτικής υπομονάδας [404], αύξηση ή ενίσχυση των 3 ισομορφών του AKT (κυρίως AKT1 και AKT2, ενώ οι AKT3 μεταλλαγές είναι πολύ σπάνιες) [405, 406]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο HCV έχει αναφερθεί να αυξάνει την έκφραση του N-Ras σε HCC κύτταρα, το οποίο ύστερα ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K. Όταν κύτταρα Huh7 μολύνθηκαν με τον HCV in vitro υπήρξε αύξηση έξι φορές στην έκφραση του N-Ras και αύξηση τέσσερις φορές στη φωσφορυλίωση του AKT υποδεικνύοντας έναν άμεσο ρόλο του HCV στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT στο HCC.[394]



Εικόνα 14. Το PI3K/AKT/mTOR μονοπάτι. Σε απόκριση στον ερεθισμό από τις GFs, οι RTKs πυροδοτούν την PI3K ενεργότητα τάξης 1. Η PI3K παράγει την PIP3 από την PIP2. Η PIP3 στρατολογεί στη μεμβράνη την AKT και την PDK1 όπου το AKT

φωσφορυλιώνεται στη Thr308 από την PDK1. Η mTORC2 φωσφορυλιώνει την AKT στη Ser473, που οδηγεί σε πλήρη ενεργοποίηση του AKT. Όταν ενεργοποιηθεί, το AKT απενεργοποιεί διάφορα υποστρώματα, όπως είναι τα GSK3b, FOXOs and Bad. Το AKT επίσης φωσφορυλιώνει και αναστέλλει τη TSC2 ενεργότητα, η οποία σχετίζεται με τη TSC1. Η απενεργοποίηση του συμπλέγματος TSC1/TSC2 επιτρέπει τη συσσώρευση της μικρής G πρωτεΐνης Rheb σε μία GTP προσδεσμένη κατάσταση. Η Rheb-GTP ύστερα ρυθμίζει προς τα άνω την ενεργότητα της mTORC1, αν και ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί πλήρως. Το mTORC1 φωσφορυλιώνει τους προς τα κάτω τελεστές p70S6k and 4E-BP1, όπου και οι δύο είναι κρίσιμοι για τη μετάφραση. Η ριβοσωμική S6 πρωτεΐνη είναι προς τα κάτω τελεστής της p70S6k. Το σύμπλεγμα TSC1/TSC2 απαιτείται για να ενεργοποιηθεί το mTORC2. Τα βέλη υποδηλώνουν τα γεγονότα ενεργοποίησης, ενώ οι κάθετες γραμμές τα γεγονότα αναστολής. GF: αυξητικός παράγοντας, GTP: τριφωσφορική γουανοσίνη, PIP2: φωσφοτιϊνοσιτόλη 4,5 - διφωσφορική, PIP3: φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (3-5) - τριφωσφορική; RTK: υποδοχέας κινάσης τυροσίνης.[407]

Τέλος, έχει διερευνηθεί και ο ρόλος των miRNAs στην αντιγραφή του HCV σε κύτταρα ηπατώματος [353]. Με ανάλυση miRNA array διερευνήθηκαν τα miRNAs που η έκφρασή τους τροποποιείται στη μόλυνση με HCV και το miR-491 βρέθηκε αφενός να ρυθμίζεται προς τα κάτω, αφετέρου να εμπλουτίζει την αντιγραφή του HCV τόσο σε κύτταρα που περιέχουν ρέπλικον του HCV όσο και σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό [353]. Στη μελέτη είδαν πως δεν αυξάνονται με την επιβαλλόμενη έκφραση του miRNA-491 ούτε η HCV IRES ενεργότητα ούτε ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός [353], που αποτελούν πιθανούς μηχανισμούς για την αύξηση του ιού [408]. Περαιτέρω διερεύνηση αποκάλυψε πως το miRNA 491 κατέστειλε το μονοπάτι PI3K-AKT υποδηλώνοντας πως αυτό θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για την ενίσχυση της αντιγραφής του HCV από το miRNA 491.

Συγκεκριμένα, σε κύτταρα όπου εισήγαγαν το miRNA-491 με διαμόλυνση (transfection), βρέθηκε μειωμένη η φωσφορυλίωση του AKT και με περαιτέρω διερεύνηση βρέθηκε πως το miR-491 κατέστειλε ειδικά το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT [353]. Με την αναστολή της PI3K με τον ειδικό αναστολέα της LY294002 τα επίπεδα του RNA του HCV διπλασιάστηκαν σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου, όπως αύξηση του ιού, μικρότερη, παρατηρήθηκε και σε κύτταρα διαμολυσμένα με το miRNA-491. Όταν κύτταρα διαμολυσμένα με το miR491 καλλιεργήθηκαν με τον LY294002 τα επίπεδα της αντιγραφής του HCV ενισχύθηκαν σε παρόμοιο βαθμό με κύτταρα ελέγχου για το miRNA 491 που καλλιεργήθηκαν επίσης παρουσία του αναστολέα [353]. Εφόσον δεν έχει παρατηρηθεί κάποια επιπλέον δράση του miRNA-491 ύστερα από καταστολή του μονοπατιού PI3K-AKT, υποστηρίζεται πως η αναστολή του μονοπατιού είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη ενίσχυση του RNA του HCV από το miRNA-491 [353].

Δ4. Το μονοπάτι PI3K/AKT και ο ιός DENV

Είναι γεγονός πως η μόλυνση με φλαβοϊούς οδηγεί σε απόπτωση [409], αφού στα κύτταρα του ξενιστή ενεργοποιούνται βιοχημικά διακριτά μονοπάτια μετά την εγκαθίδρυση της μόλυνσης. Πολλά είναι τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά συστήματα που εμπλέκονται στην επαγωγή της απόπτωσης σε μολυσμένα με δάγκειο κύτταρα, ωστόσο οι μοριακές διαδικασίες δεν είναι καλά χαρακτηρισμένες [410]. Αυξανόμενες αποδείξεις υποδηλώνουν την εμπλοκή του μονοπατιού PI3K-AKT, το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική επιβίωση δρώντας αντι-αποπτωτικά [380, 381] στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στη μόλυνση με τον δάγκειο ιό *in vitro* και *in vivo* [409].

Συγκεκριμένα, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως το υπογενωμικό RNA (sgRNA) του δάγκειου ιού έχει μικρή επίδραση στον ιϊκό κυτταρικό κύκλο, αλλά η παραγωγή του είναι απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητα σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας και πως το μονοπάτι με το οποίο το sgRNA οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο είναι το PI3K-AKT μέσω ενός μηχανισμού σχετιζόμενου με το Bcl-2 [177]. Στη μελέτη που έγινε οι ερευνητές κατασκεύασαν ένα μεταλλαγμένο ιό με παντελή έλλειψη σε sgRNA και έλεγξαν την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT σε κύτταρα μολυσμένα με τον DENV-2 και σε κύτταρα μολυσμένα με το μεταλλαγμένο ιό. Οι ερευνητές είδαν πως η ποσότητα του φωσφορυλιωμένου AKT ήταν υψηλή στα κύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον φυσικού τύπου ιό και σε εκείνα με το μεταλλαγμένο μέχρι τις 24h μετά τη μόλυνση, αλλά στα μετέπειτα στάδια της μόλυνσης τα πρωτεϊνικά επίπεδα του φωσφορυλιωμένου AKT μειώθηκαν σταδιακά στα κύτταρα με τον DENV-2 αλλά όχι και σε εκείνα με το μεταλλαγμένο. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά την ιϊκή μόλυνση και ο φυσικού τύπου ιός και ο μεταλλαγμένος ενεργοποιούν τη φωσφορυλίωση του AKT αλλά τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του διατηρήθηκαν περισσότερο στα κύτταρα που ήταν μολυσμένα με το μεταλλαγμένο ιό σε σχέση με εκείνα που είχαν μολυνθεί με τον φυσικού τύπου, προωθώντας έτσι την επιβίωση [177]. Συνεπώς σε αυτή τη μελέτη υποδεικνύεται ο καθοριστικός ρόλος του μονοπατιού PI3K-AKT στη παρατητούμενη απόπτωση που παρατηρείται κατά τη μόλυνση με τον DENV.

Άλλα δεδομένα υποστηρίζουν πως το μονοπάτι PI3K/AKT ρυθμίζει την αντιγραφή του DENV με άλλους τρόπους εκτός της κυτταρικής επιβίωσης [411]. Οι ερευνητές, μελετώντας έναν ισχυρό αναστολέα της PDK1, το AR-12 το οποίο είχε αναφερθεί να εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό πολλών ιών αιμορραγικού πυρετού [412] διαπίστωσαν πως ο δεδομένος αναστολέας εμποδίζει την ιϊκή αντιγραφή μέσω της αναστολής της φωσφορυλίωσης του AKT αλλά δεν αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο μετά τη μόλυνση. Έτσι προτείνουν πως το PI3K/AKT μονοπάτι ρυθμίζει την αντιγραφή του DENV με άλλους τρόπους εκτός της κυτταρικής επιβίωσης [411].

Συγκεκριμένα, η μελέτη του αναστολέα έδειξε πως η καλλιέργεια κυττάρων Huh7 παρουσία του AR-12 (προεπώαση) καταστέλλει την αντιγραφή 4 σερότυπων του δάγκειου χωρίς να επάγει τη κυτταρική απόπτωση στα κύτταρα του ξενιστή αφού παρουσία του AR-12 υπήρξε καταστολή του ιού χωρίς να ανιχνεύεται LDH (LDH-release assays) [411]. Χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι του ιού οι ερευνητές είδαν πως η αναστολή στον πολλαπλασιασμό του παρουσία του αναστολέα δεν οφείλεται σε ανατολή της πρόσδεσής του στα κύτταρα του ξενιστή [411] και επίσης πως η αναστολή συμβαίνει σε δοσοεξαρτώμενο τρόπο οπότε υπέθεσαν ότι το AR-12 εμποδίζει τον ιό αφού εισέλθει στα κύτταρα [411]. Ο AR-12 είναι γνωστός αναστολέας του μονοπατιού PI3K-AKT [413]. Οι ερευνητές για να επιβεβαιώσουν τον ρυθμιστικό ρόλο του AKT στον πολλαπλασιασμό του δάγκειου έδωσαν ειδικό αναστολέα έναντι της φωσφορυλίωσης του AKT σε κύτταρα Huh7 και έλεγξαν τον πολλαπλασιασμό του ιού οπότε και είδαν μείωση της NS1 [411]. Στη συνέχεια διερεύνησαν σε κύτταρα μολυσμένα με τον DENV κατά πόσο ο υπό μελέτη αναστολέας, το AR-12 επηρεάζει την ενεργοποίηση του AKT. Παρουσία του ιού είδαν να αυξάνεται η φωσφορυλίωση του AKT στα μολυσμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη μολυσμένα, αλλά να εξασθενεί παρουσία του AR-12 12 και 24 ώρες μετά τη μόλυνση [411]. Έτσι προτείνουν πως η αντιϊκή δράση του AR-12 στηρίζεται στην εξασθένιση της ενεργοποίησης του AKT χωρίς όμως να εμπλέκεται η απόπτωση.

Παράλληλα υπάρχουν δεδομένα πως οι φλαβοϊοί όπως είναι ο δάγκειος οροτύπου 2 επάγουν την έμφυτη ανοσία της ιντερφερόνης μέσω ενός PI3K εξαρτώμενου NF-κB μονοπατιού [414]. Είναι γνωστό πως η μόλυνση με φλαβοϊούς όπως είναι ο DENV σερότυπου 2 οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης β (IFN-β) με τρόπο εξαρτώμενο από την ιϊκή αντιγραφή και την de novo πρωτεϊνοσύνθεση [414]. Επίσης αναφέρεται πως η ενεργοποίηση του NF-κB είναι απαραίτητη για την επαγωγή της ιντερφερόνης β και πως σε μολύνσεις από φλαβοϊούς η PI3K εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του NF-κB και είναι απαραίτητη για την επαγωγή της IFNβ [414]. Συγκεκριμένα σε μελέτη που διερευνήθηκε ο ρόλος της PI3K στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας κατά τη μόλυνση με DENV2 βρέθηκε πως ο ειδικός αναστολέας της PI3K LY294002 μειώνει τη πυρηνική μετατόπιση του NF-κB p65 και επακολούθως την επαγωγή της ιντερφερόνης β [414].

Μέρος Ε. Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης στην ηπατική νορμοξία

E1. Γενικά στοιχεία

Η τάση του οξυγόνου μπορεί να ασκήσει σημαντική επίδραση στην ιϊκή διάδοση *in vitro* και ενδεχομένως *in vivo* [415]. Γενικά η υποξία περιορίζει την αντιγραφή των ιών που μολύνουν φυσικώς ιστούς που είναι εκτεθειμένοι στο οξυγόνο του περιβάλλοντος και επάγει την ανάπτυξη ιών που φυσικώς στοχεύουν ιστούς που εκτίθενται σε χαμηλή τάση οξυγόνου [415]. Μερικοί ιοί προκειμένου να υποστηρίξουν την αναπαραγωγή τους μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τη βιοενεργητική λειτουργία των κυττάρων προς τη κατεύθυνση της μείωσης της κυτταρικής αναπνοής και συνεπώς της κατανάλωσης οξυγόνου [416].

Από τις αρχές του 20 αιώνα έχουν συγκεντρωθεί στοιχεία που απέδειξαν μία αμφίδρομη σχέση μεταξύ των ιών και των επιπέδων οξυγόνου του ιστού. Σε μοντέλα μόλυνσης ιστοκαλλιέργειας, όταν η τάση οξυγόνου (ή μερική πίεση στη μόλυνση) διατηρείται σε ένα φυσιολογικό επίπεδο *in vivo*, αρκετοί ιοί δείχνουν διαφορετικά επίπεδα αντιγραφής σε σύγκριση με τη συμβατική καλλιέργεια υπό ατμοσφαιρικό οξυγόνο (20% v/v O₂) το οποίο είναι ένα τεχνητό πλαίσιο [417]. Επιπλέον, κάποιοι ιοί προκαλούν υποξική απόκριση για να βοηθήσουν τον αναδιπλασιασμό τους, επαναπρογραμματίζοντας το κυτταρικό μεταβολισμό στα κύτταρα του ξενιστή τους προς ένα χαμηλότερο μιτοχονδριακό αναπνευστικό ρυθμό (οξειδωτική φωσφορυλίωση) [415]. Αυτό οδηγεί σε μία χαμηλότερη κατανάλωση οξυγόνου και πυροδοτεί μία γρήγορη μετατόπιση τύπου Warburg προς την αναερόβια γλυκόλυση (προς παραγωγή γαλακτικού οξέος) [415]. Ενδιαφέρον είναι πως σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει αλληλεπίδραση ανάδρασης μεταξύ των υποδοχέων οξυγόνου και του ιϊκού πολλαπλασιασμού [415].

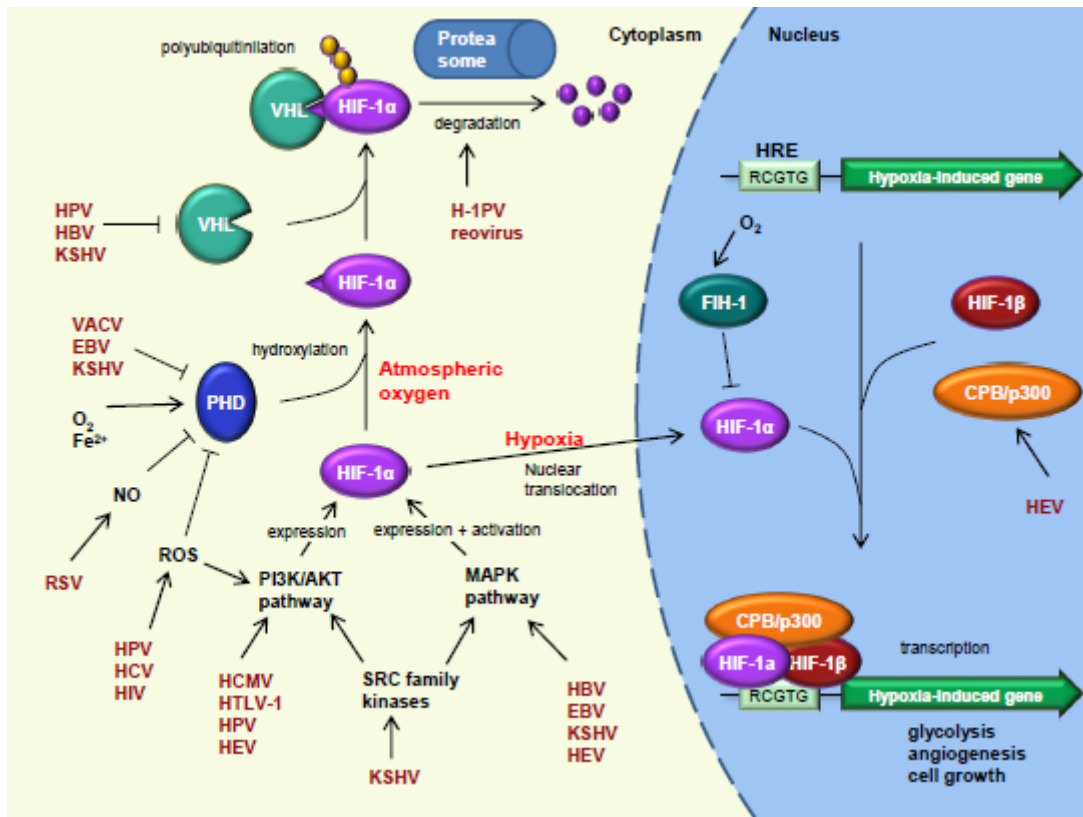
In vivo η ταχεία κυκλοφορία του αίματος παρέχει επαρκές οξυγόνο στα όργανα και στους ιστούς για τις μεταβολικές τους ανάγκες. Έτσι σε μία φυσιολογική κατάσταση ως αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ παροχής οξυγόνου και κατανάλωσης, όργανα και ιστοί χαρακτηρίζονται από μία δική τους μοναδική κατάσταση νορμοξίας, με ενδιάμεσες τιμές στη πλειοψηφία αυτών να ποικίλλουν από 3%-10% O₂. Στο ήπαρ για παράδειγμα η νορμοξία ποικίλλει από 12% O₂ γύρω από την πυλαία φλέβα σε 1% O₂ κοντά στη κεντρική φλέβα [418] με διάμεση τιμή 3% O₂ [419]. Αυτή η κλίση οξυγόνου είναι σημαντική για τη δημιουργία ζωνών μεταβολικής δραστηριότητας που υποστηρίζονται από ασύμμετρη κατανομή ενζύμων κλειδιών, κάτι που σε σύγκριση με άλλους ιστούς [420] [421] είναι πιο χαρακτηριστικό στη περίπτωση του ήπατος [422]. Υπάρχουν άφθονες αποδείξεις πως η ικανότητα για οξειδωτικό μεταβολισμό ενέργειας, η γλυκονεογένεση και η οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι υψηλότερα στη περιοχή της περιφέρειας του ήπατος, ενώ η πρόσληψη γλυκόζης, η γλυκόλυση, ο σχηματισμός γλουταμίνης και η σύνθεση λιπαρών οξέων είναι υψηλότερα στη περικεντρική περιοχή [423].

E2. Παράγοντες που επάγονται στην υποξία (Hypoxia Induced Factors-HIFs) και σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στον ιϊκό πολλαπλασιασμό και την υποξία

Οι παράγοντες που επάγονται στην υποξία (HIFs) είναι σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες της μεταβολικής κατάστασης του κυττάρου σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου [424] και μεσολαβητές κλειδιά στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ιϊκή αντιγραφή και την κυτταρική απόκριση στην υποξία. Σταθεροποιούνται και ενεργοποιούνται σε <5% O₂ [425]. Είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που συντίθενται από μία συνεχώς εκφραζόμενη HIF-1β υπομονάδα και μία ρυθμιζόμενη από το οξυγόνο HIFα υπομονάδα η οποία είναι γνωστό ότι υπάρχει σε τρεις ισομορφές. Οι δύο υπομονάδες αλληλεπιδρούν ως σύμπλοκο με υποκινητές γονιδίων που περιέχουν το αποκρινόμενο σε υποξία στοιχείο (Hypoxia Response Element-HRE) 5'-RCGTG-3' (R: πουρίνη). Σε ατμοσφαιρικές συνθήκες (εικόνα 14) ο HIFα είναι ασταθής ως αποτέλεσμα της υδροξυλίωσης στο κατάλοιπο προλίνης 402 και/ή 564 από πρωτεΐνες με επικράτεια προπυλ υδροξυλάσης (PHD), κυρίως τη PHD2, μέλη της Fe(II) και της οικογένειας διοξυγενασών που απαιτούν 2 οξογλουταρικό. Η προπυλ υδροξυλίωση απαιτείται για την πρόσδεση της πρωτεΐνης von Hippel Lindau (VHL) η οποία έτσι στρατολογεί ένα σύμπλοκο λιγάσης ουβικουιτίνης. Η ουβικουιτίνωση στοχεύει την HIFα για πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Επιπλέον ο παράγοντας αναστολής του HIF FIH-1 (Factor Inhibiting HIF-1-FIH-1) προσδέεται στο HIF-1α και ρυθμίζει αρνητικά τη λειτουργία του με υδροξυλίωση στο κατάλοιπο ασπαραγίνης 803, το οποίο μπλοκάρει την αλληλεπίδραση της επικράτειας διενεργοποίησης της HIF1α με τον συνενεργοποιητή p300 ή CPB. Σε υποξικές συνθήκες (εικόνα 14) οι αντιδράσεις υδροξυλίωσης αναστέλλονται ως αποτέλεσμα της στέρησης του υποστρώματος (O₂) και/ή της αυξημένης μιτοχονδριακής παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), αυξάνοντας τη σταθερότητα του HIFα, τη πυρηνική μετατόπιση και την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του HIF. Ο HIF1 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί σε επίπεδα ατμοσφαιρικού οξυγόνου κατά τη μόλυνση με ανθρώπινα παθογόνα, εμπεριεχομένων και των ιών [426]. Οι HIF1 και HIF2 επάγουν την μεταγραφική απόκριση στην υποξία, ελέγχουν την αναερόβια γλυκόλυση (κυρίως ο HIF1) την αγγειογένεση και την ερυθροποίηση (HIF2) [415]. Από την άλλη πλευρά, ο HIF3 ο οποίος είναι λιγότερο μελετημένος δρα ως κυρίαρχος αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1 εμποδίζοντας τη πρόσδεση του στο DNA [415].

Επιπρόσθετα σε αυτόν τον εξαρτώμενο από υποξία μηχανισμό σταθεροποίησης του HIF1α, υπάρχουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως

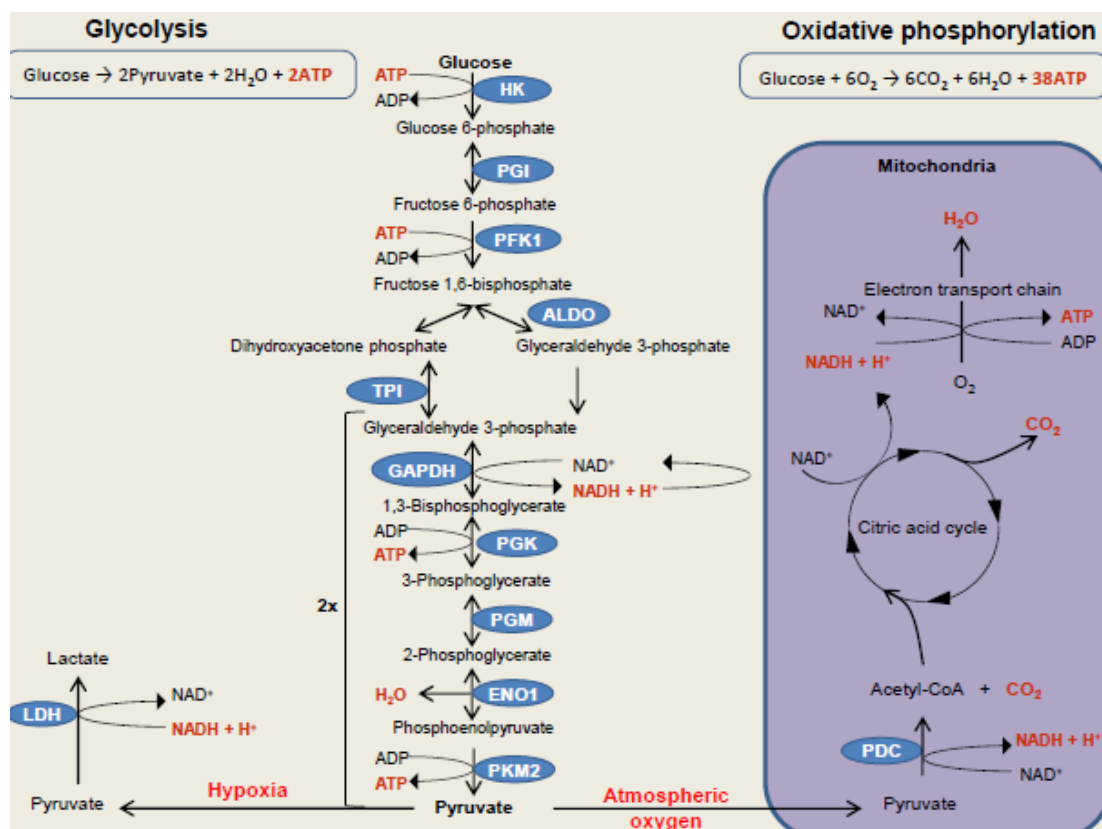
τα PI3K/AKT/mTOR, p42/44(ERKs) και τα p38 (MAP κινάση), p53-Mdm2 (mouse double minute 2 homolog) και HSP90 μονοπάτια που επηρεάζουν τη σύνθεση, τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα του HIF [426]. Η ενεργοποίηση της PI3K/AKT/mTOR αυξάνει τη μετάφραση του HIF-1α. Η mTOR κινάση (mammalian target of rapamycin) φωσφορυλιώνει τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτικών 4E (eIF-4E) προσδεδεσμένη πρωτεΐνη (4E-BP1) και τη P70 ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 κινάση (S6K) για να ενεργοποιήσει τη πρωτεϊνική μετάφραση. Η ERK ρυθμίζει την ενεργοποίηση του HIF-1α με φωσφορυλίωση των 4E-BP1, SK6, και τη κινάση αλληλεπίδρασης με τη MAP κινάση (MNK) και τη μεταγραφική του ενεργοποίηση με φωσφορυλίωση του συνενεργοποιητή CBP/p300 και έτσι αυξάνοντας το σχηματισμό του συμπλόκου HIF-1α/p300. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του ERK στην υποξία έχει δειχθεί να φωσφορυλιώνει τον HIF-1α και να ενισχύει τη μεταγραφική του δραστηριότητα χωρίς αλλαγές σε πρωτεϊνικό επίπεδο [427]. Μία άλλη ανάλυση έχει δείξει ότι η δραστηριότητα του ERK είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του HIF-1α στην υποξία χωρίς να επηρεάζει τη σταθεροποίηση ή την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA [415]. Το ενεργοποιημένο p38 MAPK επίσης φωσφορυλιώνει τον HIF-1α στην ισχαιμία (χαμηλή γλυκόζη και υποξία) συνεισφέροντας στην αναστολή της αλληλεπίδρασης των HIF-1α και VHL [428]. Η HSP90 προσδέεται στον HIF1α και ενισχύει τη δραστηριότητά του μπλοκάροντας την VHL-ανεξάρτητη πρωτεασωμική αποδόμηση και δρώντας στη διαμόρφωση των ετεροδιμερών HIF-1α για να επιτρέψει την αλληλεπίδραση με την p300. Η πρόσδεση του HIF-1α στη P53 οδηγεί σε Mdm2 μεσολαβούμενη ουβικουτίνωση και πρωτεασωμική αποδόμηση του HIF-1α [415].



εικόνα15. Ενεργοποίηση της υπομονάδας HIF-1α στην υποξία και σε επίπεδα ατμοσφαιρικού οξυγόνου κατά τη μόλυνση με ιούς [415]. Στην υποξία αναστέλλονται οι αντιδράσεις υδροξυλίωσης της HIF-1α που οδηγούν σε αναστολή της λειτουργίας του HIF και αυξάνεται η σταθερότητα της HIF1α, η πυρηνική της μετατόπιση, ο σχηματισμός συμπλόκου με την υπομονάδα HIF1β και τον συνενεργοποιητή του HIF (CPB/p300) και η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του HIF. Στη μόλυνση με ιούς, διάφορα μονοπάτια (πχ PI3K/AKT, MAPK, παραγωγή ROS) εμποδίζουν την αποικοδόμηση της HIF1α ή/και οδηγούν στην σταθεροποίηση της ακόμα και στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο.

Η υποξία σχετίζεται με έναν προσαρμοστικό κυτταρικό μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που περιέχει μια αλλαγή από την οξειδωτική φωσφορύλιωση στην αναερόβια γλυκόλυση και τη παραγωγή γαλακτικού οξέος [424, 425, 428, 429] (εικόνα 15) και που ευνοεί την αντιγραφή συγκεκριμένων ιών. Για κύτταρα υψηλά πολλαπλασιαζόμενα, το πλεονέκτημα μιας τέτοιας μεταβολικής τροπής είναι ο συνδυασμός ενέργειας (ATP) από ενισχυμένη γλυκόλυση με παραγωγή θρεπτικών ουσιών/μεσολαβητών για κυτταρική αύξηση και διαίρεση [430]. Επιπρόσθετα στον HIF, ογκογονίδια και γονίδια καταστολής όγκων είναι γνωστό να ρυθμίζουν τον επαναπρογραμματισμό της βιοενεργητικής προς την αναερόβια γλυκόλυση στην υποξία [431]. Η μεσολαβούμενη από την υποξία ρύθμιση προς τα άνω των AKT1, MYC, FOS, H-RAS, SRC, BCR/ABL και p53 έχει αναφερθεί να ενισχύει τη πρόσληψη γλυκόζης και τη γλυκόλυση μέσω άμεσης ενεργοποίησης των σχετιζόμενων γονιδίων, περιεχομένων αυτών που κωδικοποιούν το μεταφορέα γλυκόζης 1 (GLUT1) και το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση 2 (HK2), ενολάση 1 (ENO1) και δεϋδρογονάση του

γαλακτικού (LDH-A). Επιπρόσθετα στη γλυκόλυση, ένας άλλος σημαντικός μεταβολικός δρόμος που θα μπορούσε σε χαμηλό οξυγόνο και σε τρόπο ανεξάρτητο από τον HIF να αυξήσει το ATP και να ενισχύσει την ιϊκή αντιγραφή [432] είναι αυτός που καταλύεται από την κρεατινική κινάση (CK) στην αντιστρεπτή αντίδραση της φωσφοκρεατίνης (PCr) και ADP σε κρεατίνη και ATP [433]. Άλλα, πρόσθετα, ευαίσθητα σε οξυγόνο μονοπάτια που εμπλέκονται στη προσαρμογή στην υποξία είναι μέσω του mTOR και της απόκρισης της μη διπλωμένης πρωτεΐνης όπως και μέσω του STAT5 μονοπατιού[415]



εικόνα16 [415] Η μεταβολική οδός της γλυκόλυσης. Στο πρώτο στάδιο της πλήρους αποικοδόμησης της γλυκόζης (γλυκόλυση) παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού τα οποία σε αναερόβιες συνθήκες μετατρέπονται σε 2 μόρια γαλακτικού οξέος. Το ενεργειακό κέρδος είναι 2 μόρια ATP. Παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετύλιο-CoA και εισέρχεται στο κύκλο του κιτρικού οξέος για να οξειδωθεί σε CO₂ οπότε παράγονται ATP και τα ανηγμένα συνένζυμα NADH και FADH₂. Κατά το τελευταίο στάδιο της οξειδωτικής αποδόμησης της γλυκόζης τα ανηγμένα συνένζυμα επανοξειδώνονται στα μιτοχόνδρια και μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας παράγεται επιπλέον ATP. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι 38 μόρια ATP.

E3. Η επίδραση της υποξίας στον ιϊκό κυτταρικό κύκλο

Η χαμηλή τάση οξυγόνου έχει σημαντική επίδραση στην αντιγραφή αρκετών DNA και RNA ιών σε καλλιεργούμενα κύτταρα και in vivo [415].

I. Ρύθμιση προς τα άνω των ιών σε μηχανισμό ανεξάρτητο του HIF

Επιπρόσθετα στο μονοπάτι HIF-1 α /VHL/PHD, και άλλα μονοπάτια που ενεργοποιούνται σε απόκριση στην υποξία, έχουν δειχθεί να ενισχύουν την ιϊκή αντιγραφή. Η μεσολαβούμενη από υποξία ενίσχυση της αντιγραφής του RNA του HCV σε ηπατοκύτταρα καλλιεργούμενα σε συνθήκες οξυγόνου που μιμούνται την ηπατική νορμοξία (3% O₂) βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη από την έκφραση των HIF-1 και HIF-2. Αντίθετα συσχετίστηκε άμεσα με μία αύξηση στην αναερόβια γλυκόλυση (ρύθμιση προς τα άνω γονιδίων που εμπλέκονται στη μεταφορά γλυκόζης πχ GLUT-1) και στο μεταβολισμό(πχ HK2, ENO1, LDH-A, προτίμηση σε γλυκολυτικό υπόστρωμα) όπως και με τη CKB ενεργότητα, οδηγώντας σε αυξημένο ATP.

Ένας αριθμός ογκογονιδίων που είναι γνωστά να σχετίζονται με τη γλυκόλυση και που περιλαμβάνουν τη πρωτεΐνη ενεργοποιητή-1 (Activator Protein-1 – AP1) όπως και η φωσφορυλίωση-ενεργοποίηση του AKT έχουν αναδειχθεί σε καθοριστικούς παράγοντες της οδηγούμενης από την υποξία κυτταρικής μεταβολικής μετατόπισης. Αυξάνουν τη γλυκόλυση και τη παραγωγή του ATP και ακολούθως την αντιγραφή του HCV, σε έναν τρόπο ανεξάρτητο από τον HIF [432]. Επιπλέον σε βιοψίες ήπατος από ασθενείς μολυσμένους με HCV τα επίπεδα των δεικτών της υποξίας και του αναερόβιου μεταβολισμού συσχετίζονται με τα επίπεδα του RNA του HCV. Η υποξία αυξάνει την δραστηριότητα του ογκολυτικού ιού της ασθένειας του Newcastle (Newcastle disease virus – NDV) σε ανθρώπινα νεφρικά διαυγή κύτταρα της καρκινικής σειράς 786-O ανεξάρτητα από τον HIF-2 α που είναι συνεχώς ενεργός σε αυτά τα κύτταρα [434]. Επίσης ο παρβοϊός B19 (B19V) δείχνει ενισχυμένη γονιδιακή αντιγραφή και ιϊκή παραγωγή ύστερα από μόλυνση των ερυθρών προγονικών κυττάρων(EPCs) καλλιεργούμενα σε συνθήκες οξυγόνου κυτταροκαλλιέργειας (1% v/v O₂) που μιμούνται τη φυσική μόλυνση [435]. Τα EPCS είναι αποκλειστικός κυτταρικός στόχος του B19V και βρίσκονται στο κατώτερο άκρο της βαθμίδας οξυγόνου στον μυελό των οστών, που είναι υποξικός ιστός (0-4% v/v O₂) [436, 437]. Η επαγόμενη από χαμηλό οξυγόνο ενίσχυση του B19V είναι ανεξάρτητη του κανονικού HIF-1 α /VHL/PHD μονοπατιού αλλά συσχετίζεται με τα STAT5 και MEK/ERK μονοπάτια[435].

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

Οι ιοί είναι γνωστό να επαναπρογραμματίζουν με διαφορετικούς τρόπους το κυτταρικό μεταβολισμό και τη βιοενεργητική για να διευκολύνουν την αντιγραφή τους. Ένας αριθμός ιών είναι γνωστό να προκαλεί μία ταχεία τύπου

Warburg μετατόπιση σε γλυκόλυση και μείωση της κυτταρικής αναπνοής, συνήθως μέσω χειραγώγησης του HIF-1 μονοπατιού. Το φαινόμενο Warburg περιγράφει τη κυριαρχία της αερόβιας γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα, ακόμα και όταν υπάρχει επαρκές οξυγόνο για μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση. Παρόλο που μόνο 2 μόρια ATP παράγονται ως αποτέλεσμα της γλυκόλυσης (σε αντίθεση με τα 36-38 μόρια ATP που παράγονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση), ο ρυθμός της αντίδρασης είναι σχετικά υψηλός σε σύγκριση με τη σύνθεση του ATP στα μιτοχόνδρια, συνεισφέροντας έτσι στην απαίτηση ενέργειας κατά τον πολλαπλασιασμό(εικόνα2). Η γλυκόλυση επίσης παρέχει ενδιάμεσα προϊόντα που χρησιμοποιούνται από τα υψηλά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα για την παραγωγή νουκλεοτιδίων, αμινοξέων και λιπιδίων για κυτταρική αύξηση και διαίρεση [438]. Οι ιοί εκμεταλλεύονται αυτή τη μεταβολική τροπή για να διατηρήσουν την ενέργεια και τα μακρομόρια που χρειάζονται για επιτυχή ιϊκή αντιγραφή. Οι πρωτεΐνες του ξενιστή που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του HIF-1α συχνά στοχεύονται άμεσα από ιούς για να τροποποιήσουν τον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων του ξενιστή [415]. Ο HCV έχει δείχθει να αυξάνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης HIF-1α σε τελικό στάδιο του κύκλου της ιϊκής αντιγραφής [432]. Η έκφραση ιϊκών γονιδίων προκαλεί οξειδωτικό στρες, και αυξάνει τα επίπεδα των ROS, το οποίο ενεργοποιεί τις κυτταρικές κινάσες όπως οι MEK και PI3K, απαραίτητες για την σταθεροποίηση του HIF-1α [439]. Σε μία άλλη μελέτη οι πρωτεΐνες του HCV έχουν αναφερθεί να προκαλούν αναστολή της πρόσληψης οξυγόνου όπως μετρήθηκε από αναπνευστικές αναλύσεις, να σταθεροποιούν τον HIF-1α ανεξάρτητα από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, να επάγουν τη ρύθμιση προς τα άνω των ελεγχόμενων από τον HIF γονιδίων, όπως τα γλυκολυτικά ένζυμα LDH-A και HK1 και να αυξάνουν τη παραγωγή του ATP [440]. Επιπροσθέτως οι γλυκοπρωτεΐνες του HCV διαταράσσουν την έκφραση των στενών και προσκολλημένων πρωτεϊνών σύνδεσης, αυξάνουν τη μετανάστευση των ηπατοκυττάρων και ρυθμίζουν προς τα άνω την έκφραση από επιθηλιακούς σε μεσεγχυματικούς δείκτες μετάβασης Snail και Twist μέσω της σταθεροποίησης του HIF-1α [441]. Η σταθεροποίηση του HIF ενεργοποιεί το VEGF και την έκφραση του TGFβ που έχουν σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση της πολικότητας του ηπατώματος και στη προώθηση της μετανάστευσης των μολυσμένων κυττάρων κατά την αύξηση του HCC.

Άλλοι ιοί όπως ο δάγγειος (DENV) έχουν δείχθει να επάγουν το γλυκολυτικό μεταβολισμό (κατανάλωση γλυκόζης, GLUT1 και HK2) με μέχρι στιγμής ακαθόριστο μηχανισμό. Η μόλυνση με τον DENV επάγει τη γλυκόλυση η οποία είναι σημαντική για την παραγωγή μολυσματικών ιών [442]. Η μεσολαβούμενη από τη υποξία ενίσχυση του HCV έχει συσχετιστεί άμεσα με μία αύξηση στους δείκτες της αναερόβιας γλυκόλυσης (HK2, ENO1, LDH-A) όπως και σε έναν αριθμό ογκογονιδίων που γνωστά να συσχετίζονται με τη γλυκόλυση [443].

Αντιστρόφως, ο HCV έχει αναφερθεί να επηρεάζει άμεσα στην ενεργότητα των γλυκολυτικών ενζύμων [444].

B. ΣΤΟΧΟΙ – ΣΚΕΠΤΙΚΟ

Ο ιός της ηπατίτιδας C ανήκει στους πιο συχνούς αιτιολογικούς παράγοντες που ευθύνονται για τη χρόνια ηπατική νόσο και την επακόλουθη ανάπτυξη κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου (HCC). Έχει ενδοηπατική συνεργική δράση στην ανάπτυξη του HCC. Μεταβάλλει την γονιδιακή έκφραση των κυττάρων του ξενιστή και τους φαινοτύπους που αναγνωρίζονται ως χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου. Ένας τέτοιος είναι για παράδειγμα η ενεργοποίηση της οδού «κλειδιού» επιβίωσης / πολλαπλασιασμού PI3K / AKT [407], η οποία κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει γίνει στόχος για το σχεδιασμό αναστολέων μικρών μορίων, ορισμένοι από τους οποίους έχουν εισέλθει σε κλινικές μελέτες στον άνθρωπο ως αντικαρκινικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης και της θεραπείας του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [445, 446].

Τα κύτταρα του καρκίνου παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα για αναερόβια γλυκόλυση (μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό με γαλακτική αφυδρογονάση-LDH), ακόμη και με την παρουσία επαρκούς οξυγόνου για την υποστήριξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μιτοχονδρίων [430]. Αυτό το φαινόμενο, που ονομάζεται αποτέλεσμα Warburg, ενισχύεται υπό χαμηλές τάσεις οξυγόνου που δημιουργούνται φυσιολογικά κατά τον σχηματισμό όγκου στο ήπαρ (μέσα επίπεδα νορμοξίας όγκου ~ 1% [447]) και η οδός PI3K / AKT είναι σημαντικός μεσολαβητής αυτού του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού [448]. Έτσι, η συμβατική καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων υπό συνθήκες ατμοσφαιρικού οξυγόνου (20% κ.ο., υπεροξία) μπορεί να αποτύχει να ανιχνεύσει τις πραγματικές συνθήκες που καθορίζουν την κακοήθη εξέλιξη και την ανταπόκριση στα θεραπευτικά [415].

Με βάση τα παραπάνω, έχουμε προηγουμένως καθιερώσει μη- και DMSO-διαφοροποιημένα μοντέλα του HCV, βασισμένα σε κύτταρα ηπατώματος, προσαρμοσμένα σε 1-3% (v / v) O₂ [415], όπου ο γλυκολυτικός μεταβολισμός και ο μεταβολισμός της κρεατινικής κινάσης B (CKB) ρυθμίζονται προς τα άνω, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ATP, σε σύγκριση με τις ατμοσφαιρικές συνθήκες. Στη μόλυνση με HCV, αυτή η μεταβολική προσαρμογή, που προσομοιώνει το *in vivo* μικροπεριβάλλον κατά τη φυσική μόλυνση, συνδέθηκε άμεσα με την αύξηση της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος σε πρώιμο στάδιο κατά ένα HIF- α ανεξάρτητο τρόπο [415]. Στην ίδια μελέτη, αποδείχθηκε ότι πολλά ογκογονίδια που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με γλυκόλυση, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης-θρεονίνης AKT, είναι υπεύθυνα για την παρατηρούμενη αύξηση της αντιγραφής του RNA του HCV. Αυτή η συσχέτιση βρέθηκε επίσης σε δείγματα ήπατος από ασθενείς με χρόνιες μολύνσεις. Υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν ότι η πρωτεϊνική κινάση B (AKT) αυξάνει τη γλυκόλυση επηρεάζοντας άμεσα: α) την έκφραση και τη

διακίνηση των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT), όπως η έκφραση του GLUT1 με τη μεσολάβηση του AKT υποστρώματος TBC1D1 [449] και η μετατόπιση του GLUT4 στη πλασματική μεμβράνη που διαμεσολαβείται από τα υποστρώματα του AKT AS160 [450] και κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης 4-φωσφορικού 5 (PIP5K) [451] β) την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων όπως η εξοκινάση 2 (HK2), η οποία καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης και γ) τη φωσφορυλίωση ρυθμιστικών συστατικών όπως 6-φωσφοφρουκτο-2-κινάση/φρουκτόζη-2,6-διφωσφατάση 2 (PFKFB2), που ελέγχει την συγκέντρωση 2,6-διφωσφορικής φρουκτόζης και την παραγωγή γαλακτικού οξέος και την κινάση 1 αφυδρογονάσης πυροσταφυλικού οξέος (PDK1), η οποία απενεργοποιεί το σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης [448, 452]. Επιπλέον, η πρωτεϊνική κινάση B (AKT) έχει περιγραφεί πως διεγείρει τον αναδιπλασιασμό του RNA του HCV είτε μέσω της αυξημένης έκφρασης του λιπογενικού παράγοντα μεταγραφής SREBP-1 (συνδετική πρωτεΐνη-1 ρυθμιστικού στοιχείου στερόλης) [453], που ενσωματώνει τη μεταβολική ροή από τη ρυθμιζόμενη από τη PI3K / AKT σηματοδότηση γλυκόλυση στη σύνθεση λιπαρών οξέων [454], ή μέσω της αναστολής της AMPK (AMP ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση) [455] ένα ένζυμο με βασικό ρόλο στην ομοιόσταση της κυτταρικής ενέργειας [456]. Όλα αυτά τα μεταβολικά ένζυμα που συσχετίζονται με το AKT ρυθμίζονται προς τα πάνω υπό την υποξία.

Η άμεση επίδραση του HCV στην ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφοϊνοσιτιδής 3 (PI3K) και η φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης B (AKT) στο HCC έχουν επίσης αναφερθεί σε μολυσμένα καλλιεργημένα κύτταρα ηπατώματος [394] και οι μελέτες επιβεβαιώνουν ότι αυτό προκαλείται από την αλληλεπίδραση της HCV NS5A πρωτεΐνης με τη PI3K, με αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων από την απόπτωση, διευκολύνοντας την αντιγραφή του HCV [387, 457] ή μέσω της πρωτεΐνης NS4B, η οποία επάγει τη λιπογένεση σε μολυσμένα κύτταρα [458]. Η απορρύθμιση της PI3K στη μόλυνση με HCV έχει επίσης βρεθεί υπεύθυνη για τη διάσπαση της ασποβασικής πολικότητας, της οργάνωσης της ακτίνης και της συναρμολόγησης της εξωκυτταρικής μήτρας, καθώς και για την αντίσταση στην ινσουλίνη και τη μη αλκοολική λιπαρή ηπατική νόσο [459], οι οποίες ευθύνονται για τη στεάτωση, την ίνωση και τον HCC. Σε σχέση με αυτά τα δεδομένα, ο στόχος μας είναι να μελετήσουμε για πρώτη φορά, έναν προηγούμενος χαρακτηρισμένο προγνωστικό δείκτη σε διάφορους τύπους καρκίνου (πνεύμονα, γαστρικό, ορθοκολικό, προστάτη) το ένζυμο L-Dopa Decarboxylase [460-462]. Συγκεκριμένα, θα διερευνήσουμε τη συσχέτιση ανάμεσα στην αντιγραφή του HCV και στα επίπεδα του ενζύμου, τόσο στη κλασσική κυτταροκαλλιέργεια όσο και σε ηπατικό ιστό. Αρχικά, ο σκοπός μας είναι εξακριβώσουμε το πώς επηρεάζει η μόλυνση με τον HCV την αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών της DDC, αλλά και το πώς επηρεάζονται τα επίπεδα του mRNA του ενζύμου από το ιϊκό φορτίο στα μετέπειτα στάδια της μόλυνσης. Παράλληλα με τα πειράματά μας σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας, θα χαρακτηρίσουμε και τη σχέση ανάμεσα στα επίπεδα του RNA του ιού και του m-RNA της L-Dopa Decarboxylase σε βιοψίες ασθενών

με χρόνια ηπατική νόσο (κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο). Στη συνέχεια ο στόχος μας είναι η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ο HCV επηρεάζει τα επίπεδα της L-Dopa Decarboxylase, και μάλιστα αν η δράση του μεσολαβείται μέσω του PI3K-AKT μονοπατιού κυτταρικής επιβίωσης και πολλαπλασιασμού. Τέλος, θα εξακριβώσουμε και το πώς επηρεάζεται η ρύθμιση της L-Dopa Decarboxylase από τον HCV ανάλογα με τις συνθήκες οξυγόνου (20%O₂ - 1%O₂).

Ο ιός του δάγκειου πυρετού (DENV) ανήκει στο γένος Flavivirus της οικογένειας Flaviviridae. Είναι συγγενικός ιός του ιού της ηπατίτιδας C, ο οποίος ανήκει επίσης στην οικογένεια Flaviviridae αλλά ανήκει στο γένος Hepacivirus. Σε αντίθεση με τον HCV ο ιός του δάγκειου πυρετού δεν εγκαθιστά χρόνια μόλυνση ούτε έχει βρεθεί συσχέτισή του με τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC) [463]. Μόλυνση από τον ιό του δάγκειου πυρετού (DENV) μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των δύο σαφώς καθορισμένων συνδρόμων, δάγκειου πυρετού (DF) και σύνδρομο αιμορραγικού πυρετού/δάγκειου κλονισμού (DHF/DSS), και μια σειρά από ενδιάμεσες αντιδράσεις ή ακόμα και καμία κλινική απόκριση. Η ασθένεια είναι γενικά αυτοπεριοριζόμενη με την οξεία φάση να διαρκεί έως 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από μία φάση ανάρρωσης που εκτείνεται σε αρκετές εβδομάδες [463].

Είναι γεγονός πως όλο και περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν την εμπλοκή του μονοπατιού PI3K-AKT, ενός μονοπατιού με αντιαποπτωτική δράση και μείζονα ρόλο στη κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό, [380, 381] στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο που παρατηρείται στη μόλυνση με τον δάγκειο ιό *in vitro* και *in vivo* [409]. Οι ερευνητές δείχνουν πως αν και το υπογενωμικό RNA (sgRNA) του δάγκειου ιού έχει μικρή επίδραση στον ιικό κυτταρικό κύκλο, η παραγωγή του είναι απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας και πως το μονοπάτι με το οποίο το sgRNA οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο είναι το PI3K-AKT μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με το Bcl-2 [177]. Παράλληλα, υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν πως το PI3K/AKT μονοπάτι ρυθμίζει την αντιγραφή του DENV και με άλλους τρόπους εκτός της κυτταρικής επιβίωσης, αφού φαρμακευτικοί αναστολείς του PI3K/AKT έχουν αντίικη δράση στη μόλυνση με τον ιό, χωρίς όμως να εμπλέκεται η απόπτωση. [411]. Τέλος, υπάρχουν αποδείξεις πως οι φλαβοϊοί όπως είναι ο δάγκειος οροτύπου 2 επάγουν την έμφυτη ανοσία της ιντερφερόνης, με τρόπο εξαρτώμενο από την ιική αντιγραφή και την *de novo* πρωτεϊνοσύνθεση, μέσω ενός NF-κB μονοπατιού που εξαρτάται από τη PI3K [414], αφού η ειδική αναστολή του PI3K/AKT μειώνει τη πυρηνική μετατόπιση του NF-κB και ακολούθως την επαγωγή της ιντερφερόνης.

Στηριζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα, ο στόχος μας είναι να χαρακτηρίσουμε την θετική και αμφίδρομη σχέση ανάμεσα στην ιστική νορμοξία και στο πολλαπλασιασμό του DENV σε δύο κυτταρικές σειρές (Huh7, IHH). Έχοντας καθιερώσει μη- και DMSO-διαφοροποιημένα μοντέλα του DENV, βασισμένα σε κύτταρα ηπατώματος προσαρμοσμένα σε 1-3% (v / v) O₂, θα

διακρίνουμε συγκεκριμένα ποιό στάδιο του κύκλου της ιϊκής ζωής ρυθμίζεται από τη χαμηλή τάση οξυγόνου και θα δείξουμε πως ο ιός επάγει μία κυτταρική υποξική απάντηση και ένα επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού προκειμένου να υποστηρίξει μία επαρκή ιϊκή αντιγραφή. Στη συνέχεια θα καθορίσουμε το ρόλο του άξονα PI3K/AKT-HIF-γλυκόλυση στη συσχέτιση ανάμεσα στα ενδοκυττάρια επίπεδα οξυγόνου και στην αντιγραφή του DENV. Συγκεκριμένα, θα μελετήσουμε το γλυκολυτικό μεταβολισμό και το μεταβολισμό της κρεατινικής κινάσης Β (CKB) καθώς και τη παραγωγή ενδοκυττάρου ATP, στην υποξία σε σύγκριση με τις ατμοσφαιρικές συνθήκες οξυγόνου. Στην ίδια μελέτη, θα ελέγξουμε πολλά ογκογονίδια που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με τη γλυκόλυση, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης-θρεονίνης AKT. Με βάση τα όσα γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία σχετικά με τη σχέση ανάμεσα στο μονοπάτι PI3K/AKT και τον DENV, θα μελετήσουμε το ρόλο του μονοπατιού PI3K/AKT, ενός μονοπατιού με ρόλο «κλειδί» στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό, στη μεσολαβούμενη από την ηπατική νορμοξία ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV. Παράλληλα, αν και είναι γεγονός πως φαρμακευτικοί παράγοντες έναντι του δάγκειου ιού δρουν σε υποδοχείς της ντοπαμίνης, που είναι το προϊόν δράσης της L-Dopa Decarboxylase (DDC) [345, 348], θα διερευνήσουμε για πρώτη φορά τη συσχέτιση ανάμεσα στη μόλυνση με τον DENV και στο ένζυμο DDC . Συγκεκριμένα, ο στόχος μας είναι να ταυτοποιήσουμε την L-Dopa Decarboxylase, η οποία ρυθμίζεται από τη χαμηλή τάση οξυγόνου, ως ένα καινούργιο σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της ιϊκής αντιγραφής και παθογένεσης, στη μόλυνση με DENV στην ιστική νορμοξία. Η DDC αποκαρβοξυλιώνει την L-3,4 διυδροξυ-φαινυλ-αλανίνη σε ντοπαμίνη, στο μεταβολικό μονοπάτι σύνθεσης της ντοπαμίνης. Ο σκοπός μας είναι να χαρακτηρίσουμε την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών της DDC σε ατμοσφαιρικές και σε συνθήκες ηπατικής νορμοξίας ενώ θα δείξουμε και την ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης ανάμεσα στα ενδοκυττάρια επίπεδα της PI3K σε σχέση με εκείνα της DDC στη μόλυνση με τον ιό. Τέλος, θα αποδείξουμε πως οι πρωτεΐνες PI3K και DDC σχετίζονται άμεσα.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ1. Αντισώματα

Το ειδικό αντίσωμα έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής της ανθρώπινης DDC (anti-DDC Αντίσωμα: C-T) [464] και το ειδικό αντίσωμα που στοχεύει σε διάφορους επιτόπους ολόκληρης της DDC [282] παρασκευάστηκαν στο

εργαστήριο της καθ. Βασιλακοπούλου και είναι ευγενική δωρεά της. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του φωσφορυλιωμένου AKT (anti-P-AKT) αποκτήθηκε από την Cell Signaling.

Γ2. Εκκινητές

Εκκινητές για το γονίδιο της ανθρώπινης DDC (primers)

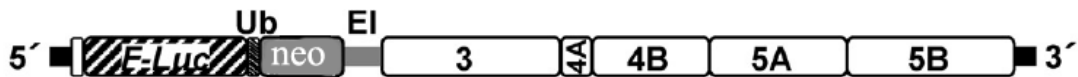
Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ήταν σχεδιασμένοι σύμφωνα με τη δημοσιευμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία της ανθρώπινης DDC από ανθρώπινο φαιοχρωμοκύτωμα (Ichinose et al., 1989) και της δημοσιευμένης αλληλουχίας του μη-νευρικού τύπου εξωνίου L1 (Ichinose et al., 1992). Η αλληλουχία του πρόδρομου εκκινητή A, που δεσμεύεται στο νευρικού τύπου εξώνιο N1 είναι η «5'-AGA GAG GAC AGA GAG CAA GTC ACT C -3'», που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια -63 έως -40. Οι πρόδρομοι εκκινητές που δεσμεύονται στο εξώνιο L1 είναι οι LS2M «5'-GGA GAG GGA AAC GTG TGG CTT GGA G -3'» και LS1 «5'-CT GGC ACA TGT GGC TGG AAA TGC - 3'», που δεσμεύονται στα νουκλεοτίδια -176 έως -94 και -201 έως -179, αντίστοιχα. Ο ανάστροφος εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο H5R «5'-94

GAC AA ACTT GCT CCT GAG GTG ACA -3'» που δεσμεύεται στα νουκλεοτίδια +1312 έως +1335 του εξωνίου 14, καθώς και oligodTs. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που δεσμεύονται στο εξώνιο 2 DDC1 «5'-AGA GGG AAG GAG ATG GTG GAT TA-3'» MZ2 «5'-AAG GAG AGG GAA GGA GAT GGT GGA TTA-3'»

Γ3. Χημικές ουσίες

Οι αναστολείς της DDC καρβιντόπα (α-methyl-dopahydrazine) και NSD-1015 (3-79 hydroxybenzyl-hydrazine) είναι ευγενική δωρεά της καθ.Βασιλακοπούλου ενώ η αιθανολαμίνη, τριαιθανολαμίνη και τα επικαλυπτόμενα μακροσφαιρίδια Αγαρόζης με Πρωτεΐνη A (Protein A-Agarose macrobeads), αποκτήθηκαν από τη SIGMA. Ο AKT αναστολέας VIII (AKTi 1/2) αποκτήθηκε από την Calbiochem. Τα χημικά CoCl₂, DMOG, DFO που επάγουν ή/και σταθεροποιούν τον HIF[465] αποκτήθηκαν από τη SIGMA.

Γ4. Κυτταρικές σειρές



Εικ. 14: Δομή ρεπλικονίων του HCV.

Huh7 lunet

Παρουσιάζουν αυξημένη αντιγραφή του γονιδιώματος του HCV. Προέρχονται από κλώνο των Huh7 στον οποίο είχε εισαχθεί ρεπλικόνιο και μετά θεραπεύτηκαν. Χρησιμοποιούνται για παραγωγή ιών μέσω ηλεκτροδιάτρησης με ιικό RNA.

Huh7.5 – 3a και Huh7.5 – 4a

Αποτελούν σταθερές κυτταροσειρές που παρήχθησαν με ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων με το RNA του ρεπλικονίου και οι αποικίες επιλέχθηκαν με βάση την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό G418. Τα ρεπλικόνια αυτά βασίζονται στα ρεπλικόνια των πλασμιδιακών κατασκευών S52 – SG (Feo) (All) και ED43-SG (Feo) (VYG) που είναι δισιστρωνικά υπογονιδιωματικά ρεπλικόνια του HCV των γονότυπων 3a (στέλεχος S52) και 4a (στέλεχος ED43) αντίστοιχα.



Εικ. 15: Δομή ρεπλικονίων DENV και YFV.

ΙΗΗ (Immortalized Human Hepatocytes)

Αποτελούν σταθερή κυτταρική σειρά. Αποκτήθηκαν από υγιές ηπατικό ιστό ο οποίος αφαιρέθηκε χειρουργικά από έναν άνδρα 59 χρονών και αθανатоποιήθηκαν μέσω επιμόλυνσης (transfection) με ένα μεγάλο SV40 πλασμίδιο που εκφράζει T αντιγόνα.

Vero

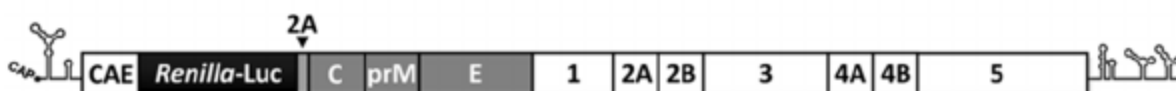
Αποτελούν σταθερή κυτταρική σειρά που έχει προέλθει από τους νεφρούς της πράσινης αφρικάνικης μαϊμούς.

Γ5. Ιικές αλληλουχίες πλήρους γονιδιώματος

Κατά τη διεξαγωγή της εργασίας χρησιμοποιήθηκε και το πλήρες γονιδίωμα του ιού HCV-N.2 GLUC, ο οποίος ανήκει στον γονότυπο 1b και φέρει προσαρμοστικές μεταλλάξεις που το καθιστούν ικανό να εγκαθιδρύει αποδοτική αντιγραφή. Ο ιός περιέχει στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με αυτό της πολυπρωτεΐνης το γονίδιο αναφοράς της *Gaussia* λουσιφεράσης, μεταξύ των κωδικών αλληλουχιών της p7 και της NS2. Αντίστοιχα το ρεπλικόνιο που αντιστοιχεί στον 1a γονότυπο του HCV (στέλεχος H77) διαθέτει ίδια δομή, με τη διαφορά ότι το γονίδιο αναφοράς αποτελεί η *gaussia luciferase* (H775.3 - GLUC).



Εικ. 16: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος του HCV.



Εικ.17: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος του ιού DENV DVS – R2A [466].

Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο ιός πλήρους γονιδιώματος DENV. Αυτός προέρχεται από το γονιδίωμα πλήρους μήκους DV2 με εισαγωγή της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου αναφοράς, της *Renilla* λουσιφεράσης μεταξύ της αλληλουχίας καψιδίου κυκλοποίησης (CAE) και της θέσης διάσπασης της *Thosea asigna* 2A του ιού [466].

Οι αλληλουχίες αυτές εισήχθησαν σε κύτταρα Vero κατόπιν ηλεκτροδιάτρησης για παραγωγή του ιού.

Γ6. Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία χλωριούχου νατρίου [Phosphate Buffered Saline (PBS)]

Για την παρασκευή 1 L διαλύματος 10x απαιτούνται:

- 80 gr χλωριούχου νατρίου (NaCl)

- 2 gr χλωριούχου καλίου (KCl)
- 11,5 gr Na₂HPO₄
- 2 gr KH₂PO₄

Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό. Χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1x, οπότε αραιώνεται πριν τη χρήση του με την κατάλληλη ποσότητα από απεσταγμένο νερό.

- Πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό DMEM για κυτταροκαλλιέργειες
Οι κυτταροκαλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco) παρουσία 10% εμβρυικού ορού μόσχου (fetal bovine serum, FBS), 1% των αντιβιοτικών πενικιλίνη (5 IU/ml) και στρεπτομυκίνη (50 mg/ml), 1% L-γλουταμίνης (2 mM) και 1% μη απαραίτητων αμινοξέων (2 mM). Το θρεπτικό υλικό χαρακτηρίζεται ως πλήρες υγρό θρεπτικό υλικό DMEM με την προσθήκη των παραπάνω συστατικών.

- Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 8,8:

Για την παρασκευή του διαλύματος απαιτούνται:

- 182 gr/L Tris (Merck)
- 40 ml SDS 10%

Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 8,8 γίνεται μέσω της χρήσης διαλύματος HCl 25%. Η μέτρηση του pH του διαλύματος γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (SD 300 pH, Lovibond).

- Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 6,8:

Για την παρασκευή του διαλύματος απαιτούνται:

- 60,6 gr/L Tris (Merck)
- 40 ml SDS 10% (Sigma)

Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 6,8 γίνεται μέσω της χρήσης διαλύματος HCl 25%. Η μέτρηση του pH του διαλύματος γίνεται με τη βοήθεια πεχαμέτρου (SD 300 pH, Lovibond).

- DMSO [Dimethyl sulfoxide (C₂H₆OS)] (Serva)
- Το χημικό DMSO χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία για 2 σκοπούς. Ο ένας είναι ως συστατικό του διαλύματος κατάψυξης κυττάρων στους -80 °C μαζί με FBS, με αναλογία FBS 95% - DMSO 5% στον συνολικό όγκο. Η δεύτερη χρήση του είναι ως διαλύτης των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε κάτω από αυτή την ιδιότητα για την ύπαρξη συνθήκης ελέγχου (θετικό control πείραμα) σε όλα τα πειράματα που αφορούσαν τον έλεγχο των αναστολέων.

- Διαλύματα για ανοσοκατακρήμιση (IP)

- **Tris-HCl C=1M pH=8**

Σε ένα λίτρο H₂O διαλύουμε 121,14 g Tris-Base. Στη προκειμένη παρασκευάσαμε 50ml διαλύματος οπότε χρησιμοποιήσαμε 6,1 g Tris-Base. Ρυθμίσαμε το pH στο 8 με διάλυμα HCl (37% πυκνό)

- **Διάλυμα Βορικό-ΝαOH C=0,2M pH=8,6**

Σε ένα λίτρο H₂O διαλύουμε 12,37 g βορικό οξύ. Στη προκειμένη παρασκευάσαμε 50ml διαλύματος οπότε χρησιμοποιήσαμε 0,62 g βορικού οξέος. Ρυθμίσαμε το pH στο 8,6 με διάλυμα NaOH 10N

- **Διάλυμα PBS 1X με pH=7,5**

Σε ένα λίτρο H₂O διαλύουμε 2,76 g NaH₂PO₄ και 9g NaCl Ρυθμίσαμε το pH στο 7,5 με αραιό HCl. Στη προκειμένη παρασκευάσαμε 50ml διαλύματος οπότε χρησιμοποιήσαμε 0,14 g NaH₂PO₄ και 0,44g NaCl.

- **Διάλυμα Τριαιθανολαμίνη-HCl C=0,2M pH=8,2**

Σε 1L H₂O διαλύουμε 26,4ml τριαιθανολαμίνη και αντίστοιχα στα 50ml 1,32ml. Ρυθμίζουμε το pH στο 8,2 με πυκνό HCl.

- **Διάλυμα Αιθανολαμίνη-HCl C=0,2M pH=8,2**

Σε 1L H₂O διαλύουμε 12,1ml αιθανολαμίνης και αντίστοιχα σε 50ml 0,6ml αιθανολαμίνης. Ρυθμίζουμε το pH στο 8,2 με πυκνό HCl.

- **Διάλυμα Binding Buffer με pH=7**

Διαλύουμε σε 1L H₂O 4,77g HEPES και 877g NaCl. Αντίστοιχα σε 50 ml H₂O διαλύουμε 0,24g Hepes και 0,44g NaCl. Ρυθμίζουμε το pH στο 7 με NaOH.

- **Διάλυμα TBS 10X**

Σε 1L H₂O διαλύουμε 24,23g Tris Base και ρυθμίζουμε το pH στο 7,5 με πυκνό HCl. Αντίστοιχα για 50ml διαλύματος χρησιμοποιούμε 1,21g tris base.

- **Διάλυμα Γλυκίνης 0,2M με pH=2,5**

Σε 1L H₂O διαλύουμε 15,01g γλυκίνης και αντίστοιχα σε 50ml 0,75g. Ρυθμίζουμε το pH στο 2,5.

- **Διάλυμα Loading Buffer για N-Page (1x)**

Σε 10ml H₂O χρησιμοποιούμε 0,01g Bromophenol Blue (0,01%), 1ml γλυκερόλη (10%) και 62,5Mm Tris-Base pH=6,8 δηλαδή 625μl.

Γ7. Μέθοδοι

Γ7.1. Καθαρισμός DNA από περιοριστικά ενζύμα με φαινόλη – χλωροφόρμιο

Η διαδικασία του καθαρισμού με φαινόλη και χλωροφόμιο είναι διαδικασία που απαιτείται ώστε να καθαριστεί πλήρως το κομμένο DNA από τα περιοριστικά ένζυμα, καθώς και από τα ρυθμιστικά διαλύματα της πέψης που έχει προηγηθεί. Τα στάδιά της περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω.

- Σε καθορισμένο όγκο πέψης (έστω α) προστίθεται όγκος dH_2O τέτοιος (έστω β), ώστε $\alpha + \beta = 350 \mu\text{l}$.
- Προστίθενται έπειτα $50 \mu\text{l}$ διαλύματος CH_3COONa (3M , $\text{pH } 5.2$), επομένως ο όγκος του μίγματος φτάνει πλέον τα $400 \mu\text{l}$.
- Προσθήκη $400 \mu\text{l}$ φαινόλης, δηλαδή ίσου όγκου με το παραπάνω μίγμα. Η φαινόλη που χρησιμοποιείται εδώ είναι ειδική για καθαρισμό DNA και η λήψη της γίνεται από την κάτω οργανική φάση και μέσα στον απαγωγό. Στο νέο μίγμα γίνεται καλό vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει και το DNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, σε erpendorf του $1,5 \text{ mL}$.
- Προσθήκη άλλων $400 \mu\text{l}$ φαινόλης και καλό vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει και το DNA, σε erpendorf του $1,5 \text{ mL}$.
- Προσθήκη $400 \mu\text{l}$ χλωροφορμίου και καλό vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει και το DNA, σε erpendorf του $1,5 \text{ mL}$.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά και μεταφορά όλης της υπάρχουσας ποσότητας εκτός των τελευταίων $20 \mu\text{l}$ περίπου σε καινούριο erpendorf του $1,5 \text{ mL}$.
- Προσθήκη $2,5$ όγκων 100% αιθανόλης σε σχέση με την ποσότητα που έχει τοποθετηθεί στο σωληνάκι. Έντονο vortex μετά την προσθήκη.
- Πάγωμα του σωλήνα στους -20°C μέχρι την επόμενη ημέρα, προκειμένου το DNA να κατακρημνιστεί. Σε αυτό το στάδιο το DNA μπορεί να διατηρηθεί επ' αόριστον.
- Φυγοκέντρηση στα 15000 rpm για 15 λεπτά και ύστερα αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή, καθώς το DNA έχει πλέον σχηματίσει pellet στον πάτο του σωλήνα.
- Ξέπλυμα με $500 \mu\text{l}$ αιθανόλης 70% . Ήπια ανάδευση πάνω – κάτω με το χέρι, φυγοκέντρηση στα 15000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου. Επανάληψη όλου του σταδίου αυτού άλλη μία φορά. Αφαίρεση σταγόνων αιθανόλης από τα τοιχώματα γίνεται μετά από σύντομο spin του σωλήνα.
- Αναμονή για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπου το σωληνάκι αφήνεται με το καπάκι ανοιχτό, ώστε να εξατμιστεί και όση αιθανόλη έχει απομείνει. Έπειτα προσθήκη $130 \mu\text{l}$ δις απεσταγμένου νερού.
- Επώαση του σωλήνα για 15 λεπτά στους 37°C , με ενδιάμεσο vortex και spin ανά 5 λεπτά.

Το καθαρό DNA πλέον μπορεί να αποθηκευτεί στους -20°C ως τη χρήση του. Πριν χρησιμοποιηθεί όμως, πρέπει πρώτα να επαναδιαλυτοποιηθεί με τη χρήση

πιπέτας και ύστερα να μετρηθεί η συγκέντρωσή του στο nanodrop (ως τυφλό χρησιμοποιείται το δις απεσταγμένο νερό).

Γ7.2. Μεταγραφή *in vitro*

Μέσω αυτής της μεθόδου παράγεται RNA από DNA, το οποίο έχει ήδη υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα για να γίνει γραμμικό και έχει καθαριστεί με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 200 μ l. Σε ένα eppendorf του 1,5 mL τοποθετούνται τα εξής αντιδραστήρια:

1. 20 μ g DNA σε 130 μ l ddH₂O
2. 40 μ l ρυθμιστικού διαλύματος RRL 5x. Το διάλυμα αυτό περιέχει τα συστατικά: 400 mM Hepes pH 7.5, 60 mM MgCl₂, 10 mM spermidin, 200 mM DTT.
3. 25 μ l διαλύματος ριβονουκλεοτιδίων (rNTPs solution) 25 mM (προκύπτει από μίγμα όλων των διαλυμάτων ριβονουκλεοτιδίων, τα οποία βρίσκονται σαν stock σε συγκέντρωση 100 mM, ενώ στο τελικό μίγμα βρίσκονται σε αναλογία 1:1:1:1)(Promega)
4. 5 μ l αναστολέα ριβονουκλεασών (RNasin) 40 u/ μ l (Promega)

Σε αυτό το μίγμα προστίθενται τέλος 8 μ l T7 RNA πολυμεράσης (Promega) και γίνεται καλό vortex. Τα μετέπειτα βήματα έχουν ως εξής:

- Επώαση στους 37 °C για 2 ώρες
- Προσθήκη άλλων 4 μ l T7 RNA πολυμεράσης (Promega)
- Επώαση στους 37 °C για άλλες 2 ώρες
- Προσθήκη 12 μ l δεοξυριβονουκλεάσης (RQ1 DNase free RNase) (Promega)
- Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα

Με την πραγματοποίηση αυτών των βημάτων, το RNA έχει παραχθεί και μπορεί πλέον να φυλαχθεί στους -80 °C. Πριν από τη χρησιμοποίησή του βέβαια πρέπει να καθαριστεί από τα ένζυμα της μεταγραφής μέσω ειδικής πειραματικής διαδικασίας καθαρισμού.

Γ7.3. Καθαρισμός RNA από τα ένζυμα της *in vitro* μεταγραφής

Η διαδικασία του καθαρισμού του RNA είναι απαραίτητη ώστε αυτό να απαλλαγεί από τα ένζυμα και τα ρυθμιστικά διαλύματα της *in vitro* μεταγραφής. Τα βήματα που την αποτελούν περιγράφονται παρακάτω.

- Στο eppendorf όπου έχει πραγματοποιηθεί η μεταγραφή προστίθενται 60 μ l διαλύματος CH₃COONa (2M, pH 4.5), καθώς και 340 μ l ddH₂O. Ο όγκος του νερού μεταβάλλεται ανάλογα με τον τελικό όγκο της μεταγραφής.

- Προστίθενται 400 μl φαινόλης (pH < 5, ειδική για καθαρισμό RNA) και το μίγμα αναδεύεται έντονα μέσω vortex. Αφήνεται το μίγμα να επωαστεί 10 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης (περίπου 500 μl), που περιέχει και το RNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, σε erpendorf του 1,5 mL.
- Προστίθεται χλωροφόρμιο σε ίσο όγκο με τον με την μεταφερόμενη υδατική φάση και ξαναγίνεται έντονο vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά της υδατικής (πάνω) φάσης, που περιέχει και το RNA που θέλουμε να καθαρίσουμε, σε erpendorf του 1,5 mL.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά όλης της υπάρχουσας ποσότητας εκτός των τελευταίων 20 μl περίπου σε καινούριο erpendorf του 1,5 mL.
- Προσθήκη 0,7 όγκων 100% ισοπροπανόλη, σε σχέση με την ποσότητα που έχει τοποθετηθεί στο τελευταίο σωληνάκι. Έντονο vortex μετά την προσθήκη.
- Φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση του υπερκειμένου (ισοπροπανόλη), ώστε να μείνει το ίζημα (RNA). Με spin αφαιρούνται όποιες σταγόνες ισοπροπανόλης έχουν απομείνει στο σωληνάκι.
- Ξέπλυμα με 500 μl αιθανόλης 70%. Ήπια ανάδευση με το χέρι, φυγοκέντρηση στα 13000 rpm για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου με προσοχή. Επανάληψη όλου του σταδίου αυτού άλλη μία φορά. Αφαίρεση σταγόνων αιθανόλης από τα τοιχώματα γίνεται μετά από σύντομο spin του σωλήνα.
- Αναμονή για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, όπου το σωληνάκι αφήνεται με το καπάκι ανοιχτό, ώστε να εξατμιστεί όσο περισσότερη αιθανόλη γίνεται.
- Προσθήκη 80 μl ddH₂O (ή άλλου επιθυμητού όγκου), ώστε να είναι εύκολο το RNA να επαναδιαλυθεί αργότερα με πιετάρισμα και vortex.
- Επώαση του σωλήνα για 15 λεπτά στους 37 °C, με ενδιάμεσο vortex και spin ανά 5 λεπτά. Το βήμα αυτό βοηθά στην επαναδιάλυση.
- Πάγωμα για τουλάχιστον 30 λεπτά στους -80 °C, ώστε να μαλακώσει το pellet του RNA, και έπειτα αναδιάλυση με καλό πιετάρισμα.
Το RNA είναι πλέον καθαρισμένο και μπορεί να φωτομετρηθεί στο nanodrop, στα 260 nm και έχοντας ως τυφλό ddH₂O. Από εκεί και έπειτα το RNA φυλάσσεται στην κατάψυξη των -80 °C.

Γ7.4. Διείρεση και ανακαλλιέργεια κυττάρων (split)

Όταν τα κύτταρα φτάνουν και καλύπτουν περίπου το 90 % της πληρότητας του χώρου στον οποίο αναπτύσσονται (πχ φλάσκες), τότε είναι απαραίτητο να

αποκολληθούν από το υπόστρωμα των χώρων καλλιέργειας, να διαχωριστούν και μία ποσότητα από αυτά να μοιραστεί σε νέο χώρο καλλιέργειας για ανάπτυξη εκ νέου.

Η αποκόλληση γίνεται με πρώτο βήμα την απομάκρυνση του ήδη υπάρχοντος θρεπτικού υλικού. Έπειτα ξεπλένεται το μέσο καλλιέργειας δύο φορές με διάλυμα PBS 1x, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από το μέσο όπου καλλιεργούνται τα κύτταρα. Τα ξεπλύματα αυτά γίνονται για την απομάκρυνση του ορού που περιέχει το θρεπτικό, ο οποίος μπορεί να απενεργοποιήσει τη θρυψίνη, μία πεπτιδάση που χρησιμοποιείται σε επόμενο στάδιο για την αποκόλληση των κυττάρων.

Με το πέρας των ξεπλυμάτων τοποθετείται ποσότητα θρυψίνης αντίστοιχη του μέσου όπου καλλιεργούνται τα κύτταρα. Η θρυψίνη που χρησιμοποιείται εδώ είναι αραιωμένη 1 στα 4 με διάλυμα PBS. Τα κύτταρα έπειτα τοποθετούνται στον κλίβανο στους 37 °C, όπου η θρυψίνη έχει καλύτερη δράση, για περίπου 5 λεπτά με ενδιάμεση ανακίνηση, ώστε η θρυψίνη να πάει παντού και η αποκόλληση να είναι ευκολότερη.

Στα αποκολλημένα κύτταρα προστίθεται μικρή ποσότητα νέου πλήρους θρεπτικού υλικού, ώστε να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και ταυτόχρονα να χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των κυττάρων. Με συνεχές πιπετάρισμα γίνεται ο διαχωρισμός και έπειτα λαμβάνεται μια ποσότητα από τα διαχωρισμένα κύτταρα που τοποθετείται σε νέο χώρο καλλιέργειας, στον οποίο έχει ήδη προστεθεί ποσότητα πλήρους θρεπτικού ανάλογα με το μέγεθός του.

Σε περιπτώσεις που τα κύτταρα που διαχωρίζονται φέρουν κάποιο φορέα έκφρασης με γονίδιο επιλογής, όπως για παράδειγμα γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό, τότε το αντιβιοτικό αυτό πρέπει να προστίθεται κατά την ανακαλλιέργεια στον χώρο καλλιέργειας, σε ποσότητα ανάλογη με αυτή του πλήρους θρεπτικού, και άρα ανάλογης του μεγέθους του χώρου καλλιέργειας.

Γ7.5. Κατάψυξη και φύλαξη κυττάρων για μελλοντική χρήση

Σε ένα falcon χωρητικότητας των 15 mL τοποθετούνται 4 mL από κύτταρα με νέο 10% πλήρες θρεπτικό υλικό, τα οποία έχουν μόλις περάσει τη διαδικασία του διαχωρισμού (split). Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 800 rpm για 5 λεπτά. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρείται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, ώστε να μείνει μόνο το ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται με 1500 μl από μίγμα 95% ορού (FBS) και 5% DMSO και μεταφέρεται σε κατάλληλο πλαστικό φιαλίδιο (cryovial), που κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία 4 °C. Το cryovial ύστερα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο που περιέχει ισοπροπανόλη στη βάση του (χρησιμοποιείται για αποφυγή της απότομης ψύξης) και μένει στους -80 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το φιαλίδιο μεταφέρεται σε υγρό άζωτο και μπορεί να φυλαχθεί εκεί επ' αόριστον.

Γ7.6. Απόψυξη και αναζωογόνηση κατεψυγμένων κυττάρων

Σε περίπτωση που χρειάζεται να αποψυχθούν κατεψυγμένα κύτταρα, τότε το cryovial όπου είναι αυτά τοποθετημένα βγαίνει από το υγρό άζωτο, το περιεχόμενό του ξεπαγώνει γρήγορα και μεταφέρεται σε 3 mL 10% πλήρους θρεπτικού υλικού μέσα σε falcon των 15 mL. Εκεί μετά τη μεταφορά προστίθενται και άλλα 3 mL υλικού και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 800 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου (περιέχει θρεπτικό υλικό, DMSO, FBS) με πιπέτα Pasteur.

Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 5 mL 10% πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα διαχωρίζονται με συνεχές και έντονο πιπετάρισμα. Αφού διαχωριστούν εντελώς, τότε τοποθετούνται στο χώρο όπου θα αναπτυχθούν στη συνέχεια (πιάτο ή φλάσκα). Προστίθεται τέλος και η υπόλοιπη ποσότητα απαραίτητου θρεπτικού υλικού, που εξαρτάται κάθε φορά από τον όγκο του αποθηκευτικού χώρου που έχει επιλεγεί για να καλλιεργηθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα αφήνονται πλέον να αναπτυχθούν στον κλίβανο των κυττάρων (37 °C, 5% CO₂).

Γ7.7. Επώαση σταθερών υπογονιδιωματικών κυτταρικών σειρών με αναστολείς

Κύτταρα Huh7 που έχουν περάσει από τη διαδικασία του διαχωρισμού (split) επιστρώνονται σε πλάκα 96 πηγαδιών σε πυκνότητα 30 %.

Μία ημέρα μετά την επίστρωση, το υλικό του κάθε πηγαδιού της πλάκας αντικαθίσταται με νέο, το οποίο όμως περιέχει και την επιθυμητή ποσότητα αναστολέα ή τον διαλύτη του αναστολέα (θετικός μάρτυρας ή Mock κύτταρα).

Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν με τον εκάστοτε αναστολέα για 72 ώρες και έπειτα λύνονται με ειδικό διάλυμα λύσης, ανάλογα με την μέτρηση που θα ακολουθήσει στα κύτταρα.

Γ7.8. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Για την ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης σε λυμένα κύτταρα χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Protein Assay (Biorad). Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με το όξινο διάλυμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και σαν αποτέλεσμα προκύπτει ένα κυανό χρώμα με μέγιστο απορρόφησης στα 600 nm. Το χρώμα σχηματίζεται σχεδόν άμεσα, είναι σταθερό για περίπου 1 ώρα ενώ επηρεάζεται ελάχιστα ή καθόλου από παράγοντες που μπορεί να εμπεριέχονται σε πρωτεϊνικά διαλύματα.

Η ποσοτικοποίηση γίνεται σε πλάκα 96 πηγαδιών ειδική για τη διεξαγωγή αυτής της μεθόδου και ως τυφλό για τα δείγματα χρησιμοποιείται ίση ποσότητα από το εκάστοτε διάλυμα. Επίσης, κατασκευάζεται πρότυπης καμπύλη με υδατικό διάλυμα αλβουμίνης (BSA) σε συγκεντρώσεις 0 (τυφλό πρότυπης), 0,5, 5, 10, 15, 20 και 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Τελευταίο προστίθεται το αντιδραστήριο Protein Assay (Biorad) σε ποσότητα 30 μl ανά πηγάδι και η πλάκα τελικά τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο για μέτρηση (Microplate Reader model 680, Biorad). Από τις τιμές απορροφήσεων που λαμβάνονται από το μηχάνημα αφαιρείται η τιμή του αντίστοιχου τυφλού, και με την χρήση πρότυπης καμπύλης γίνεται αντιστοίχιση των απορροφήσεων των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις τους.

Γ7.9. Ποσοτικός προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας λουσιφεράσης (LUC)

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας του ενζύμου firefly λουσιφεράσης (firefly LUC) ή Renilla λουσιφεράση (Renilla LUC) βασίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του υποστρώματός του, της λουσιφερίνης, παρουσία ενέργειας (ATP) και Mg^{2+} , η οποία πραγματοποιείται με ταυτόχρονη απευλευθέρωση ενός φωτονίου. Αντίστοιχα, ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας του ενζύμου της Gaussia λουσιφεράσης (Gaussia LUC) στηρίζεται στην αντίδραση οξείδωσης του δικού της υποστρώματος, το οποίο είναι η κοιλεντεραζίνη, δηλαδή η λουσιφερίνη των κοιλεντερωτών. Και σε αυτήν την περίπτωση, η οξείδωση συνοδεύεται από παραγωγή φωτός. Το φως που παράγεται και στις 2 περιπτώσεις μετρείται σε μετρητή φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, BioRad), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Για μέτρηση της firefly ή gaussia και renilla λουσιφεράσης, τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS 1x και προστίθενται σε κάθε πηγάδι 80 μl Passive Lysis Buffer 1x (Promega) ή Renilla Lysis Buffer 1x (Promega) αντίστοιχα, το οποίο έχει αραιωθεί από 5x με τη χρήση κατάλληλου όγκου ddH_2O . Μετά από 5 λεπτά συλλέγεται το κυτταρόλυμα σε eppendorfs του 0,5 mL, τα οποία φυλάσσονται στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Το διάλυμα PLB χρησιμοποιήθηκε καθώς λύει ήπια τα κύτταρα και δεν αποδιατάσσει πρωτεΐνες που χρειάζεται να διατηρήσουν την ενζυμική τους ενεργότητα μετά τη λύση, όπως η λουσιφεράση.

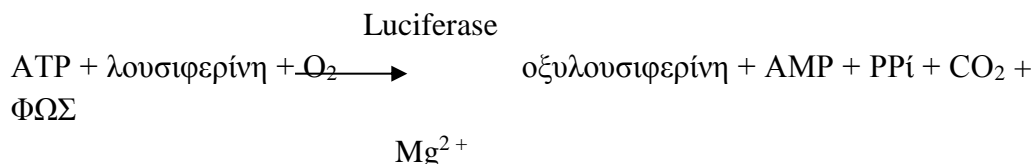
Τα δείγματα ξεπαγώνονται και πραγματοποιείται καλή ανακίνηση των δειγμάτων σε vortex και φυγοκέντρησή τους στις 13000 rpm για 2 λεπτά. Αυτή η διαδικασία γίνεται ώστε να κατακρημνιστούν μεμβρανικά συστατικά που έχουν προκύψει από τη λύση, ώστε να μην αλλοιώσουν όσο γίνεται τις μετρήσεις. Παράλληλα, σε eppendorfs του 1,5 mL αντίστοιχα σε αριθμό με αυτών των δειγμάτων προς μέτρηση, τοποθετούνται 30 μl του εμπορικά διαθέσιμου υποστρώματος της λουσιφεράσης (Luciferase Assay Reagent,

Promega) και 8 μl από το κάθε δείγμα στο κάθε σωληνάκι. Αμέσως μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στα 10 δευτερόλεπτα.

Στην περίπτωση της Gaussia λουσιφεράσης, το συμπυκνωμένο (50x) υπόστρωμα κοιλεντεραζίνης αναμειγνύεται με το ειδικό buffer σε τελική συγκέντρωση 1x. Έπειτα τοποθετούνται 30 μl για κάθε δείγμα σε erpendorfs του 1,5 mL και 8 μl από το κάθε δείγμα προστίθενται στο κάθε σωληνάκι. Το δείγμα αυτή τη φορά είναι τμήμα από υπερκείμενο και όχι από λυμένα κύτταρα (lysate), καθώς η Gaussia έχει την ιδιότητα να εκκρίνεται στο υπερκείμενο μετά την παραγωγή της. Αμέσως μετράται η ποσότητα της φωταύγειας στα 10 δευτερόλεπτα.

Γ7.10. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας μέσω μέτρησης του ενδοκυτταρικού ATP

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



Η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός συνδέεται γραμμικά με την συγκέντρωση του ATP και μετρείται χρησιμοποιώντας μετρητή φωταύγειας.

Το διάλυμα λύσης αραιώνεται 1:3 με θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς ορό πριν τη χρήση του. Πριν τη λύση, τα κύτταρα ξεπλένονται με το ίδιο θρεπτικό υλικό μία φορά. Για πλάκα 96 πηγαδιών, χρησιμοποιούνται 75 μl διαλύματος λύσης για κάθε πηγάδι. Το κυτταρόλυμα που προκύπτει φυλάσσεται σε σωληνάκια erpendorf στους -80 °C.

Για την μέτρηση, τα δείγματα και το υπόστρωμα μέτρησης (ATP Monitoring Reagent ή AMR) αφήνονται να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα μετά το ξεπάγωμά τους αναδεύονται και τοποθετούνται σε φυγόκεντρο για 2 λεπτά στις 13000 rpm, ενώ τα 30 μl υποστρώματος ανά δείγμα μοιράζονται σε σωληνάκια erpendorf.

Ο μετρητής φωταύγειας (Glomax 20/20 Luminometer, BioRad) προγραμματίζεται να έχει integration στην μέτρηση των δειγμάτων ίση με 1 δευτερόλεπτο. 10 μl δείγματος λαμβάνονται και ανακατεύονται με τα 30 μl υποστρώματος και γίνεται η μέτρηση στο μηχάνημα. Οι μετρήσεις

αποθηκεύονται μέσω κατάλληλου προγράμματος (Glomax) σε υπολογιστικό φύλλο excel για περαιτέρω ανάλυση.

Γ7.11. Συλλογή και λύση κυττάρων Huh 7 με χρήση διαλύματος Trizol

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται μετά από απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και διπλό ξέπλυμα των πηγαδιών με διάλυμα PBS 1x. Στη συνέχεια, αφαιρείται το PBS από τα πηγάδια και προστίθεται 0,5 mL διαλύματος Trizol, ανάλογα με το μέγεθος του πηγαδιού. Το κυτταρόλυμα συλλέγεται σε σωληνάκια erpendorf, τα οποία φυλάσσονται στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Γ7.12. Απομόνωση RNA από δείγματα που λύθηκαν με χρήση διαλύματος Trizol

Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για να απομονωθεί και να καθαριστεί RNA από δείγματα τα οποία έχουν λυθεί με τη χρήση διαλύματος Trizol. Τα βήματα της απομόνωσης έχουν ως εξής:

- Προσθήκη 100 μ L χλωροφορμίου σε κάθε δείγμα σε απαγωγό και έπειτα καλή ανάδευση των δειγμάτων σε vortex.
- Φυγοκέντρηση στα 12000 g για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε νέα σωληνάκια erpendorf.
- Προσθήκη 1 μ l γλυκογόνου 5 mg/ml (βοηθά στην καθίζηση του RNA).
- Προσθήκη 250 μ l ισοπροπανόλης ανά δείγμα και καλή ανάδευση των δειγμάτων σε vortex.
- Αναμονή για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 12000 g για 10 λεπτά στους 4 °C και απομάκρυνση των υπερκειμένων με προσοχή.
- Προσθήκη 500 μ L αιθανόλης 75% σε κάθε δείγμα (εδώ τα δείγματα μπορούν να φυλαχθούν στους -20 °C).
- Απαλή ανακίνηση των σωλήνων πάνω και κάτω, χωρίς χρησιμοποίηση vortex, ώστε να ξεπλυθεί το δημιουργούμενο pellet.
- Φυγοκέντρηση στα 7500 g για 5 λεπτά στους 4 °C και απομάκρυνση των υπερκειμένων.
- Στέγνωμα στον αέρα για 5 με 10 λεπτά.
- Επαναίωρηση των pellets σε καθαρό νερό. Η ποσότητα νερού εξαρτάται από το μέγεθος του pellet.
- Επώαση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 37 °C για 15 λεπτά, με διακοπή κάθε 5 λεπτά για ανάδευση στο vortex και spin.
- Αποθήκευση στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

Πριν τα RNA χρησιμοποιηθούν, πρέπει να επαναδιαλυθούν με χρήση πιπέτας και ενδιάμεση ανάδευση στο vortex και spin. Έπειτα μετριέται η συγκέντρωσή τους στο nanodrop με χρήση απεσταγμένου νερού ως τυφλό.

Γ7.13. Ποσοτικοποίηση RNA με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR)

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) χρησιμοποιείται για την σύνθεση cDNA, που θα χρησιμοποιηθεί για PCR, από αρχική μήτρα RNA. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί εκμαγείο μόρια RNA και παρουσία εκκινητών με ελεύθερο 3'-OH άκρο, δεοξυτριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs : dATP, dTTP, dCTP, dGTP) και Mg^{2+} , παράγει cDNA, δηλαδή συμπληρωματικό DNA ως προς το αρχικό RNA. Σε μικρά φιαλίδια τύπου PCR προστίθενται καθαρό RNA (π.χ. ολικό RNA που απομονώθηκε από κυτταροκαλλιέργειες με χρήση διαλύματος Trizol), σε όγκο που εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του και την επιθυμητή ποσότητα για *in vitro* σύνθεση cDNA (0,5 µg) και 0,7 µl μίγματος 2 ανάστροφων (reverse-R) εξειδικευμένων εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων συγκέντρωσης 100 pmol/µl με αναλογία 1:1 (0,35 µl + 0,35 µl). Συμπληρώνεται ddH₂O μέχρι τα 6,25 µl.

Τα φιαλίδια τοποθετούνται στη συσκευή όπου θα διεξαχθεί η αντίδραση στους 70 °C για 5 min (στάδιο αποδιάταξης) και μετά για 5 min στον πάγο. Έπειτα, προστίθεται σε κάθε φιαλίδιο 3,75 µl μίγματος που περιέχει 1 µl dNTPs, 0,25 µl RNasin, 2 µl MMLV buffer 5 x και 0,5 µl ένζυμο MMLV, άρα ο τελικός όγκος της αντίδρασης γίνεται 10 µl.

Τα φιαλίδια τοποθετούνται ξανά στη συσκευή και το πρόγραμμα συνεχίζεται στους 42 °C, για 1 h (στάδιο υβριδοποίησης). Έπειτα το μηχάνημα πρώτα ανεβάζει τη θερμοκρασία στους 95 °C για 3 min (στάδιο αποδιάταξης) και ύστερα την κατεβάζει στους 16 °C, όπου και διατηρούνται τα σωληνάκια μέχρι να παγωθούν στους -80 °C. Πριν το πάγωμα γίνεται προσθήκη 40 µl ddH₂O, οπότε και αραιώνονται 1:5.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA και βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία, να αντιγράφονται παρουσία πολυμεράσης (εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων, κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος κ.α.) και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Όταν ο κύκλος αυτός εναλλαγής θερμοκρασιών γίνει πολλές φορές, τότε παράγονται εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού DNA (ή τμήματος που επιθυμείται να ενισχυθεί).

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι η πιο ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA. Η qPCR σε πραγματικό χρόνο μετρά τη συγκέντρωση των προϊόντων

PCR, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, στηριζόμενη σε κινητική αντίδρασης φθορισμού. Η χρήση χρωστικών που προσδένονται σε διπλή έλικα DNA αποδείχτηκε πολύ χρήσιμη στην ανίχνευση σχηματισμού προϊόντων PCR.

Το αραιωμένο 1:5 προϊόν της αντίδρασης RT αραιώνεται με ddH₂O εκ νέου σε τελική αραιώση 1:50 για ποσοτικοποίηση του HCV IRES και του σταθερά εκφραζόμενου κυτταρικού γονιδίου YWHAZ. Σε ειδικά φιαλίδια προστίθενται cDNA κατάλληλα αραιωμένο και ddH₂O σε συνολικό όγκο 7,5 μl, εις τριπλούν, αλλά η μεταξύ τους αναλογία εξαρτάται από το εκάστοτε δείγμα αρχικού RNA. Μαζί με τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση, παρασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, όπου χρησιμοποιείται το δείγμα θετικός μάρτυρας σε ποσότητα 0,25, 0,5, 1, 2 ή 4 μl και προστίθεται ddH₂O ως τελικό όγκο 4,5 μl.

Έπειτα, σε κάθε φιαλίδιο προστίθενται 5,5 μl από μίγμα που περιέχει 5 μl από το αντιδραστήριο 2x KAPA SYBRGreen Master Mix και 0,25 μl από καθέναν από τους 2 εξειδικευμένους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, ανάστροφους (reverse-R) και πρόσθιους (forward-F), συγκέντρωσης 10 pmol/μl, συγκεκριμένους για το ιικό ή το κυτταρικό RNA.

Τα φιαλίδια ανακινούνται και τοποθετούνται στον αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή Corbett Rotor-Gene 6000 στο πρόγραμμα Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 για 40 κύκλους.

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Rotor-Gene, με βάση το οποίο γίνεται ο προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης, καθώς και η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων σε σχέση με την πρότυπη καμπύλη. Τα δεδομένα που προκύπτουν εξάγονται σε φύλλο excel. Τέλος, η κανονικοποίηση των δειγμάτων γίνεται ως προς το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ.

Γ7.14. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών SDS-Page

Τα δείγματα προέρχονται από κύτταρα που έχουν περάσει από τη διαδικασία του διαχωρισμού και η επιθυμητή ποσότητα για κάθε δείγμα συλλέγεται σε eppendorfs του 1,5 mL. Τα eppendorfs φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, το υπερκείμενο αναρροφάται με προσοχή ώστε να μην χαθεί το ίζημα των κυττάρων και έπειτα ακολουθεί ξέπλυμα με PBS 1x. Κατά το ξέπλυμα γίνεται αναδιάλυση του ιζήματος και ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση με τις ίδιες ρυθμίσεις. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, προστίθενται σε κάθε δείγμα 80 μl από ειδικό διάλυμα λύσης (protein lysis buffer), το οποίο έχει την ακόλουθη σύσταση:

- 630 μl ddH₂O
- 200 μl διαλύματος P-Buffer 5x (100 mM Hepes pH 7,4/500 mM NaCl/1% Triton X-100)
- 50 μl διαλύματος PIC 20x

- 100 ml διαλύματος PHOS-STOP 10x
- 20 ml διαλύματος DTT 100 mM

Αυτές οι ποσότητες αφορούν την παρασκευή 1 ml από το διάλυμα λύσης. Αν η απαιτούμενη ποσότητα είναι μικρότερη, τότε οι προστιθέμενες ποσότητες των συστατικών αλλάζουν κάθε φορά, έτσι ώστε όλα να βρίσκονται εντός του διαλύματος σε συγκέντρωση 1x.

Τα δείγματα διαχωρίζονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Για την κατασκευή 12% πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel) σε όγκο 15 ml, χρησιμοποιούνται τα παρακάτω υλικά, με τις απαιτούμενες ποσότητες να αναγράφονται εντός των παρενθέσεων.

- ddH₂O (4,935 ml)
- Buffer Tris – HCl pH 8,8 (3,75 ml)
- 30% bis – ακρυλαμίδη (6 ml). Παρασκευάζεται με προσθήκη 87 g ακρυλαμίδης και 3 g Bis σε 180 ml νερού. Το μίγμα θερμαίνεται στους 37 °C μέχρι τη διάλυση των στερεών ή αλλιώς για 15 λεπτά στους 50 °C. Έπειτα γίνεται προσθήκη νερού ώστε το διάλυμα να φτάσει τα 300 ml.
- 10% διάλυμα SDS (150 μL)
- 10% διάλυμα APS (Ammonium Persulfate) (150 μL). Παρασκευάζεται με προσθήκη 0,1 g APS σε 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Αντιδραστήριο temed, Merck (15 μL)

Το μίγμα τοποθετείται ανάμεσα στα δύο ειδικά τζάμια. Μόλις τοποθετηθεί η απαραίτητη ποσότητα από το πήκτωμα ανάμεσα στα τζάμια, πάνω από το πήκτωμα μπαίνει περίπου 1 ml ισοπροπανόλης, ώστε να δημιουργηθεί ένα επίπεδο μέτωπο στο separating gel και τα δείγματα να τρέξουν ομοιόμορφα. Το separating gel αφήνεται να πήξει.

Έπειτα κατασκευάζεται το stacking gel, που συμπληρώνει τον υπόλοιπο χώρο από το separating gel μέχρι περίπου την κορυφή των τζαμιών, σε όγκο 6ml. Η σύστασή του έχει ως εξής:

- ddH₂O (3,574 ml)
- Buffer Tris – HCl pH 8,8 (1,5 ml)
- 30% bis – ακρυλαμίδη (800 μL) Παρασκευάζεται με προσθήκη 87 g ακρυλαμίδης και 3 g Bis σε 180 ml νερού. Το μίγμα θερμαίνεται στους 37 °C μέχρι τη διάλυση των στερεών ή αλλιώς για 15 λεπτά στους 50 °C. Έπειτα γίνεται προσθήκη νερού ώστε το διάλυμα να φτάσει τα 300 ml.
- 10% διάλυμα SDS (60 μL)
- 10% διάλυμα APS (Ammonium Persulfate) (60 μL). Παρασκευάζεται με προσθήκη 0,1 g APS σε 1 ml απεσταγμένου νερού.
- Αντιδραστήριο temed, Merck (6 μL)

Μόλις πήξει το separating gel, αφαιρείται η ισοπροπανόλη. Έπειτα προστίθεται το stacking gel μετά μπαίνει ένα ειδικό χτένι που θα σχηματίσει κατά την πήξη του πηκτώματος τα πηγάδια όπου θα τρέξουν τα δείγματα. Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει.

Φορτώθηκε διάλυμα λυμένων κυττάρων με συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 30 µg που επιπλέον περιέχει loading dye [παρασκευάζεται σε ποσότητα 5 ml με την προσθήκη SDS 12% (0,6 g), Tris-HCl 1M pH 6,8 300 mM (1,5 ml), bromophenol blue 0,6% (0,03 g), 60% glycerol (3 ml) σε 0,5 ml νερού] και β-μερκαπτοαιθανόλη.

Στα 20 µl του κάθε δείγματος προστίθενται 4 µl loading buffer 6x και β-μερκαπτοαιθανόλη σε αναλογία 1:80 ως προς τον τελικό όγκο. Χρησιμοποιείται πρωτεϊνικός μάρτυρας (marker) με μοριακά βάρη 115, 82, 64, 49, 37, 26, 19, 15 και 6 kDa. Με την τοποθέτηση των δειγμάτων, τοποθετείται και running buffer στην συσκευή. Το running buffer παρασκευάζεται με διάλυση 1,65 gr Tris base και 7,21 Glycine σε 500 ml ddH₂O. Μετά την διάλυση των συστατικών στο νερό, προστίθενται και 5 ml SDS 10%.

Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για τρία λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν πλήρως όλες οι πρωτεΐνες και φορτώνονται στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 120.

Γ7.15. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το τμήμα του πηκτώματος που αντιστοιχεί στο separating gel τοποθετείται μέσα σε δοχείο με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), που παρασκευάζεται ως εξής: 2,9 gr Γλυκίνη, 5,8 gr Tris base, 3,7 ml SDS 10%, 800 ml ddH₂O και 200 ml μεθανόλης. Μετά τη διάβρεξή τους τοποθετούνται από κάτω προς πάνω ένα σφουγγάρι, 2 χαρτιά Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα, άλλα 2 χαρτιά Whatman και άλλο ένα σφουγγάρι σε ειδική κασέτα, η οποία τοποθετείται σε συσκευή μεταφοράς. Η κασέτα με την νιτροκυτταρίνη πρέπει να είναι πάντα προσανατολισμένη προς την άνοδο, καθώς οι πρωτεΐνες του πηκτώματος είναι αρνητικά φορτισμένες και άρα κινούμενες προς την άνοδο θα κινηθούν και προς την νιτροκυτταρίνη. Εφαρμόζεται στην συσκευή σταθερή ένταση ρεύματος 300 mA για 2 ώρες, όσο η συσκευή βρίσκεται στους 4 °C, ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση.

Γ7.16. Ανοσοστύπωση τύπου Western

Με το τέλος της μεταφοράς, η μεμβράνη απομακρύνεται από την κασέτα και ξεπλένεται με PBS 1x. Στη συνέχεια η μεμβράνη χρωματίζεται με Ponceau (0,2 g Ponceau S και 4 g τριχλωροξικού οξέος σε 100 ml νερού), μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών, Ξεπλένεται με PBS και τοποθετείται σε χαρτί, όπου σηματοδούνται οι ζώνες του marker και η μεμβράνη κόπηκε σε 2 κομμάτια: το ένα επώαστηκε με αντίσωμα για την ακτίνη (monoclonal mouse

Ab, Chemicon, σε αραιώση 1:6000) ενώ το άλλο με αντίσωμα για την ιική πρωτεΐνη NS5A (9E10 mouse Ab, σε αραιώση 1:2000) .

Τα κομμάτια επωάζονται υπό ανακίνηση για 1 ώρα με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων (5% γάλα σε σκόνη και 0,02% Tween-20 σε PBS 1x). Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα κάλυψης και προστίθεται το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% γάλα και 0,02% Tween-20 σε PBS 1x. Τα τρυβλία επωάζονται υπό ανακίνηση στους 4°C όλη νύχτα.

Την επόμενη μέρα οι μεμβράνες ξεπλένονται 3 φορές με διάλυμα 1% γάλα-PBS-Tween και ύστερα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα διαλυμένο σε 1% γάλα-PBS-Tween (goat anti-mouse, polyclonal IgG Secondary Antibody, HRP conjugated, Thermo) σε αραιώση 1 στα 1000. Οι μεμβράνες επωάζονται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά.

Ακολουθεί 3 φορές ξέπλυμα με 1% γάλα-PBS-Tween και μία φορά με PBS. Οι μεμβράνες επωάζονται για 5 λεπτά με μίγμα εμφανιστικών διαλυμάτων (LumiSensor, Chemiluminescent HRP Substrate, GenScript) και μετά ακολουθεί τοποθέτηση και εμφάνιση φιλμ.

Γ7.17. Εισαγωγή νουκλεϊκού οξέος σε κύτταρα θηλαστικών με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ώστε να εισαχθεί σε κύτταρα το ιικό RNA. Με έκθεση των κυττάρων σε παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου αλλά μικρής διάρκειας, η μεμβράνη τους αποσταθεροποιείται και δημιουργούνται παροδικά μεμβρανικοί πόροι που επιτρέπουν την είσοδο του εκάστοτε νουκλεϊκού οξέος. Βέβαια, η εφαρμογή των παλμών πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην δημιουργηθεί μόνιμη βλάβη στα κύτταρα.

Σε κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από το μέσο όπου φυλάσσονται, προστίθενται περίπου 5 mL 10% πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα διαχωρίζονται ώστε να σπασούν τα δημιουργούμενα συσσωματώματα. Τα κύτταρα έπειτα μεταφέρονται σε falcon των 15 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 800 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου με αντλία κενού. Προστίθενται συνολικά 15 mL διαλύματος PBS 1x για να ξεπλυθούν τα κύτταρα. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται με τη βοήθεια του διαλύματος. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 800 rpm για 5 λεπτά και αφαίρεση του υπερκείμενου με αντλία κενού.

Μετά την δεύτερη φυγοκέντρηση, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται με τη χρήση του διαλύματος Cytomix (περιγράφεται παρακάτω) , στο οποίο έχουν ήδη προστεθεί ATP (2 mM) και γλουταθειόνη (5 mM), σε αναλογία 1:50 ως προς τον τελικό όγκο. Για κάθε δείγμα RNA απαιτούνται 400 μL Cytomix με 1:50 ATP και 1:50 γλουταθειόνη. Πριν την έναρξη της τελικής επαναδιάλυσης για κάθε δείγμα τοποθετούνται 12 mL 10% πλήρους θρεπτικού σε falcon των

50 mL. Σε ένα σωληνάκι erpendorf του 1,5 mL τοποθετούνται 10 µg RNA. Μετά την επαναδιάλυση των κυττάρων προσθέτουμε στο σωληνάκι 400 µl από το μίγμα κυττάρων, Cytomix, γλουταθειόνης και ATP. Γίνεται ανάμειξη και το μίγμα μεταφέρεται σε στείρα κυβέττα ηλεκτροδιάτρησης (0,4 cm gap/ Biorad). Η κυβέττα έπειτα μεταφέρεται για ηλεκτροδιάτρηση στο μηχάνημα GenePulser XCell (Biorad), με συνθήκες 975 µF και 270 V.

Με το πέρας της διαδικασίας προστίθεται εντός της κυβέττας θρεπτικό υλικό και με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur διαχωρίζονται τα κύτταρα (έχουν την τάση να σχηματίζουν συσσωματώματα μετά την άσκηση υψηλού ηλεκτρικού πεδίου), μοιράζονται σε πλάκα 48 πηγαδιών και καλλιεργούνται για 48 ώρες. Στη συνέχεια, το θρεπτικό τους αντικαθίστανται με νέο θρεπτικό αναμειγμένο με τον αναστολέα ZB5 σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η επίδραση του αναστολέα μελετήθηκε για 72 ώρες με καθημερινή αλλαγή του υλικού που περιέχει τον αναστολέα και συλλογή των υπερκειμένων για μέτρηση Gaussia λουσιφεράσης. Στο τέλος των 72 ωρών πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων για μέτρηση Bradford.

Για την διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ηλεκτροδιάτρησης Cytomix. Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος Cytomix pH 7.6 απαιτούνται 1.200 µl KCl για τελική συγκέντρωση 120 mM, 1.5 µl CaCl₂·2H₂O για τελική συγκέντρωση 0.15 mM, 100 µl K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.6 για τελική συγκέντρωση 10 mM, 250 µl Hepes για τελική συγκέντρωση 25 mM, 50 µl MgCl₂·6H₂O για τελική συγκέντρωση 5 mM, 0.0076 gr EGTA για τελική συγκέντρωση 2 mM και προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 10 ml. Η αρχική συγκέντρωση όλων των συστατικών του διαλύματος (πρέπει να είναι φιλτραρισμένα) είναι 1 M. Έπειτα, γίνεται μέτρηση pH σε πεχάμετρο και προσθήκη σταδιακά σταγόνων διαλύματος KOH 1M μέχρι το pH να γίνει 7.6 ακριβώς (περίπου 190 µl). Στη συνέχεια το Cytomix φιλτράρεται με σύριγγα σε φίλτρα 0.2 µm και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται σε στείρες συνθήκες κυττάρων.

Γ7.18. Παραγωγή ιού από το stock και μόλυνση με DENV

Γ7.18.1. Παραγωγή του ιού

Κύτταρα Vero E6 υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με 5 -10 µg του αντίστοιχου *in vitro* μεταγραμμένου RNA του ιού, συνδυάζοντας δύο προσεγγίσεις ηλεκτροδιάτρησης σε τρυβλίο καλλιέργειας των 15 cm. Στις 24 ώρες μετά την επιμόλυνση, το μέσο κυτταρικής καλλιέργειας αλλάχθηκε σε DMEM που περιείχε 15 mM HEPES (pH 7,5) και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρι μια ορατή κυτταροπαθολογική επίδραση (cytopathogenic effect, CPE), χαρακτηριστικό της προχωρημένης λοίμωξης από τον DENV2, να καταστεί προφανής (72 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση). Το υπερκείμενο της καλλιέργειας κυττάρων που περιείχε τον ιό, συλλέχθηκε, φιλτραρίστηκε με

φίλτρα 0,45 μM, και καταψύχθηκε στους -80 ° C. Ο ιός από τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιήθηκε για να μολύνει νέα κύτταρα Vero E6 σε MOI 0.1-1 pfu/cell.

Τα υπερκείμενα της καλλιέργειας κυττάρων που περιείχαν τον ιό συλλέχθηκαν συλλέχθηκαν κατά την 4^η ημέρα για την ελαχιστοποίηση της εμφάνισης απογόνων ιών που δεν έχουν το γονίδιο αναφοράς και κατά την 5^η ημέρα. Τα stock του ιού τελικά διηθήθηκαν (0,45 μm), μοιράστηκαν σε σωληνάκια erpendorf και φυλάχθηκαν στους -80 ° C μέχρι την περαιτέρω χρήση.

Γ7.18.2. Μόλυνση των κυττάρων με DENV

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν μία ημέρα πριν από τη μόλυνση σε πλάκες πολλαπλών πηγαδιών σε πυκνότητα 30%. Ο ιός αραιώθηκε σε DMEM (συμπληρωμένο με 2% FCS) στο επιθυμητό MOI (0,001 pfu / κύτταρο), και προστέθηκε στα κύτταρα. Η μόλυνση αφέθηκε να συνεχιστεί για 2-4 ώρες στους 37 ° C, με 5% CO₂. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε νέο θρεπτικό αναμειγμένο με τον αναστολέα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Γ7.19. Δοκιμασία πλάκας για την ογκομέτρηση του DENV

- Μοίρασμα 2x10⁵ κυττάρων Vero E6 / πηγάδι σε πλάκα 24^{ov} πηγαδιών (πλήρες μέσο, π.χ. DMEM + 10% FCS)
- Την επόμενη ημέρα, παρασκευή 5 αραιώσεων σε erpendorf των 1,5 ml, με αλλαγή tip σε κάθε αραιώση και vortex ενδιάμεσα.
- Αφαίρεση υλικού και μόλυνση των διπλετών (duplicates – διπλών πηγαδιών) με 250ul από την κάθε αραιώση του ιού και μόλυνση για 1h στους 37°C.
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 1 ml / πηγάδι MEM (χωρίς FCS), που περιέχει 1,5% καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (SIGMA # 21902-250G) *
- Επώαση στους 37°C για 7 ημέρες. Οι πλάκες δεν πρέπει να μετακινηθούν κατά τη διάρκεια της επώασης. Αδρανοποίηση του ιού μέσω προσθήκης 1 ml / πηγάδι διαλύματος φορμαλδεΰδης 10% (σε ddH₂O). Επώαση για τουλάχιστον 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να καταστεί δυνατή η μονιμοποίηση / αδρανοποίηση του ιού.
- Απόρριψη υπερκειμένων και πλύση των πλακών με έντονο ξέπλυμα με νερό βρύσης (οι μονοστιβάδες κυττάρων δε θα αποκολληθούν). Είναι σημαντικό να είμαστε σίγουροι πως η κολλώδης μεθυλοκυτταρίνη έχει απομακρυνθεί πριν την έναρξη της χρώσης
- Κάλυψη των μονιμοποιημένων κυττάρων με διάλυμα 1 % Crystal Violet (που παρασκευάστηκε σε 10% αιθανόλη), και επώαση για 15-30 λεπτά σε RT

- Αφαίρεση του κρυσταλλικού ιώδους (μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί) χωρίς να γίνει επαφή του tip με την μονοστοιβάδα (αποφύγουμε τις τρύπες σε οποιοδήποτε στάδιο)
- Εκτενής πλύση των κυττάρων με νερό βρύσης και στέγνωμα σε χαρτί για την αφαίρεση του εναπομείνοντος νερού.
- Μέτρηση των πλακών και υπολογισμός του τίτλου του ιού λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο που χρησιμοποιείται για τη μόλυνση (250 ul).

***Προετοιμασία του διαλύματος μεθυλοκυτταρίνης**

- Προσθήκη σε γυάλινη φιάλη 7,5 γρ μεθυλοκυτταρίνης, προσθήκη μαγνητικής ράβδου, και αποστείρωση της σκόνης σε αυτόκαυστο.
- Κάτω από μια hood, γίνεται η προσθήκη ενός μπουκαλιού MEM (χωρίς ορό, 500ml) μέσα στο γυάλινο μπουκάλι με τη μεθυλοκυτταρίνη. Διάλυση της μεθυλοκυτταρίνης στους 4 ° C τοποθετώντας το μπουκάλι σε ένα μαγνητικό αναδευτήρα για μια έως και δύο ημέρες.

Γ.7.20. Ανοσοκατακρήμιση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Η ανοσοκατακρήμιση (Immunoprecipitation, IP) είναι μια αρκετά διαδεδομένη τεχνική που προϋποθέτει τη χρήση ενός αντισώματος έναντι μιας γνωστής πρωτεΐνης, προκειμένου να απομονωθεί από ένα σύνολο πρωτεϊνών που περιλαμβάνονται στο δείγμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται ως «δόλωμα» για την κατακρήμιση της πρωτεΐνης προσδένεται ομοιοπολικά με την σταθερή περιοχή του πάνω σε σφαιρίδια επικαλυπτόμενα με Πρωτεΐνη A.

Συν-ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε μη αποδιατακτικές συνθήκες

Η ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, γνωστή ως συν-ανοσοκατακρήμιση (co-immunoprecipitation, Co-IP) χρησιμοποιείται για τη μελέτη και την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στοχεύοντας με το αντίσωμα σε μια γνωστή πρωτεΐνη του δείγματος, είναι δυνατόν εάν αυτή σχηματίζει σύμπλοκο με άλλη/ες πρωτεΐνες *in vivo*, αυτό να κατακρημνιστεί ακέραιο σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Για να πραγματοποιηθεί η κατακρήμιση ολόκληρου του πρωτεϊνικού συμπλόκου είναι απαραίτητο οι πρωτεΐνες που το αποτελούν να συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους.

Προετοιμασία σφαιριδίων πρωτεΐνης A

Η προετοιμασία των σφαιριδίων πρωτεΐνης A, ώστε να πραγματοποιηθεί σε αυτά η ομοιοπολική πρόσδεση του αντισώματος, περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων που περιγράφονται αναλυτικά ακολούθως:

- Ο επιθυμητός όγκος σφαιριδίων (συνήθως 50 μl) ξεπλένεται με δεκαπλάσιο όγκο PBS (1x). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 500 g. Αφαιρείται το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 3 φορές.
- Πραγματοποιείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αντισώματος που πρόκειται να προσδεθεί στα επικαλυπτόμενα σφαιρίδια με Πρωτεΐνη Α, με τη μέθοδο Bradford. Η επιθυμητή συγκέντρωση του αντισώματος κατά την προσρόφηση στα σφαιρίδια είναι 2,5 mg Ab/ml σφαιριδίων.
- Ο κατάλληλος όγκος του αντισώματος διαλύεται σε PBS (1x) το οποίο έχει 3,3 φορές τον όγκο των σφαιριδίων.
- Ιδιαίτερα σημαντική για την πρόσδεση του αντισώματος στα σφαιρίδια είναι η ρύθμιση του pH, η οποία πραγματοποιείται με διάλυμα Tris-HCl, pH 8,0.
- Τα επικαλυπτόμενα σφαιρίδια με Πρωτεΐνη Α διαλυτοποιούνται στο διάλυμα αντισώματος και αναδεύονται στους 4°C, σε περιστρεφόμενη ρόδα περίπου για 18 ώρες.
- Την επόμενη μέρα, τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται στις 500 g για 1 λεπτό, προκειμένου να αφαιρεθεί το υπερκείμενο διάλυμα αντισώματος. Ακολουθούν 4 ξεπλύματα των σφαιριδίων με δεκαπλάσιο όγκο PBS (1x), ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του αντισώματος που δεν έχει προσροφηθεί στα σφαιρίδια.
- Τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος 0,2 M βορικού οξέος-NaOH, pH 8,6.

Ομοιοπολική πρόσδεση του αντισώματος στα επικαλυπτόμενα σφαιρίδια με Πρωτεΐνη Α

Η ομοιοπολική πρόσδεση του ήδη προσροφημένου αντισώματος στα επικαλυπτόμενα σφαιρίδια με Πρωτεΐνη Α πραγματοποιείται σε διάλυμα τριαιθανολαμίνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου DMP (Dimethyl pimelimidate dihydrochloride), το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνδεση πρωτεϊνικών μορίων, καθώς σχηματίζει μεταξύ τους αμιδικούς δεσμούς. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής:

- Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αντιδραστηρίου DMP ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα αντίδρασης να είναι 20 mM.
- Το αντιδραστήριο διαλύεται σε διάλυμα τριαιθανολαμίνης 0,2 M, pH 8,2, το οποίο έχει όγκο τριπλάσιο από τον αντίστοιχο των σφαιριδίων.
- Το pH του διαλύματος αντίδρασης ρυθμίζεται στο 8,3 με την προσθήκη διαλύματος NaOH και στη συνέχεια προστίθεται στα σφαιρίδια.
- Ακολουθεί ήπια ανάδευση σε περιστρεφόμενη ρόδα για 30 λεπτά στους 4 °C.

- Το διάλυμα ομοιοπολικής πρόσδεσης απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στις 500 g για 1 λεπτό και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος αιθανολαμίνης 0,2 M, pH 8,2, σε όγκο δεκαπλάσιο των σφαιριδίων.
- Τα σφαιρίδια φυγοκεντρούνται, αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναιωρούνται εκ νέου σε διάλυμα αιθανολαμίνης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C, φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Η ποσότητα του αντισώματος που δεν έχει προσδεθεί ομοιοπολικά στα σφαιρίδια απομακρύνεται με την προσθήκη σε αυτά διαλύματος γλυκίνης 0,2 M, pH 2,5 και ανάδευση στους 4 °C για 7 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Τελικά, τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (1x) και εκπλένονται συνολικά 3 φορές.
- Φυλάσσονται στους 4 °C επαναιωρημένα σε 50 μl PBS (1x) και NaN₃ τελικής συγκέντρωσης 0,02 %, το οποίο χρησιμοποιείται ως συντηρητικό.

Προετοιμασία δείγματος για ανοσοκατακρήμνιση

Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν στην ανοσοκατακρήμνιση έχουν υποστεί ήπια ομογενοποίηση σε γυάλινο ομογενοποιητή με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης σφαιριδίων. Παράλληλα, μια μικρή ποσότητα σφαιριδίων πρωτεΐνης A (50μl) εξισορροπείται στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Για τη διαδικασία αυτή πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις με δεκαπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος. Στα σφαιρίδια αυτά προστίθεται το πρωτεϊνικό δείγμα και ακολουθεί ήπια ανάδευση στους 4 °C για 1 ώρα. Με τον τρόπο αυτό, όσες πρωτεΐνες εμφανίζουν μη ειδική συγγένεια για τη πρωτεΐνη A, δεσμεύονται στα σφαιρίδια σε αυτό το στάδιο κι έτσι εξασφαλίζεται η ειδικότητα του αποτελέσματος της μεθόδου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 500 g για 1 λεπτό και το υπερκείμενο φυλάσσεται στον πάγο.

Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνικών συμπλόκων

Τα σφαιρίδια με το ομοιοπολικά προσδεμένο αντίσωμα εκπλένονται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης σφαιριδίων και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτά το πρωτεϊνικό δείγμα που προέκυψε από την παραπάνω διαδικασία. Ακολουθεί ανάδευση για 18 ώρες στους 4 °C. Την επόμενη μέρα, το υπερκείμενο κλάσμα μετά από ανοσοκατακρήμνιση, που αναφέρεται ως «ΥΚΜΑ» συλλέγεται με φυγοκέντρηση και τα σφαιρίδια εκπλένονται 2 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα TBS και 2 φορές με διάλυμα TBS (1x). Οι όγκοι που χρησιμοποιούνται από το ρυθμιστικό διάλυμα για τις εκπλύσεις αντιστοιχούν στον δεκαπλάσιο του όγκου των σφαιριδίων.

Η έκλυση των αντιγόνων από το προσδεμένο στα σφαιρίδια αντίσωμα πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας (βρασμός). Η αλλαγή των

φυσικοχημικών αυτών παραμέτρων συμβάλλει στην εξασθένηση των δεσμών που συμμετέχουν στη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Τα σφαιρίδια επαναιωρούνται σε

7,5 μl διαλύματος φόρτωσης για NPAGE. Ακολουθεί βρασμός για δέκα λεπτά και στη συνέχεια συλλογή του υπερκειμένου. Σε αυτό προστίθενται 2,5 μl διαλύματος 10 % SDS (κ.β) και 10 μl διαλύματος φόρτωσης για SDS-PAGE (βλ. Διάλυμα 1). Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) και βράσιμο των δειγμάτων για 5 λεπτά. Τα εκλυόμενα αντιγόνα διαχωρίζονται σε SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ο εντοπισμός τους γίνεται με ανοσοστύπωση κατά Western.

Γ7.21 Επιμόλυνση κυττάρων θηλαστικών (transfection) με λιποφεκταμίνη

Η επιμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων με DNA ή RNA ή και των δύο γίνεται με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου λιποσώματος Lipofectamine 2000 (Invitrogen), ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρίας. Το λιπόσωμα γενικά επιτρέπει την εισαγωγή του DNA ή του RNA ή και των δύο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό των κυττάρων και μπορεί να είναι θετικά φορτισμένο (ή να είναι μίγμα θετικά φορτισμένων και ουδέτερων από πλευράς φορτίων μορίων, όπως η λιποφεκταμίνη), ώστε να μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν άμεσα με τη κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η εισαγωγή των νουκλεϊκών οξέων στο εσωτερικό των κυττάρων. Για την επιμόλυνση επιστρώνουμε κύτταρα σε 10% θρεπτικό υλικό σε πλάκες με τον επιθυμητό αριθμό πηγαδιών (6, 12, 24, 48, 96) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για να προσκολληθούν στο υπόστρωμα. Μία ημέρα μετά γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού και προσθήκη νέου χωρίς αντιβιοτικά. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα ή κύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν, αλλά κυρίως επειδή τα αντιβιοτικά μπορούν να εισέλθουν στα λιποσώματα και έπειτα στα κύτταρα, θανατώνοντάς τα. Ο όγκος του υλικού εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών και ακολουθούνται οι οδηγίες της εταιρείας των πιάτων. Στη συνέχεια ετοιμάζονται δύο σειρές A και B με 1.5 ml eppendorfs (ο αριθμός eppendorfs της κάθε σειράς ποικίλλει ανάλογα με πόσα δείγματα RNA θα εισαχθούν στα κύτταρα αλλά είναι ο ίδιος μεταξύ των δύο σειρών). Στην A σειρά προστίθενται optimem (θρεπτικό μέσο χωρίς ορό) σε όγκο που εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών και τα επιθυμητά νουκλεϊκά οξέα (δείγματα προς έλεγχο και δείγματα για τον έλεγχο της απόδοσης της επιμόλυνσης) σε όγκους που εξαρτώνται από τη συγκέντρωσή τους και την επιθυμητή ποσότητα εισαγωγής στα κύτταρα. Γίνεται ανακίνηση, ενώ συνίσταται να ετοιμάζεται πρώτα η σειρά B και μετά η A, ώστε το λιπόσωμα να μην προσκολλάται στα τοιχώματα των eppendorfs. Οι δύο σειρές αναμιγνύονται, γίνεται έντονο vortex και επώαση για 15-20 min σε θερμοκρασία

δωματίου. Επειτα, το περιεχόμενο του Eppendorf (οptimem, λιπόσωμα και νουκλεϊκά οξέα που έχουν σχηματίσει σύμπλοκα) προστίθενται στα κύτταρα. Είτε σε όλο το πηγάδι, είτε μοιράζεται σε 2 ή 3 πηγάδια. Επώαση του πιάτου στον κλίβανο των κυττάρων στους 37 °C για όσες ώρες επιθυμείται να μελετηθεί η επίδραση του εκάστοτε νουκλεϊκού οξέος στα κύτταρα (πχ 4, 6, 8, 10, 12 ,24 ,48 ή 72h). Στις πρώτες 4-6h γίνεται αφαίρεση του υλικού για να απομακρυνθούν όσα λιποσώματα δεν εισήχθησαν στα κύτταρα και προσθήκη πλήρους υλικού σε όγκο που εξαρτάται από το μέγεθος του πηγαδιού και τις συνολικές ώρες επώασης.

Γ7.22 Μόλυνση κυττάρων θηλαστικών ιικό RNA (infection)

Για την μόλυνση μίγμα κυττάρων με 10% πλήρες θρεπτικό υλικό επιστρώνεται σε πιάτα με τον επιθυμητό αριθμό πηγαδιών (6, 12, 24, 48, 96) και επωάζονται στους 37 °C για να προσκολληθούν στο υπόστρωμα. Ο όγκος του υλικού εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών. Την επόμενη μέρα γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού και προσθήκη μίγματος 95 % θρεπτικού υλικού με ορό low IgG με 5 % ιικό RNA. Ο όγκος του μίγματος εξαρτάται από το μέγεθος των πηγαδιών. Επώαση του πιάτου στον κλίβανο των κυττάρων στους 37 °C για όσες ώρες επιθυμείται να μελετηθεί η επίδραση του εκάστοτε ιού στα κύτταρα (π.χ. 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 ή 72 h).

Το θρεπτικό υλικό με ορό low IgG χρησιμοποιείται, γιατί τα αντισώματα IgG προσδένονται μη ειδικά με τον ιό και τον αδρανοποιούν. Μετά την συλλογή των κυττάρων στις 4 h το θρεπτικό υλικό με ορό low IgG αφαιρείται και προστίθεται ο ανάλογος όγκος 10% πλήρους θρεπτικού υλικού, αφού πλέον ο ιός έχει εισέλθει στα κύτταρα. Έτσι, και τα κύτταρα αναπτύσσονται σε κανονικό υλικό και τα ιικά σωματίδια που δεν έχουν καταφέρει να εισέλθουν στα κύτταρα απομακρύνονται

Δ. Πειραματικό μέρος- Αποτελέσματα

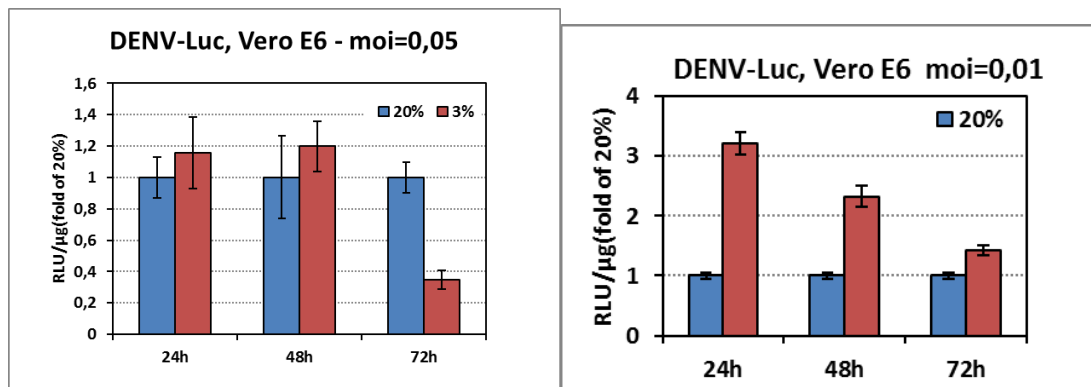
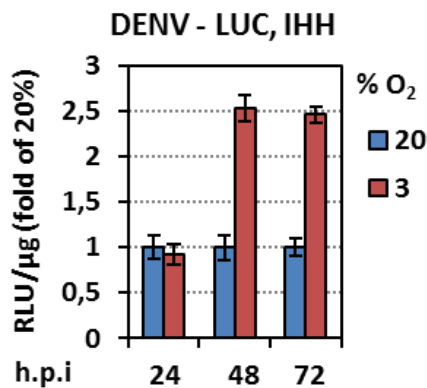
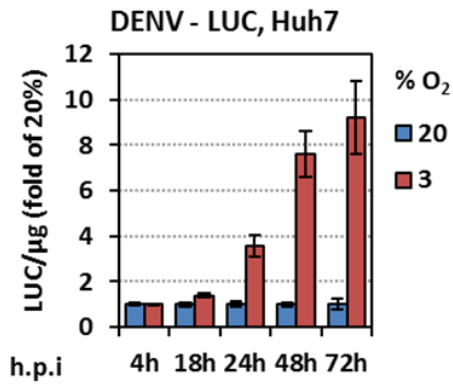
Δ1. Χαρακτηρισμός της σχέσης ανάμεσα στην ιστική νορμοξία (3% v/v O₂) και στον πολλαπλασιασμό του ηπατοτρόπου ιού DENV.

Χαρακτηρίσαμε την αμφίδρομη σχέση ανάμεσα στην ιστική νορμοξία (3% O₂) και στην αναπαραγωγή του DENV σε κύτταρα ηπατώματος Huh7, σε Vero και σε αθανатоποιημένα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (IHH). Επιπλέον διακρίναμε σε

ποιο στάδιο του ιϊκού κύκλου πραγματοποιείται η ενίσχυση του DENV από το χαμηλό οξυγόνο και δείξαμε πως ο DENV επάγει μία υποξική κυτταρική απόκριση και έναν επαναπρογραμματισμό στον κυτταρικό ενεργειακό μεταβολισμό.

Δ1.1 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνικής υποξίας (3% O₂) με μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης

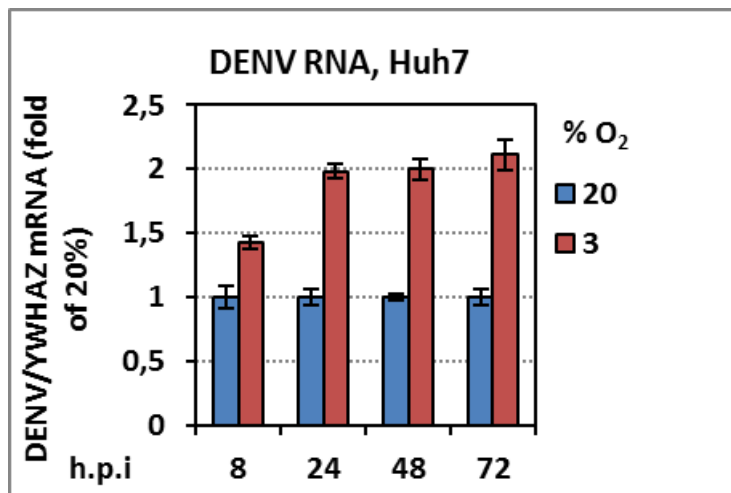
Κύτταρα Huh7, Vero και IHH στρώθηκαν σε πλάκες 96well σε πυκνότητες 30% και προεπώστηκαν στο 20% ή 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DV-R2A που εκφράζει το γονίδιο renilla-luciferase. Τα κύτταρα Huh7 μολύνθηκαν με μοί 0.01, τα IHH με μοί 0,1 και τα Vero με μοί 0,01 ή 0,05. Τα κύτταρα επώστηκαν για 4 h με τον ιό και αφού πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, μοιράστηκαν οι πλάκες κάθε κυτταροσειράς σε δύο κλιβάνους, έναν με συνθήκη επώασης 20% O₂ και ένα με συνθήκη επώασης 3% O₂. Τα κύτταρα επώστηκαν για 18-72 h στις 2 συνθήκες και λύθηκαν σε διάφορες ενδιάμεσες χρονικές στιγμές με renilla lysis buffer (RLB). Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα της λουσιφεράσης και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρατηρούμε πως σε όλες τις κυτταροσειρές που μελετήθηκαν υπάρχει αύξηση στο πολλαπλασιασμό του ιού μέχρι και 9 φορές σε συνθήκες υποξίας σε σχέση με τη συνθήκη 20% O₂. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος της συνθήκης 20% που τη θεωρούμε ως 1.



Διαγράμματα 1-4. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες υποξίας. Κύτταρα Huh7, IHH και Vero προεπώαστηκαν στο 20% O₂ ή στο 3% O₂, μολύνθηκαν με τον DENV (DV-R2A) σε moi= 0,01 (Huh7) σε moi= 0,1 (IHH) και σε moi=0,05 ή 0,01 (Vero) για 4h, ύστερα καλλιεργήθηκαν περαιτέρω στις 2 συνθήκες οξυγόνου και λύθηκαν στις αναγραφόμενες ώρες μετά τη μόλυνση (hpi). Η ενεργότητα λουσιφεράσης που προκύπτει από την αντιγραφή προσδιορίστηκε και εκφράστηκε σε RLU/mg πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράζονται ως λόγος της συνθήκης 20% τα οποία θεωρούμε ως 1.

Δ1.2 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνικής υποξίας με ποσοτικοποίηση του ιϊκού RNA με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-QPCR).

Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 96well σε πυκνότητα 30% και προεπώαστηκαν στο 20% ή 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DV-R2A. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 h με τον ιό και αφού πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, μοιράστηκαν οι πλάκες σε δύο κλιβάνους έναν με συνθήκη επώασης 20% O₂ και ένα με συνθήκη επώασης 3% O₂. Τα κύτταρα επώαστηκαν μέχρι τις 72 h στις 2 συνθήκες και λύθηκαν σε διάφορες ενδιάμεσες χρονικές στιγμές με trizol. Αφού απομονώθηκε το ολικό κυτταρικό RNA και πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή, ακολούθησε η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για την περιοχή IRES του ιού και για το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν αξιοσημείωτη αύξηση στο ιϊκό RNA παρουσία υποξίας σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση. Στο διάγραμμα που ακολουθεί έχουμε θεωρήσει τη συνθήκη 20% O₂ ως 1 και η συνθήκη 3% O₂ στην εκάστοτε χρονική στιγμή εκφράζεται ως λόγος αυτού.

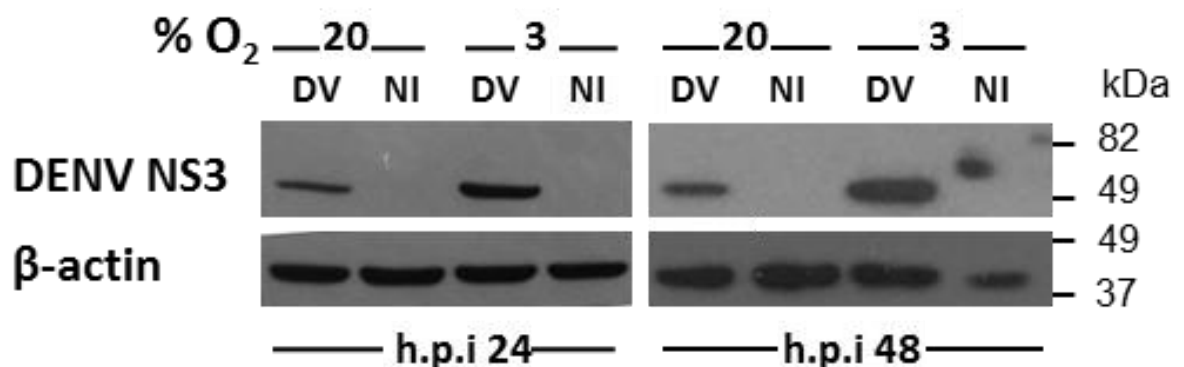


Διάγραμμα 5. Τα αντίγραφα του ενδοκυτταρικού RNA του DV-R2A σε μολυσμένα (μοί 0,01) και λυμένα κύτταρα ποσοτικοποιήθηκαν με RT-QPCR ανάλυση. Για τη κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA του YWHAZ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος της συνθήκης 20% την οποία θεωρούμε ως 1.

Δ1.3 Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του DENV σε συνθήκες τεχνηκής υποξίας με ποσοτικοποίηση ιικής πρωτεΐνης μέσω ανοσοδοκιμασίας Western

Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε 2 πλάκες 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και προεπώαστηκαν στο 20% ή 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν τα μισά πηγάδια σε κάθε πλάκα με DENV γονοτύπου 1β (moi= 0,5) έτσι ώστε να έχουμε σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Ύστερα η μία πλάκα συνέχισε την επώασή της σε κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂) και η άλλη μεταφέρθηκε στο κλίβανο υποξίας που προσομοιάζει τις συνθήκες ηπατικής νορμοξίας(3% O₂). Χρησιμοποιήθηκαν 2 πηγάδια για κάθε συνθήκη ώστε να υπάρχει επαρκής ποσότητα πρωτεΐνης καθώς ο DENV είναι λυτικός ιός. Στις 4 ώρες μετά τη μόλυνση (4h.p.i.) αφαιρέθηκε ο ιός και έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα ώστε να έχουν την ίδια μεταχείριση. Συνεχίστηκε η επώαση των κυττάρων στις 2 συνθήκες μέχρι τις 48 h, λύθηκαν στις 24 και 48 h p.i και η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη μέθοδο Bradford.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία western έναντι της ιικής πρωτεΐνης NS3, η οποία ανιχνεύεται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα, και έναντι ακτίνης η οποία χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Βλέποντας την ανοσοσύτρωση παρατηρούμε πως η NS3 η οποία είναι ενδεικτική του πολλαπλασιασμού του ιού, είναι αυξημένη στις συνθήκες υποξίας σε όλα τα time points. Όσον αφορά την κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδά της είναι σχεδόν ίδια σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν.

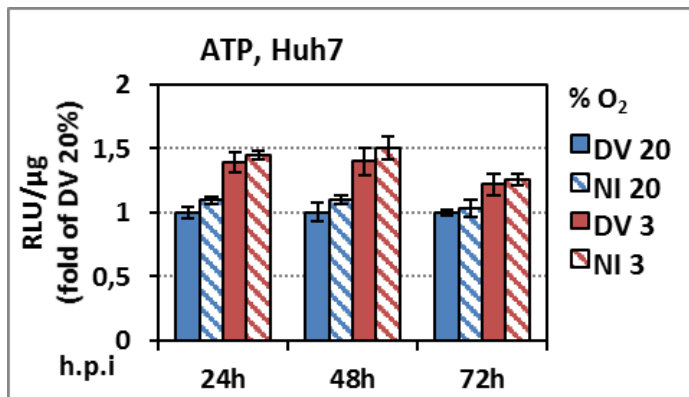


Εικόνα 1. Ανοσοσύτρωμα τύπου Western έναντι της πρωτεΐνης του DENV NS3 (anti-NS3 DENV αντίσωμα) σε κύτταρα Huh7 (moi=0,5). Η δοκιμασία έγινε και για την β-ακτίνη που αποτελεί εσωτερικό μάρτυρα. Τα δείγματα προήλθαν από κύτταρα Huh7 μολυσμένα μη τα οποία επώαστηκαν μέχρι τις 48 h στις 2 συνθήκες O₂ (20% O₂, 3% O₂). Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη μοριακών μαζών των πρωτεϊνών.

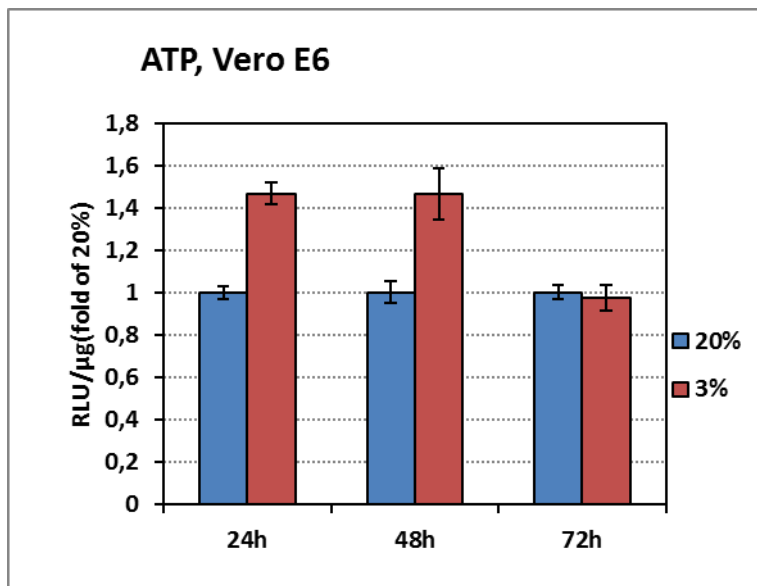
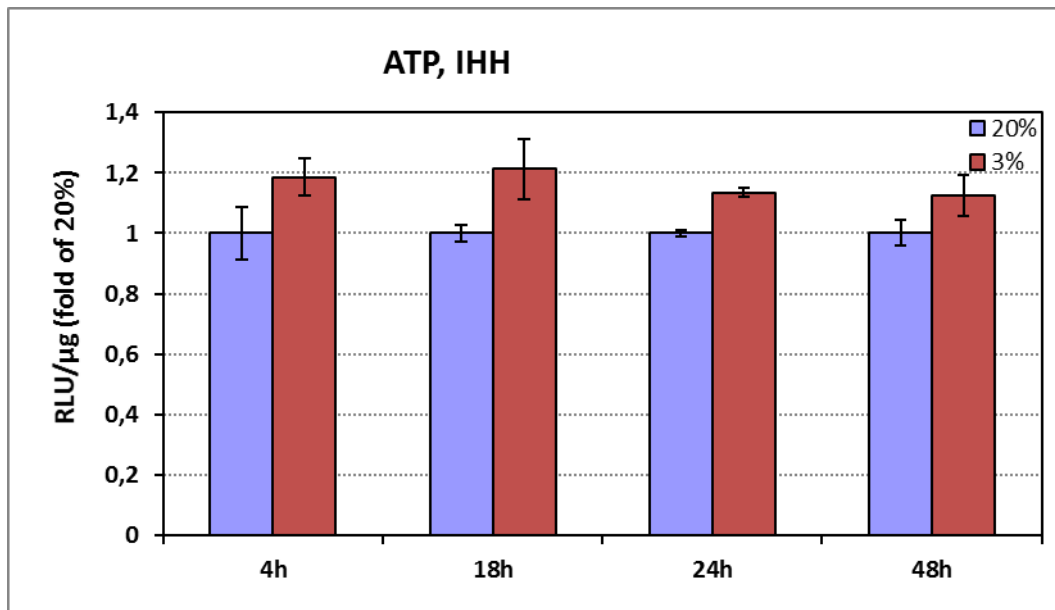
Δ1.4 Έλεγχος των ενδοκυττάρων επιπέδων ATP σε κύτταρα Huh7, Vero E6 και IHH μολυσμένα με τον ιό DENV παρουσία ιστικής νορμοξίας (3% O₂).

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε πυκνότητα 30%. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DENV τα μισά πηγάδια κάθε πλάκας ώστε να έχουμε σε αντιστοιχία μολυσμένα (DV) και μη μολυσμένα πηγάδια (NI). Μοιράστηκαν οι πλάκες σε αντιστοιχία στους κλιβάνους και επώαστηκαν για 24-72 h παρουσία 20% ή 3% O₂. Στη συνέχεια λύθηκαν τα κύτταρα με το ειδικό λυτικό διάλυμα και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ATP με μέθοδο που βασίζεται στη παραγωγή χημειοφωταύγειας. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράστηκαν ως προς τη συνθήκη DV 20% O₂. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρατηρούμε αύξηση στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ATP παρουσία 3% O₂ σε σχέση με το 20% O₂ ανεξαρτήτως μόλυνσης και μικρή μείωση του παρουσία του ιού σε κάθε συνθήκη. Επομένως παρατηρούμε πως η αύξηση στο ATP παρουσία 3% O₂ συμβαίνει ταυτόχρονα με την αύξηση στον πολλαπλασιασμό του ιού παρουσία υποξίας.

Παράλληλα, στα ίδια κύτταρα IHH και Vero που μετρήσαμε την ενεργότητα λουσιφεράσης για να προσδιορίσουμε τον πολλαπλασιασμό του ιού στο πείραμα Δ.1.1, μετρήθηκαν και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Τα κύτταρα Vero και IHH στρώθηκαν σε πλάκες 96well και μοιράστηκαν οι πλάκες κάθε κυτταροσειράς σε δύο κλιβάνους έναν με συνθήκη επώασης 20% O₂ και ένα με συνθήκη επώασης 3% O₂. Οι πλάκες επώαστηκαν μέχρι τις 72h στις 2 συνθήκες, λύθηκαν σε διάφορες ενδιάμεσες χρονικές στιγμές με Via Light Cell Lysis Buffer και μετρήθηκαν τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ATP με μέθοδο που βασίζεται στην παραγωγή χημειοφωταύγειας. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford σε κάθε δείγμα και απεικονίζονται ως λόγος του 20% το οποίο θεωρούμε ως 1. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρατηρούμε αύξηση στη παραγωγή του ενδοκυτταρικού ATP σε συνθήκες υποξίας σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση.



Διάγραμμα 6. Έλεγχος των επιπέδων ενδοκυτταριού ATP στη μόλυνση με τον ιό DENV σε Huh7 κύτταρα σε συνθήκες υποξίας (3% O₂) και σε κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂). Ο έλεγχος έγινε ύστερα από μόλυνση των κυττάρων, επώαση μέχρι τις 72 h στις 2 συνθήκες, λύση σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές και μέτρηση των επιπέδων ATP. Τα μη μολυσμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράστηκαν ως λόγος προς το μολυσμένο δείγμα (I) στη συνθήκη 20% O₂ το οποίο θεωρούμε ως 1.

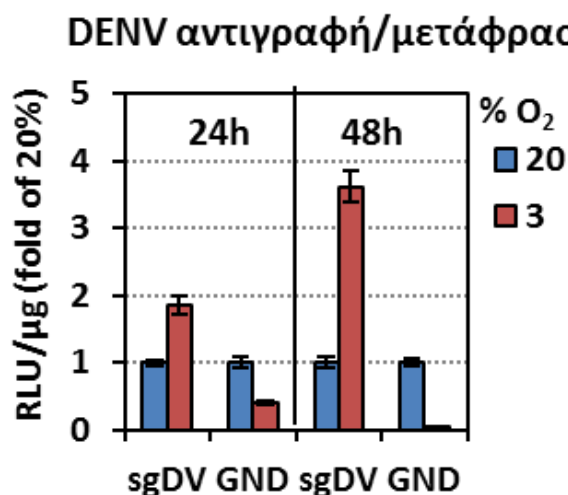


Διαγράμματα 7-8. Έλεγχος της επίδρασης της υποξίας στη παραγωγή ATP σε μολυσμένα με DENV κύτταρα IHH και Vero. Ο έλεγχος έγινε μετά από επώαση των κυττάρων στις 2 συνθήκες οξυγόνου για 4-72 h, λύση των κυττάρων και μέτρηση ATP. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράστηκαν ως λόγος του 20% το οποίο θεωρούμε ως 1.

Δ1.5 Διερεύνηση του σταδίου του κύκλου ζωής του DENV που ενισχύεται στην υποξία με ηλεκτροδιάτρηση της ελαττωματικής στην αντιγραφή ιϊκής αλληλουχίας (GND) και του υπογενωμικού ρεπλικονίου (sgDV) σε κύτταρα Huh7

Ένα ερώτημα που γεννιάται παρατηρώντας την αύξηση στο πολλαπλασιασμό του ιού παρουσία υποξίας είναι ο τρόπος με τον οποίο η υποξία ενισχύει την αναπαραγωγή του ιού και μάλιστα το στάδιο στο κύκλο ζωής του ιού που ενισχύεται σε αυτή τη συνθήκη. Με ηλεκτροδιάτρηση εισαγάγαμε σε κύτταρα Huh7 ελαττωματικό στην αντιγραφή RNA της πλήρους ιϊκής αλληλουχίας (GND) ή το υπογενωμικό ρεπλικόνιο (sgDV) του ιού και μελετήσαμε την αύξηση του ιού στις δύο συνθήκες. Με αυτό το πείραμα παραλείπεται στο κύκλο ζωής του ιού, το στάδιο της εισόδου στο κύτταρο.

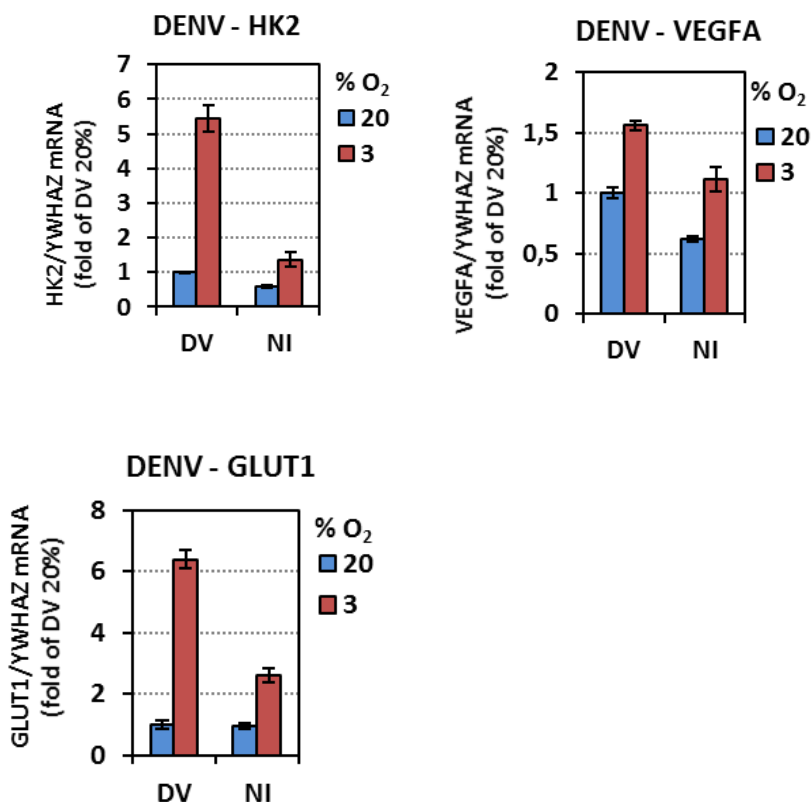
Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες και προεπώστηκαν στο 20% ή 3% O₂. 24 h μετά εισήχθη με μέθοδο ηλεκτροδιάτρησης το ελαττωματικό στην αντιγραφή γονιδίωμα του ιού (GND) και το υπογενωμικό ρεπλικόνιο (sgDV) του ιού και τα κύτταρα επώστηκαν στις συνθήκες 20% O₂ και 3% O₂ μέχρι τις 48 h. Λύθηκαν στις 24 και 48 h μετά την ηλεκτροδιάτρηση και μετρήθηκε η λουσιφεράση. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράστηκαν ως προς το 20% O₂ το οποίο θεωρούμε ως 1. Παρατηρούμε αξιοσημείωτη ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του ιού παρουσία του 3% O₂ στα κύτταρα που δέχθηκαν το sgDV, ενώ δεν παρατηρούμε μεταβολή στον πολλαπλασιασμό του ιού στα κύτταρα που δέχθηκαν το GND. Έτσι, αφενός συμπεραίνουμε πως η επαγόμενη από την υποξία ενίσχυση πραγματοποιείται σε στάδιο μετά τη είσοδο του ιού (χωρίς να αποκλείεται μία ενίσχυση και στην είσοδο) αφετέρου πως η ενίσχυση πραγματοποιείται στο στάδιο της αντιγραφής του ιού και όχι σε εκείνο της μετάφρασης.



Διάγραμμα 9. Έλεγχος του σταδίου του κύκλου ζωής του ιού το οποίο ενισχύεται παρουσία υποξίας. Παρουσιάζονται η αντιγραφή και η μετάφραση του ιικού RNA ύστερα από ηλεκτροδιάτρηση με το RNA του DENV, με το υπογενωμικό ρεπλικόνιο sgDV ή το ελαττωματικό στην αντιγραφή στέλεχος GND (10mg RNA/4X10⁶ κύτταρα) σε κύτταρα Huh7 που έχουν προεπαστεί για 24 h στο 20% O₂ ή στο 3% O₂ και έχουν περαιτέρω καλλιεργηθεί ύστερα από την ηλεκτροδιάτρηση στις δύο συνθήκες οξυγόνου, όπως προσδιορίστηκαν με τη μέτρηση της ενεργότητας λουσιφεράσης. Οι μπάρες απόκλισης αντιπροσωπεύουν το SD τουλάχιστον 2 πειραμάτων σε triplicates (p<0,01).

Δ1.6 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων-δεικτών την υποξίας και της αναερόβιας γλυκόλυσης.

Μελετήσαμε την επίδραση του DENV στον υποξικό και μεταβολικό επαναπρογραμματισμό του κυττάρου. Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 12 well και προεπώσθηκαν στο 20% ή 3% O₂. Μία μέρα μετά μολύνθηκαν τα μισά κύτταρα σε κάθε πλάκα με DENV(DV-R2a moi=0,5) έτσι ώστε να είναι σε αντιστοιχία τα μολυσμένα με τα μη μολυσμένα πηγάδια σε κάθε πλάκα. Στις 4hpi έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού σε όλα τα πηγάδια και στη συνέχεια τα κύτταρα συνέχισαν την επώασή τους στις δύο συνθήκες μέχρι τις 24 h. Στις 24 h pi λύθηκαν με triazol και αφού απομονώθηκε το ολικό RNA από κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε RT PCR με τυχαία εξαμερή ως εκκινητές. Ακολούθησε ποσοτική PCR (q-PCR) με ειδικούς εκκινητές για το κάθε γονίδιο που μελετήθηκε. Προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα mRNA του κυτταρικού γονιδίου YWHAZ το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Παρατηρούμε επαγωγή του δείκτη υποξίας VEGFA και των δεικτών της γλυκόλυσης HK2 και GLUT1 παρουσία του DENV ήδη από τις 24 hpi.



Διαγράμματα 10-12. Επίδραση της μόλυνσης με DENV στον υποξικό και μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Ποσοτικοποίηση με RT-qPCR ανάλυση των επιπέδων mRNA των VEGFA, HK2, GLUT1 σε κύτταρα Huh7 μολυσμένα με τον DENV (DV-R2a moi=0,5) καλλιεργημένα στο 20% O₂ ή στο 3% O₂ για 24h. Για τη κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα mRNA του YWHAZ. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς το 20% O₂ το οποίο θεωρούμε ως 1.

Δ1.7 Έλεγχος του ρόλου του HIF μονοπατιού στην παρατηρούμενη ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV παρουσία υποξίας.

Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου δείξαμε πως η παρατηρούμενη ενίσχυση στον πολλαπλασιασμό του HCV παρουσία υποξίας οφείλεται μερικώς στο AKT και είναι ανεξάρτητη του HIF (HIF-independant). Έτσι διερευνήσαμε το ρόλο του HIF μονοπατιού στην παρατηρούμενη ενίσχυση του DENV παρουσία υποξίας. Για να το πετύχουμε αυτό ελέγξαμε αρχικά την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στην ενεργοποίηση του HIF. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε χημικά τα οποία δημιουργούν υποξικές συνθήκες μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού του HIF, και θα αναφέρονται στη συνέχεια ως

χημικά της υποξίας, και ελέγξαμε την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στα πρωτεϊνικά επίπεδα του HIF. Προτού πραγματοποιήσουμε τα κύρια πειράματα, τα χημικά της υποξίας ελέγχθηκαν με πειράματα ελέγχου για την κυτταροτοξικότητα τους με μέτρηση ATP και για τη δραστηκότητά τους με μέτρηση της HRE ενεργότηας. Στη συνέχεια, ελέγξαμε την επίδραση της ενεργοποίησης του HIF μονοπατιού στον πολλαπλασιασμό του DENV με μέτρηση λουσιφεράσης. Τέλος, για τον ίδιο σκοπό, χρησιμοποιήσαμε φορείς που φέρουν αλληλουχία για την HIF1 α /2 α υπομονάδα και το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του DENV και ελέγξαμε τον πολλαπλασιασμό του DENV.

Δ1.7.A Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας και της επίδρασης των χημικών της υποξίας CoCl₂, DMOG, DFO στην επαγωγή του HIF και στον πολλαπλασιασμό του DENV σε κύτταρα Huh7.

Αρχικά, ελέγξαμε την κυτταροτοξικότητα των χημικών στο σύστημά μας. Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε 30% πληρότητα και 24 h μετά προστέθηκαν τα χημικά της υποξίας σε υποδιπλάσιες συγκεντρώσεις. Κρατήσαμε κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκαν χημικά, αλλά μόνο θρεπτικό υλικό για να τα χρησιμοποιήσουμε ως δείγμα ελέγχου (M). Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των χημικών CoCl₂, DMOG και DFO για 24-48 h, λύθηκαν στις 24 και στις 48 h pi και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ATP. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στα διαγράμματα που ακολουθούν βλέπουμε τα αποτελέσματα να εκφράζονται ως λόγος του δείγματος ελέγχου (M) το οποίο θεωρούμε ως 1.

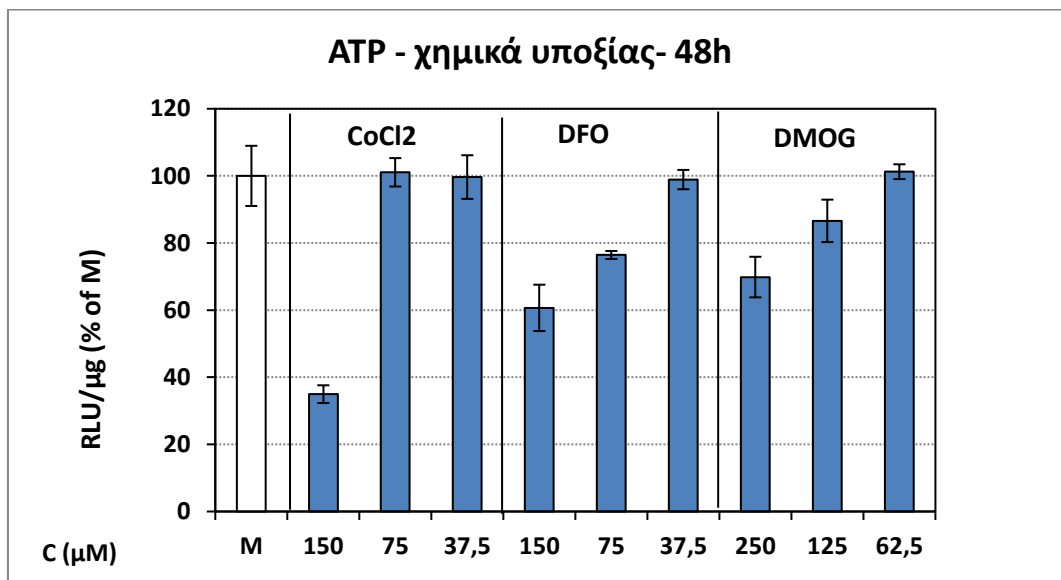
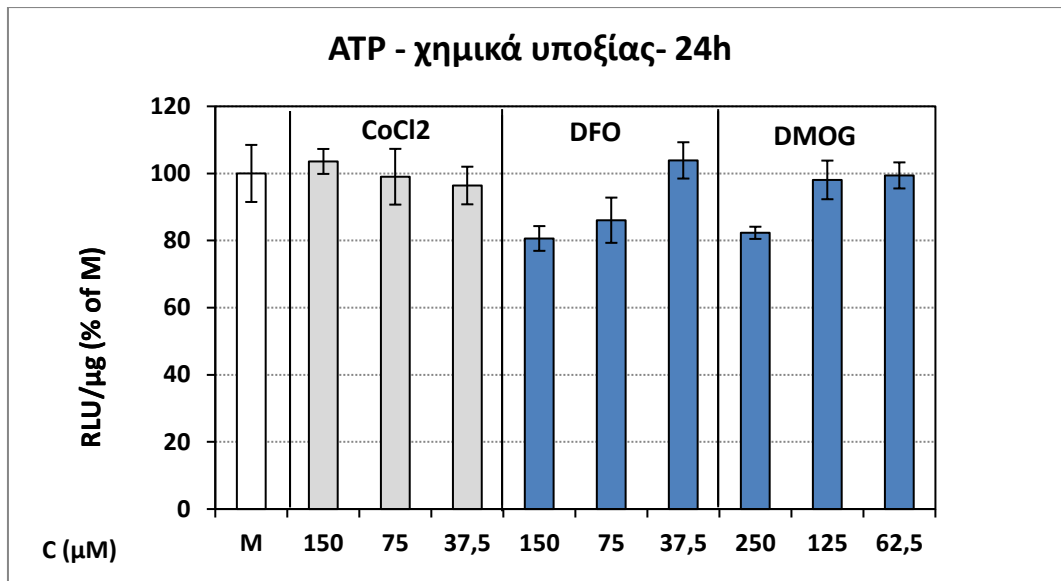
Παράλληλα, προκειμένου να εξακριβώσουμε τη δραστηκότητα των χημικών στην επαγωγή του HIF, στρώθηκαν και κύτταρα Huh7 και πραγματοποιήθηκε transfection με πλασμίδια 9-HRE-Luc. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα χημικά της υποξίας ή με θρεπτικό υλικό απουσία χημικού (M) για 24 h και στη συνέχεια λύθηκαν και προσδιορίστηκε η ενεργότηα λουσιφεράσης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρατηρούμε πως τα χημικά πράγματι επάγουν την έκφραση της HRE και μάλιστα το πιο αποτελεσματικό είναι το DMOG. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό του M το οποίο θεωρούμε ως 1.

Προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση των χημικών στο πολλαπλασιασμό του DENV επιλέξαμε και χρησιμοποιήσαμε τις συγκεντρώσεις με το μέγιστη δράση στο HRE και την ελάχιστη κυτταροτοξικότητα (πειράματα ελέγχου).

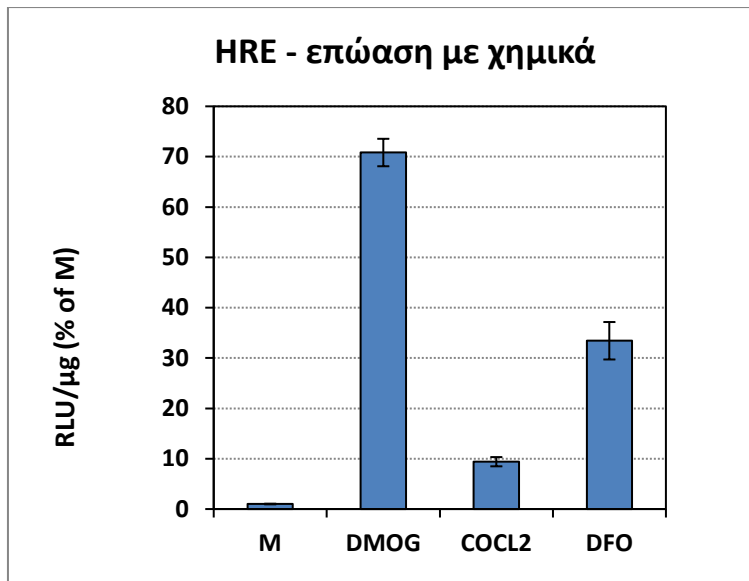
Για τον έλεγχο της επίδρασης της μόλυνσης με τον DENV στα επίπεδα του HIF πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία τύπου Western. Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών και 24 h μετά μολύνθηκαν με DENV

παρουσία των χημικών της υποξίας CoCl_2 , DMOG και DFO σε συγκεντρώσεις CoCl_2 75Μμ, DMOG 62,5Μμ και DFO 37,5Μμ. Ως κύτταρα ελέγχου (M) χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μολυσμένα και μη, παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού και απουσία χημικού. Στις 4 h pi αφαιρέθηκε ο ιός και έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα ενώ το πλήρες θρεπτικό υλικό που προστέθηκε περιείχε κατά δείγμα το αντίστοιχο χημικό στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα λύθηκαν στις 24 h pi, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και ακολούθησε ανοσοσύτρωση western έναντι της ιϊκής πρωτεΐνης NS3 και της χημικά επαγόμενης πρωτεΐνης HIF1α. Παράλληλα ανιχνεύθηκε και η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Η NS3 παρατηρείται αυξημένη παρουσία των χημικών της υποξίας και κυρίως παρουσία του DMOG. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση της HIF1α η οποία έχει επαχθεί χημικά, παρουσία του ιού.

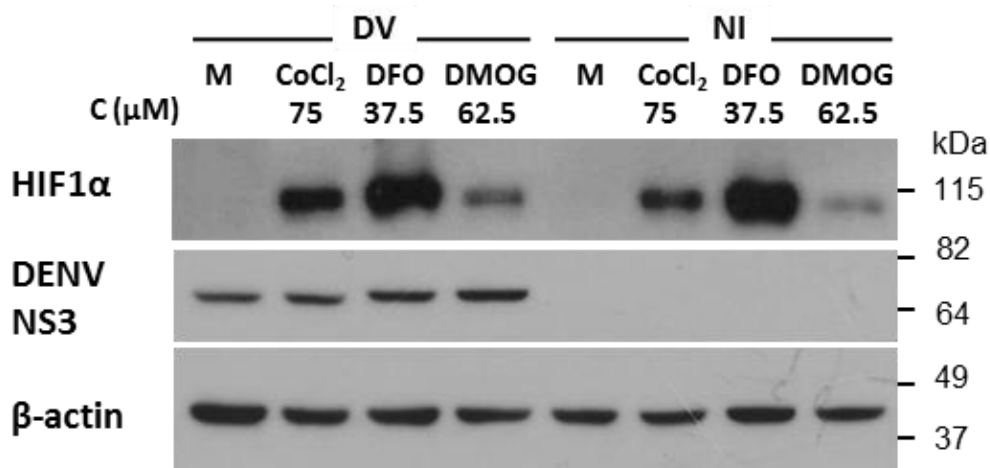
Για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του ιού παρουσία των χημικών που επάγουν τον HIF μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης. Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε 30% πληρότητα και μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DENV σε θρεπτικό υλικό που περιείχε κάθε ένα από τα χημικά. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον ιό για 4h και στη συνέχεια έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και προσθήκη νέου με το αντίστοιχο κάθε φορά χημικό, στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των χημικών για 24-48 h, και λύθηκαν στις 24 και στις 48 h pi για μέτρηση λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και παρουσιάζονται ως λόγος του δείγματος ελέγχου που περιέχει μόνο θρεπτικό υλικό απουσία χημικού (M) το οποίο θεωρούμε ως 1. Στο διαγράμμα παρατηρούμε μέχρι και άνω από 3 φορές αύξηση στο πολλαπλασιασμό του ιού όταν επάγεται το μονοπάτι του HIF.



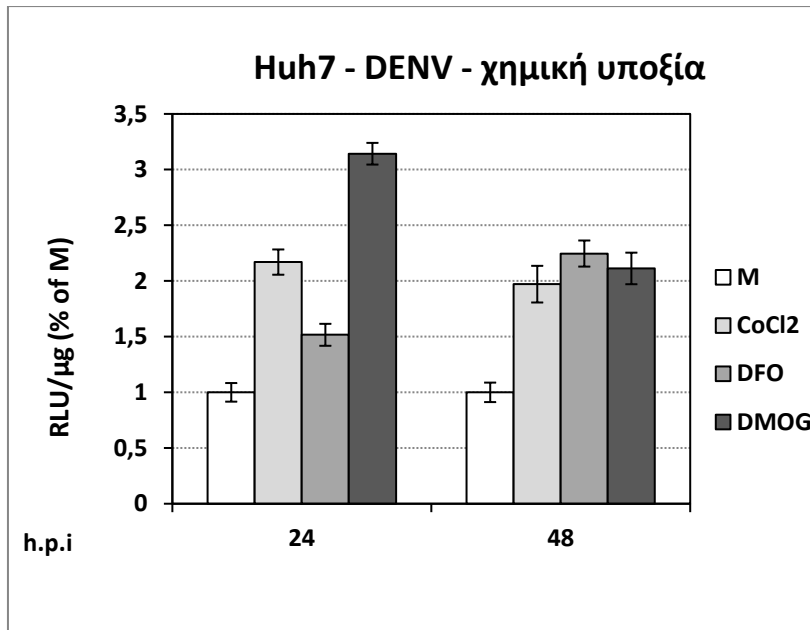
Διαγράμματα 13-14. Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των χημικών της υποξίας σε κύτταρα Huh7-Lunet. Διαδοχικές αραιώσεις των χημικών προστέθηκαν σε κύτταρα Huh7 και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 24-48h. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ATP και κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του M (% M).



Διάγραμμα 15. Έλεγχος της HRE ενεργότητας ύστερα από επώαση με χημικά που επάγουν τον HIF, δημιουργώντας υποξικές συνθήκες. Transfection 9XHRE-Luc πλασμιδίων σε κύτταρα Huh7 ως πείραμα ελέγχου. Η εξαρτώμενη από την HRE έκφραση της F-Luc μετρήθηκε στις 24h και εκφράστηκε σε RLU/μg επί της συνολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % του δείγματος ελέγχου (M). Αποτελεί απόδειξη ότι τα χημικά όντως επάγουν ή/και σταθεροποιούν τον HIF.



Εικόνα 2. Ανοσοστύπωμα τύπου Western έναντι της NS3, του HIF1α και της β ακτίνης. Παρουσιάζεται η επίδραση της ενεργοποίησης του HIF στον DENV και αντίστροφα του DENV στα χημικά επαγόμενα επίπεδα του HIF. Χρησιμοποιήσαμε αντισώματα anti-HIF1α και anti-NS3 σε μολυσμένα με τον DENV (DVR2a μοί=0,5) κύτταρα huh7 τα οποία επώαστηκαν με 75Μμ CoCl₂, 37Μμ DFO ή 62,5Μμ DMOG για 24h στο 20% O₂. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.



Διαγράμμα 16. Έλεγχος του πολλαπλασιασμού του ιού παρουσία χημικής υποξίας σε κύτταρα Huh7. Ο έλεγχος έγινε ύστερα από μόλυνση των κυττάρων με τον DENV, επώαση των κυττάρων για 24-48h με τα χημικά της υποξίας, σε συγκεντρώσεις μη κυτταροτοξικές, λύση σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές και μέτρηση λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και παρουσιάζονται ως λόγος του M που θεωρούμε ως 1.

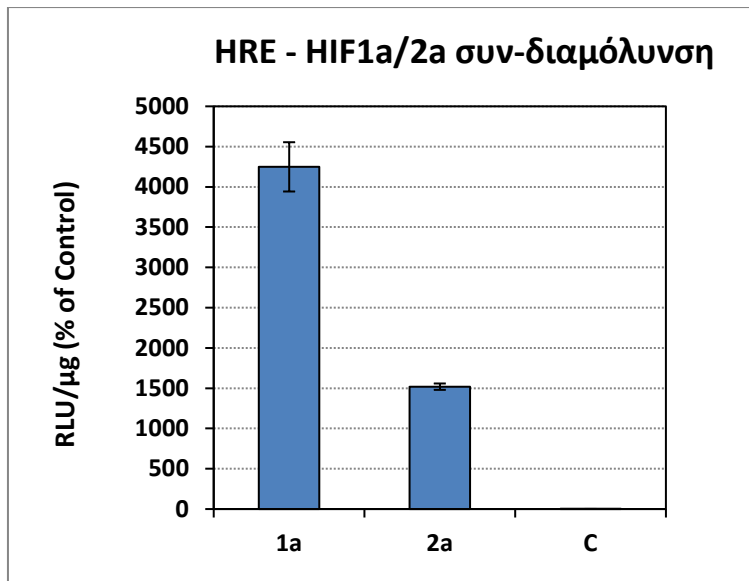
Δ2. Εξακρίβωση του ρόλου του άξονα PI3K/AKT/HIF/γλυκόλυση στη συσχέτιση ανάμεσα στο ενδοκυτταρικό οξυγόνο και την αντιγραφή του DENV

Δ2.1 Έλεγχος της επίδρασης της υπερέκφρασης του HIF στο πολλαπλασιασμό του DENV σε κύτταρα Huh7 με συνδιαμόλυνση με το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του ιού (sgDV) και την αλληλουχία των ισομορφών του HIF (HIF1α/2α) και εξακρίβωση της ενεργοποίησης του HIF με ανεξάρτητη συνδιαμόλυνση με την αλληλουχία HRE και την αλληλουχία των ισομορφών του HIF (HIF1α/2α).

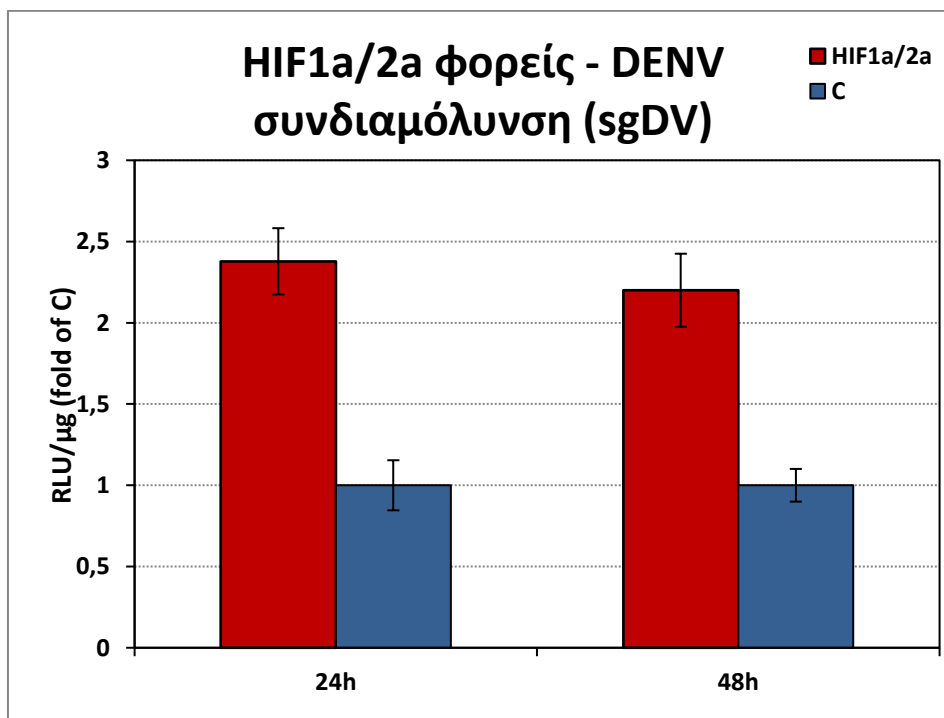
Για να διακρίνουμε τους καθοριστικούς παράγοντες στη σχέση ανάμεσα στο ενδοκυτταρικό οξυγόνο και την αντιγραφή του DENV υπερεκφράσαμε τον HIF.

Αρχικά, επιστρώσαμε κύτταρα Huh7 σε πλάκες 48 πηγαδιών σε 40-50% πληρότητα και 24 h αργότερα πραγματοποιήσαμε πείραμα συν-διαμόλυνσης στα κύτταρα με φορείς που φέρουν τις αλληλουχίες των ισομορφών του HIF, HIF1α ή HIF2α και την αλληλουχία 9XHRE-Luc, ως πείραμα ελέγχου. Στην αλληλουχία HRE προσδένεται ο HIF. Στις 24 h μετά λύσαμε τα κύτταρα με το κατάλληλο λυτικό διάλυμα και μετρήσαμε την εξαρτώμενη από την HRE έκφραση της F-Luc, η οποία εκφράζεται σε RLU/μg επί της συνολικής πρωτεΐνης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί, μέσω της HRE ενεργότητας, επιβεβαιώνουμε τη λειτουργικότητα του HIF.

Στη συνέχεια ελέγξαμε την επίδραση της υπερέκφρασης του HIF στον πολλαπλασιασμό του DENV. Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 48 πηγαδιών σε 40-50% πληρότητα και 24 h μετά πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες πειραματικές διαδικασίες διαμόλυνσης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συν-διαμόλυνση στα κύτταρα με το ιϊκό RNA που περιέχει το υπογενωμικό ρεπλικόνιο του DENV και με φορείς έκφρασης των ισομορφών του HIF, HIF1α/2α και σε αντιστοιχία μόνο με το ιϊκό RNA του DENV και κενούς φορείς (C). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-48h παρουσία 20% O₂ και λύθηκαν στις χρονικές στιγμές που παρουσιάζονται. Μετρήθηκε η ενεργότητα λουσιφεράσης η οποία είναι ενδεικτική της αντιγραφής και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στο διάγραμμα που ακολουθεί τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως λόγος του δείγματος ελέγχου (C) το οποίο θεωρούμε ως 1 και στο οποίο εισήχθη μόνο το ιϊκό RNA. Παρατηρούμε αύξηση άνω των 2 φορές στην αναπαραγωγή του ιού παρουσία της HIF υπομονάδας (HIF1α/2α) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (C) που δεν εκφράζεται ο HIF οπότε επιβεβαιώνουμε το ρόλο του HIF στη αύξηση του DENV παρουσία υποξίας.



Διαγράμμα 17. Συν-διαμόλυνση των HIF1α ή HIF2α και 9XHRE-Luc πλασμιδίων σε κύτταρα Huh7 ως πείραμα ελέγχου. Η εξαρτώμενη από την HRE έκφραση της F-Luc μετρήθηκε στις 24 h και εκφράστηκε σε RLU/μg επί της συνολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό % του φορέα (V).



Διάγραμμα 18. Η επίδραση της υπερέκφρασης του HIF στην αναπαραγωγή του DENV σε κύτταρα Huh7 στα οποία πραγματοποιήσαμε συν-διαμόλυνση με HIF1α/2α φορείς ή κενό φορέα ως δείγμα ελέγχου (C) και με το

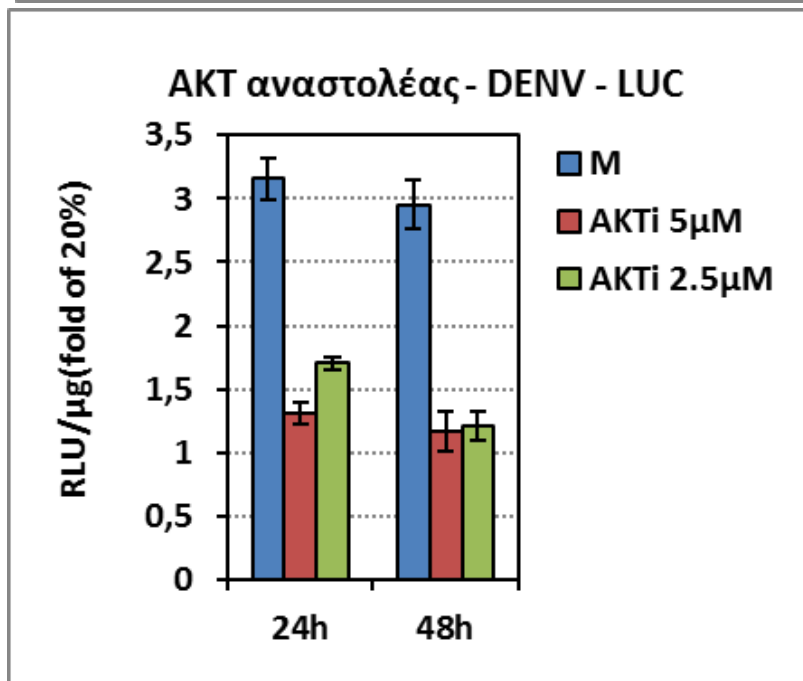
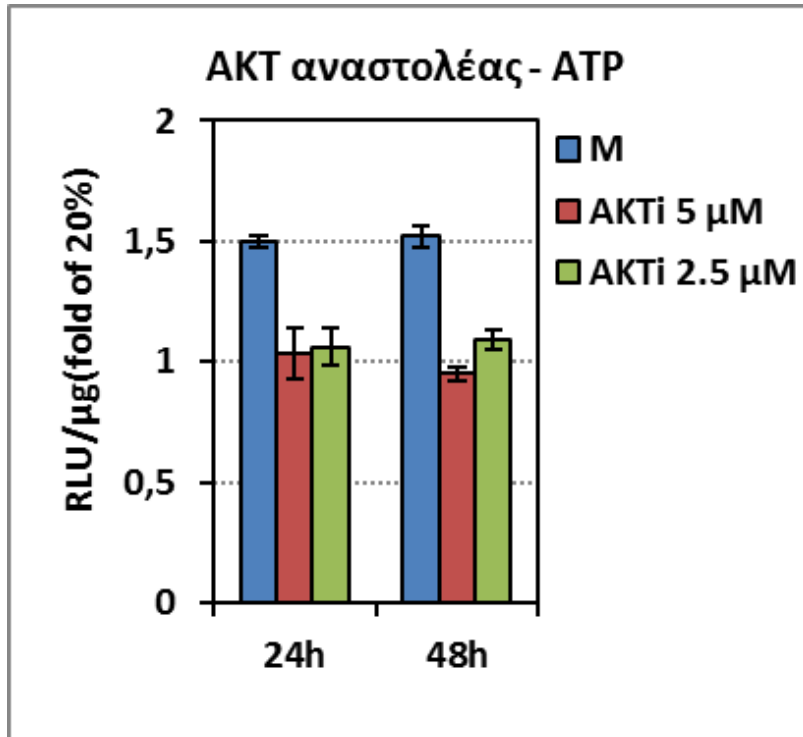
υπογενωμικό ρεπλικόνιο του DENV (sgDV). Η ενεργότητα λουσιφεράσης που επάγεται από την αντιγραφή εκφράζεται σε RLU/μg της συνολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford και εκφράζονται ως λόγος προς τον φορέα (C) το οποίο θεωρούμε ως 1.

Δ2.2 Διερεύνηση του ρόλου του μονοπατιού επιβίωσης/πολλαπλασιασμού PI3K/AKT στην εξαρτώμενη από το οξυγόνο αύξηση στο πολλαπλασιασμό του DENV και στη παραγωγή ATP.

Γνωρίζοντας το κύριο ρόλο του μονοπατιού PI3K-AKT στο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό, διερωτηθήκαμε το ρόλο του AKT στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV και στη παρατηρούμενη αύξηση στη παραγωγή ATP παρουσία χαμηλής τάσης οξυγόνου (3% O₂). Για να το διερευνήσουμε χρησιμοποιήσαμε ειδικό αναστολέα έναντι της φωσφορυλίωσης του AKT (AKTi VII) και εξετάσαμε την επίδραση της αναστολής του AKT στο πολλαπλασιασμό του DENV και στη παραγωγή ATP στην υποξία (3% O₂).

Δ2.2.A Έλεγχος του ρόλου του PI3K-AKT μονοπατιού στην ενίσχυση στο πολλαπλασιασμό του DENV και στην αύξηση στη παραγωγή ATP παρουσία υποξίας

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και προεπώστηκαν στο 20% O₂ ή στο 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DENV (DV-R2A, μοί 0,01) και στις 4 h πi αφαιρέθηκε ο ιός και προστέθηκε σε όλα τα πηγάδια θρεπτικό υλικό με τον AKTi σε συγκεντρώσεις των 5μM και των 2.5μM. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό απουσία του αναστολέα (M). Στη συνέχεια οι πλάκες μοιράστηκαν σε αντιστοιχία στους δύο κλιβάνους, της υποξίας (3% O₂) και το κλασσικό επωαστικό (20% O₂), και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-48 h. Στις 24 και 48 h πi λύθηκαν με το κατάλληλο λυτικό διάλυμα, μετρήθηκαν τα επίπεδα ενδοκυττάρου ATP και η ενεργότητα λουσιφεράσης και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στα διαγράμματα που ακολουθούν βλέπουμε πως παρουσία του AKT αναστολέα καταργείται η αύξηση στη παραγωγή ATP και η ενίσχυση στην αντιγραφή του ιού παρουσία υποξίας, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο του AKT στην αύξηση της παραγωγής ενέργειας του κυττάρου και στην ενίσχυση της αντιγραφής του DENV παρουσία χαμηλής τάσης O₂.

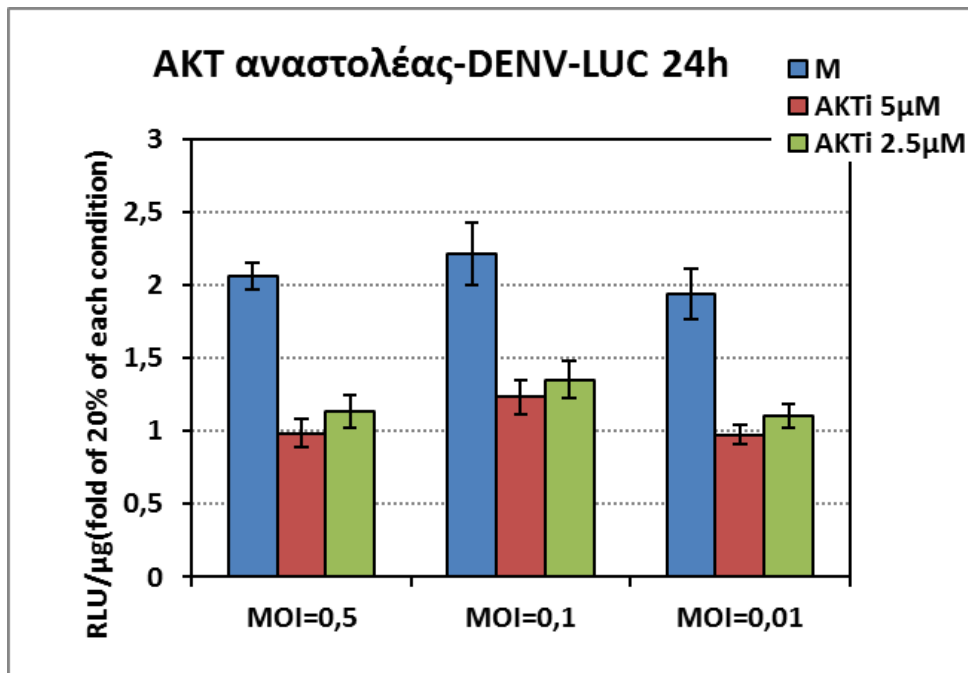


Διαγράμματα 19-20. Έλεγχος της επίδρασης της αναστολής της AKT σηματοδότησης στη παραγωγή ATP και στην αντιγραφή του DENV παρουσία υποξίας. Τα κύτταρα προεπώστηκαν στο 20% O₂ ή 3% O₂, μολύνθηκαν και επώστηκαν με τον ιό (DV-R2A, μοί 0,01) για 4 h και στη

συνέχεια επωάστηκαν με τον AKTi VIII σε 2.5μM ή 5μM στην αντίστοιχη συνθήκη οξυγόνου. Μετρήθηκαν τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP και η επαγόμενη από την αντιγραφή ενεργότητα λουσιφεράσης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση και εκφράζονται ως RLU/mg επί της συνολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του 20% κάθε συγκέντρωσης το οποίο θεωρούμε ως 1.

Δ2.2.B Έλεγχος του ρόλου του PI3K-AKT μονοπατιού στην αύξηση στο πολλαπλασιασμό του DENV παρουσία υποξίας

Πραγματοποιήσαμε ανάλογο πείραμα αυτή τη φορά με διαφορετικά μοί του DENV και μέχρι τις 24 h ώστε να διαπιστώσουμε την επίδραση στα διαφορετικά μοί σε χρονική στιγμή νωρίς μετά τη μόλυνση. Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και προεπωάστηκαν στο 20% ή στο 3% O₂. Στις 24h αργότερα μολύνθηκαν με τον DENV σε διαφορετικά μοί (0,5 , 0,1 , 0,01) και στις 4 hpi αφαιρέθηκε ο ιός και προστέθηκε θρεπτικό υλικό με τον AKTi VIII σε συγκεντρώσεις των 5μM και των 2.5μM. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό απουσία του αναστολέα (M). Στη συνέχεια οι πλάκες μοιράστηκαν σε αντιστοιχία στους δύο κλιβάνους, της υποξίας (3% O₂) και το κλασσικό επωαστικό (20% O₂), και οι πλάκες επωάστηκαν μέχρι τις 24h. Στις 24hpi τα κύτταρα λύθηκαν, μετρήθηκε η λουσιφεράση και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική πρωτεΐνη με τη μέθοδο Bradford. Στο διάγραμμα που ακολουθεί βλέπουμε πως παρουσία του AKT αναστολέα καταργείται η ενίσχυση της αναπαραγωγής του ιού παρουσία υποξίας σε όλα τα μοί που χρησιμοποιήθηκαν, ήδη από τις 24h, γεγονός που υποστηρίζει το σημαντικό ρόλο του AKT στην ενίσχυση της αντιγραφής του DENV παρουσία υποξίας.



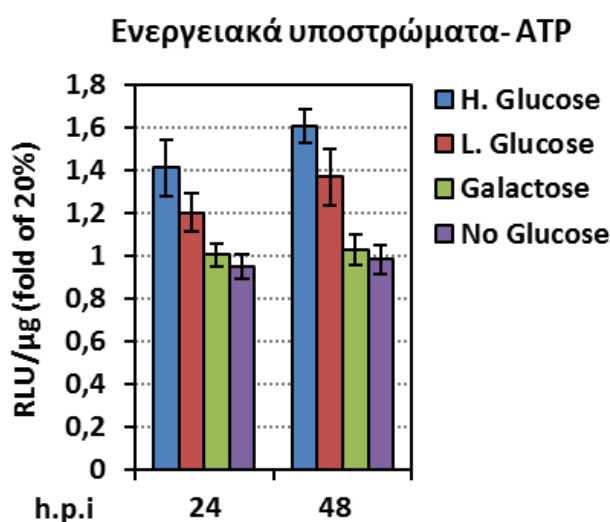
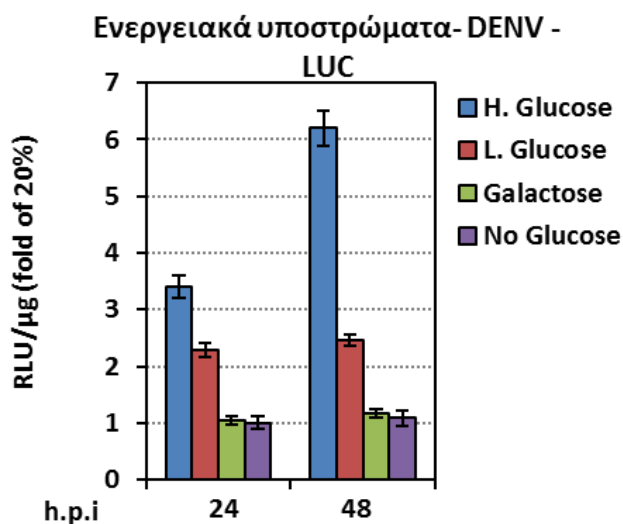
Διαγράμμα 21. Έλεγχος της επίδρασης της αναστολής της AKT σηματοδότησης στην αντιγραφή του DENV σε διαφορετικά μοί του ιού στις 24 h pi. Τα κύτταρα προεπώστηκαν στο 20% O₂ ή 3% O₂, μολύνθηκαν και επώαστηκαν με τον ιό (DV-R2A, μοί 0,5 ή 0,1 ή 0,01) για 4 h και στη συνέχεια επώαστηκαν με τον AKTi VIII σε 2.5μM ή 5μM στην αντίστοιχη συνθήκη οξυγόνου. Μετρήθηκε η επαγόμενη από την αντιγραφή ενεργότητα λουσιφεράσης στις 24 h pi και εκφράζεται ως RLU/mg επί της συνολικής πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του 20% κάθε συγκέντρωσης το οποίο θεωρούμε ως 1.

Δ2.3 Εξακρίβωση του ρόλου του γλυκολυτικού μεταβολισμού στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV παρουσία υποξίας με εναλλαγή Ενεργειακών υποστρωμάτων στο θρεπτικό υλικό και επώαση του ιού παρουσία διαφορετικών γλυκολυτικών υποστρωμάτων.

Εφόσον παρατηρήσαμε αύξηση στη παραγωγή ATP παρουσία υποξίας και μάλιστα ταυτόχρονη αύξηση με τον πολλαπλασιασμό του ιού κινηθήκαμε προς τα πίσω (upstream) και ελέγξαμε το ρόλο του γλυκολυτικού μεταβολισμού στη παρατηρούμενη ενίσχυση του DENV σε υποξικές συνθήκες. Χρησιμοποιήσαμε διαφορετικά ενεργειακά υποστρώματα, αναγκάζοντας τα κύτταρα να αλλάξουν το μεταβολισμό τους από γλυκόλυση σε οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και καλλιεργήθηκαν σε DMEM με διαφορετική περιεκτικότητα σε γλυκόζη στο

20% O₂ ή στο 3% O₂. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το High Glucose με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (h. glucose: 25mM), το Low glucose με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (l.glucose: 5,56mM), το Galactose όπου ως πηγή ενέργειας χρησιμοποιείται η γαλακτόζη (galactose: 10mM) και το No Glucose όπου δεν περιέχεται γλυκόζη (no glucose). Μία ημέρα μετά, τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον DENV (DV-R2A, μοί 0,01). Στις 4 h πi αφαιρέθηκε ο ιός, προστέθηκαν τα αντίστοιχα υποστρώματα και οι πλάκες μοιράστηκαν στο κλίβανο της υποξίας (3% O₂) και κατ'αντιστοιχία στο κλίβανο της κλασσικής κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂). Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον ιό παρουσία διαφορετικών γλυκολυτικών υποστρωμάτων για 24- 48 h, λύθηκαν στις 24 και στις 48 h πi με τα κατάλληλα διαλύματα λύσης (δηλαδή renilla lysis buffer (RLB) για τη λουσιφεράση και ViaLight Cell Lysis Buffer για το ATP) και μετρήθηκαν η ενεργότητα λουσιφεράσης και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν προς τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και εκφράζονται ως λόγος του 20% σε κάθε υπόστρωμα το οποίο θεωρούμε ως 1. Στα διαγράμματα που ακολουθούν, βλέπουμε με την εναλλαγή των ενεργειακών υποστρωμάτων να μειώνεται η αναλογία της ενεργότητας της λουσιφεράσης ανάμεσα στο 20% και στο 3% O₂, δηλαδή να μειώνεται η ενίσχυση στην αντιγραφή του ιού παρουσία υποξίας. Παράλληλα και η ενδοκυττάρια παραγωγή ATP δίνει αντίστοιχη εικόνα, με την αναλογία της παραγωγής του ATP ανάμεσα στο 20% και στο 3% O₂ να μειώνεται σημαντικά με την εναλλαγή των θρεπτικών υλικών. Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι ο αναερόβιος γλυκολυτικός μεταβολισμός έχει κομβικό ρόλο στην παρατηρούμενη ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του DENV σε υποξικές συνθήκες που προσομοιάζουν την ηπατική νορμοξία.



Διαγράμματα 22-23. Η επίδραση του ενεργειακού υποστρώματος που εμπεριέχεται στο θρεπτικό υλικό στην αντιγραφή του DENV (αριστερά) και στα επίπεδα ATP (δεξιά) σε κύτταρα huh7 μολυσμένα με τον DENV (DV-R2A, μοί 0,01). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (high glucose: 25mM), με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (low glucose: 5,56mM) με γαλακτόζη αντί για γλυκόζη (galactose: 10mM) ή καθόλου γλυκόζη (no glucose), στο 20% O₂ ή στο 3% O₂ και στη συνέχεια επώαστηκαν με τον ιό για 4h. Η επαγόμενη από την αντιγραφή ενεργότητα λουσιφεράσης και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ATP εκφράζονται σε RLU (Relative light Units)/μg επί της συνολικής πρωτεΐνης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά τη μόλυνση (hpi). Τα αποτελέσματα από τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο 20% O₂ εκφράζονται ως 1 για το κάθε υπόστρωμα. Οι μπάρες απόκλισης αντιπροσωπεύουν το SD 2 πειραμάτων σε triplicates. p<0,01

Δ3. Ταυτοποίηση της L-Dopa decarboxylase (DDC) που ρυθμίζεται από το χαμηλό οξυγόνο ως ένα καινούργιο σημαντικό καθοριστικό παράγοντα της αντιγραφής και της παθογονικότητας του DENV στην ηπατική νορμοξία

Ελέγξαμε την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στα επίπεδα της ενδοκυττάριας DDC τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε επίπεδο RNA καθώς και το πώς επηρεάζει η υποξία τα επίπεδά της. Παράλληλα διερευνήσαμε την επίδραση του μονοπατιού PI3K-AKT στη ρύθμιση της DDC από τον ιό και ελέγξαμε την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στη DDC και τη PI3K.

Δ.3.1 Η επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στη ρύθμιση της DDC και η σημασία του PI3K-AKT μονοπατιού στην αλληλεπίδραση αυτή.

Κατ'αρχάς διερευνήσαμε την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στην αναλογία των ενδοκυττάριας επιπέδων των ισομορφών της DDC στην υποξία και σε κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας. Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών και προεπώστηκαν στο 20% O₂ ή στο 3% O₂. Στις 24 h αργότερα μολύνθηκαν με τον ιό DENV (DV R2A, μοί 0,5) τα μισά πηγάδια ώστε να υπάρχουν σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Στις 4 h *pi* αφαιρέθηκε ο ιός, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια οι μισές πλάκες, κατ' αντιστοιχία σε συνθήκες, συνέχισαν την επώασή τους στο κλίβανο της υποξίας (3% O₂) και οι υπόλοιπες στο κλασσικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-48 h *pi*, λύθηκαν στις 24 και στις 48 h *pi* και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοδοκιμασία Western έναντι της DDC, της ιϊκής πρωτεΐνης NS3 και έναντι της ακτίνης. Στις εικόνες που ακολουθούν παρατηρούμε πως η μόλυνση με τον DENV αυξάνει την αναλογία των ενδοκυτταρικών επιπέδων την ανενεργής μορφής της DDC των 50 kDa έναντι ενός συμπλόκου 120kDa, ανθεκτικού σε SDS που πιθανά να αντιστοιχεί στην ενεργή διμερή μορφή της DDC. Το φαινόμενο αυτό έχει διαφορετική κινητική στην νορμοξία σε σχέση με την ατμοσφαιρική τάση οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα, αν και η μείωση στα επίπεδα του συμπλόκου των 120kDa είναι εμφανής και στις δύο συνθήκες οξυγόνου ήδη από τις 24h*pi*, υπάρχει μία καθυστέρηση στην αύξηση των επιπέδων του μονομερούς των 50Kda της DDC στο 20% O₂ σε σχέση με το 3%. Η DDC ανιχνεύθηκε με το ειδικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού της άκρου το C-T σε αραίωση 1:1000.

Η DDC ρυθμίζεται από τη χαμηλή τάση οξυγόνου και έχει αρνητικό ρόλο στον ενεργειακό (γλυκολυτικό) μεταβολισμό και λειτουργία στη κυτταρική

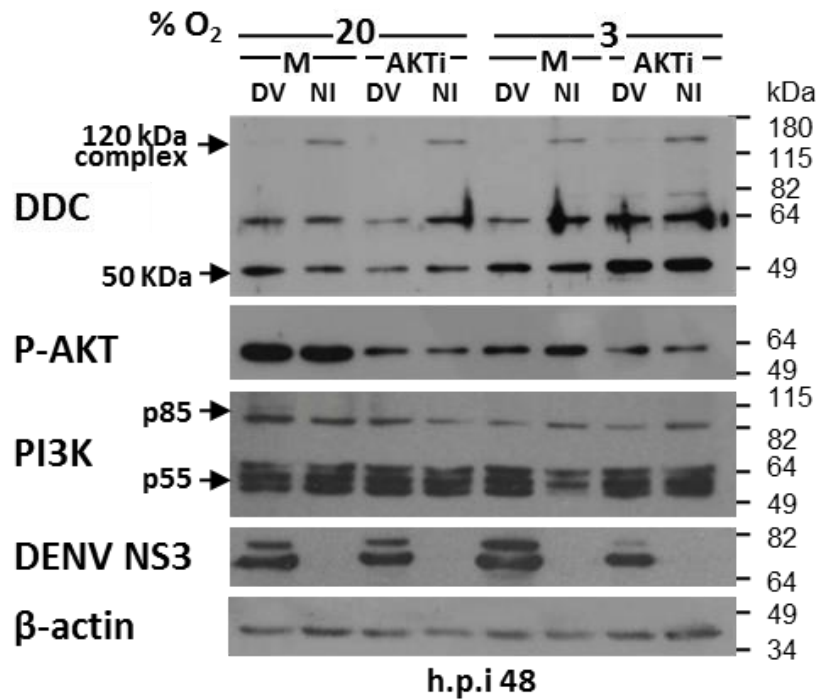
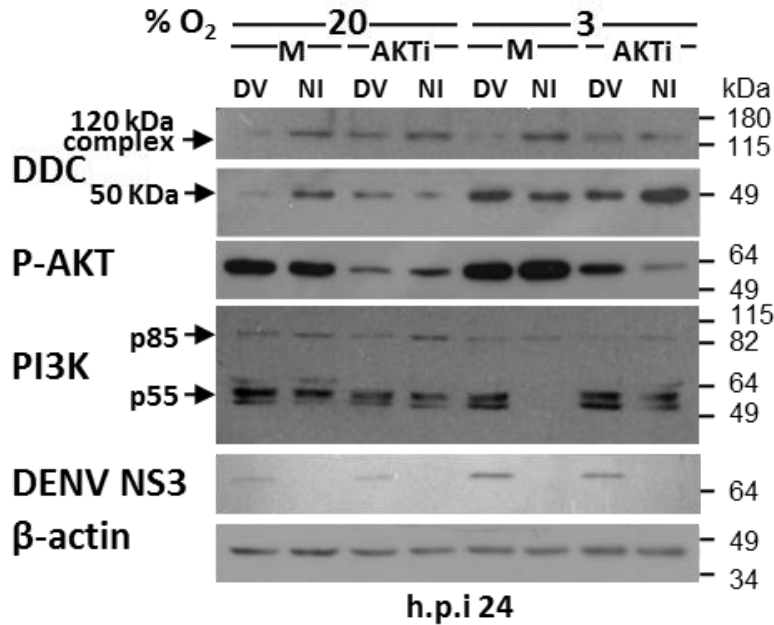
επιβίωση/πολλαπλασιασμό. Όπως δείξαμε και σε προηγούμενα πειράματα, παρουσία υποξίας ενισχύεται ο πολλαπλασιασμός του ιού και άρα και η επίδραση του στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών της DCC στην υποξία. Παρατηρούμε πως παρουσία υποξίας (3% O₂), στις 48 h υπάρχει αύξηση του μονομερούς της DDC των 49 kDa και μείωση του συμπλόκου των 120kDa, ανθεκτικού σε SDS, στα μη μολυσμένα κύτταρα (NI). Παράλληλα, στις ίδιες συνθήκες παρατηρούμε το ίδιο φαινόμενο, πιο ενισχυμένο και στα μολυσμένα κύτταρα (I). Αξίζει να σημειωθεί πως στα μολυσμένα κύτταρα, όπου ο ιός έχει αυξηθεί, δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν το φαινόμενο οφείλεται στη παρουσία του ιού ή στην υποξία.

Στο ίδιο πείραμα διερευνήσαμε το ρόλο του PI3K-AKT μονοπατιού στη μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC στο 20% και στο 3% O₂. Επειδή η κινητική της επίδρασης του DENV στη DDC διαφέρει στην υποξία σε σχέση με ατμοσφαιρικό οξυγόνο (Εικόνα 3), επειδή το AKT εμπλέκεται στην ενίσχυση της ιϊκής αντιγραφής από την υποξία (διαγράμματα 20,21) και με βάση προηγούμενες πρώιμες μελέτες της Καθ. κ. Δ. Βασιλακοπούλου σε κύτταρα νευροβλαστώματος που δείχνουν αλληλεπίδραση της DDC με την PI3K, σκεφτήκαμε να μελετήσουμε τη σχέση του μονοπατιού PI3K-AKT στη ρύθμιση της DDC από τον ιό.

Για το σκοπό αυτό επώασαμε με τον AKT αναστολέα VIII κύτταρα Huh7 μολυσμένα με τον DENV και ελέγξαμε τη ρύθμιση της DDC από τον ιό. Συγκεκριμένα, κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών και προεπώαστηκαν στο 20% O₂ ή στο 3% O₂. Στις 24 h αργότερα μολύνθηκαν με τον ιό DENV (DV R2A, μοί 0,5) τα μισά πηγάδια ώστε να υπάρχουν σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Στις 4 h π*ri* αφαιρέθηκε ο ιός, έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και προστέθηκε θρεπτικό υλικό με τον αναστολέα AKTi VIII σε συγκέντρωση 5μM ή το διαλύτη DMSO. Στη συνέχεια οι μισές πλάκες, κατ' αντιστοιχία σε συνθήκες, συνέχισαν την επώασή τους στο κλίβανο της υποξίας (3% O₂) και οι υπόλοιπες στο κλασικό κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-48 h π*ri*, λύθηκαν στις 24 και στις 48 h π*ri* και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Στην ανοσοδοκιμασία Western που ακολούθησε ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες PI3K και P-AKT. Παρουσία του AKT αναστολέα, η εξαρτώμενη από τη μόλυνση με DENV επίδραση στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων ανενεργής/ενεργής DDC εξαφανίζεται. Στις εικόνες, παρουσία του AKT αναστολέα παρατηρούμε εμφανή μείωση των επιπέδων του φωσφορυλιωμένου AKT οπότε ο αναστολέας μας είναι λειτουργικός. Ανιχνεύουμε το AKT με ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης (p-AKT) σε αραιώση 1:2000.

Όσον αφορά στη PI3K, παρουσία του AKT αναστολέα παρατηρούμε μείωση στα επίπεδά της σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου (M) στο 20% O₂, στις 24 h, και αντίθετα αύξηση στα επίπεδα της στις υποξικές συνθήκες

(3% O₂). Στις 48h, παρουσία του AKT αναστολέα, παρατηρούμε μείωση της ζώνης p85 της PI3K. Ανάμεσα στα επίπεδα των πρωτεϊνών PI3K και DDC παρατηρούμε μία αρνητική συσχέτιση στη μόλυνση με τον DENV, το οποίο είναι σε συμφωνία με τον προαναφερθέντα αρνητικό ρόλο της DDC στον ενεργειακό γλυκολυτικό μεταβολισμό. Συγκεκριμένα και στις 2 συνθήκες (20% O₂, 3% O₂) όταν αυξάνονται τα επίπεδα του συμπλόκου των 120kDa της DDC, μειώνονται τα επίπεδα της p55 υπομονάδας της PI3K. Τέλος, βλέπουμε την ιϊκή πρωτεΐνη NS3 να είναι αυξημένη στο 3% O₂, εφόσον όπως έχουμε δείξει επάγεται ο πολλαπλασιασμός του ιού στην υποξία, ενώ ο εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος, η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, εμφανίζει σταθερή ζώνη σε όλα τα δείγματα.



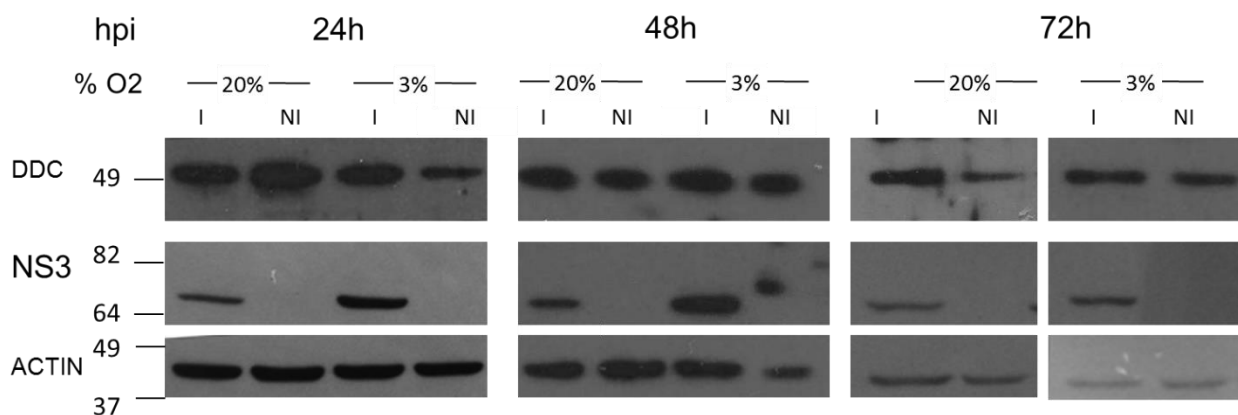
Εικόνες 3-4. Παρουσιάζεται η επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών ενεργή/ανενεργή της DDC και ο ρόλος της αναστολής του AKT στην μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC στο 20% ή 3% O₂. Ανοσοστύπωμα τύπου western (από τη βάση προς τη κορυφή) που έχουν χρησιμοποιηθεί anti-DENV NS3, anti-PI3K, anti-P-AKT και anti-DDC, αντισώματα σε κύτταρα Huh7 που έχουν προεπωαστεί στο 20% ή στο 3% O₂, έχουν επωαστεί για 4 h με τον DENV (DV-R2a, moi 0,5) και στη συνέχεια έχουν δεχθεί τον AKT αναστολέα VIII σε συγκέντρωση 5μM ή το DMSO για 24 h pi (άνω) ή 48 h pi (κάτω) υπό την αντίστοιχη συνθήκη οξυγόνου. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως

εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.

Δ.3.2. Επιβεβαίωση της επίδρασης της μόλυνσης με DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της ανενεργής μορφής της DDC παρουσία ηπατικής νορμοξίας μέχρι και τις 72h μετά τη μόλυνση.

Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε 2 πλάκες 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και προεπώσθησαν στο 20% O₂ ή στο 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με DENV γονοτύπου 1β τα μισά πηγάδια σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Στις 4 h πi αφαιρέθηκε ο ιός και οι πλάκες συνέχισαν την επώασή τους σε κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂) ή στο κλίβανο της υποξίας που προσομοιάζει τις συνθήκες ηπατικής νορμοξίας (3% O₂). Τα κύτταρα λύθηκαν 24, 48 και 72 h μετά τη μόλυνση, τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Bradford και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία western. Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν μέσω της δοκιμασίας ήταν η DDC και η ιική πρωτεΐνη NS3, ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).

Παρατηρούμε πως σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, η ιική πρωτεΐνη NS3 η οποία ανιχνεύεται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα, είναι αυξημένη στο 3% O₂ σε όλες τις χρονικές στιγμές που απεικονίζονται. Στις 24 h μετά τη μόλυνση, στο 20% O₂ η ανενεργή μονομερής μορφή της DDC είναι αυξημένη στα μη μολυσμένα κύτταρα σε σχέση με τα μολυσμένα ενώ στο 3% O₂ η παρατηρούμενη διαφορά αντιστρέφεται με το μονομερές της DDC να είναι αυξημένο παρουσία του DENV. Στις 48 h και στις 72 h πi η ανενεργή DDC είναι αυξημένη παρουσία του DENV και στις 2 συνθήκες. Η ανίχνευση της DDC έγινε με το ειδικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού της άκρου το C-T σε αραίωση 1:1000. Όσον αφορά την κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδά της είναι σχεδόν ίδια σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν.



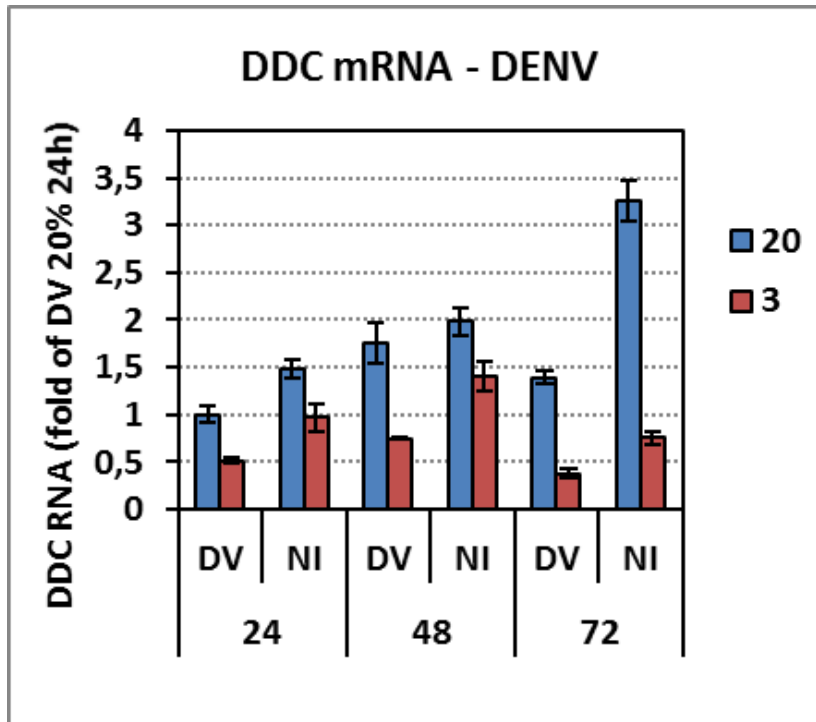
Εικόνα 5. Παρουσιάζεται η επίδραση της υποξίας και της μόλυνσης με τον DENV στα επίπεδα των ενδοκυττάρων επιπέδων της DDC. Ανοσοστύπωμα τύπου western που έχουν χρησιμοποιηθεί (από τη βάση προς τη κορυφή) anti-actin, anti-DDC, ή anti-DENV NS3 αντισώματα σε κύτταρα Huh7 που έχουν προεπαστεί στο 20% ή στο 3% O₂, έχουν επωαστεί για 4 h με τον DENV (DV-1β, μοί 0,5) και στη συνέχεια επωαστεί για 24-72 h pi υπό την αντίστοιχη συνθήκη οξυγόνου. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα αριστερά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.

Δ.3.3 Ποσοτικοποίηση του RNA της DDC με αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR) για τον έλεγχο των επιπέδων του RNA της στη μόλυνση με τον DENV παρουσία υποξίας.

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και προεπώαστηκαν στο 20% ή στο 3% O₂. Μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DENV τα μισά πηγάδια σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια, και οι πλάκες μοιράστηκαν σε δύο επωαστικούς κλιβάνους, έναν με συνθήκη επώασης 20% O₂ και έναν με συνθήκη επώασης 3% O₂. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-72h, λύθηκαν στις 24,48 και 72 h pi με trizol και αφού απομονώσαμε το ολικό κυτταρικό RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) για την σύνθεση cDNA, από το ολικό κυτταρικό RNA που απομονώθηκε. Ακολούθησε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για το γονίδιο της DDC και για το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ.

Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν αφενός πως το RNA της DDC μειώνεται σε υποξικές συνθήκες σε σχέση με τις κλασσικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και αφετέρου πως το RNA της μειώνεται παρουσία του ιού μέχρι και 2 φορές ανεξάρτητα από τη τάση O₂. Η εικόνα αρνητικής ρύθμισης

που βλέπουμε σε επίπεδο RNA συμφωνεί με αυτή που βλέπουμε σε επίπεδο πρωτεΐνης, δηλαδή της αύξησης στην ανενεργή μονομερή μορφή της DDC (49κDa).



Διάγραμμα 24. Η επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στα επίπεδα mRNA της DDC. Τα επίπεδα του mRNA της DDC ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR ανάλυση σε κύτταρα Huh7 που μολύνθηκαν με τον DENV και καλλιεργήθηκαν μέχρι τις 72 h στο 20% O₂ ή στο 3% O₂. Μετά την επώαση των κυττάρων στις 2 συνθήκες, ακολούθησε λύση των κυττάρων, απομόνωση του ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική Q-PCR με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο της DDC. Τα επίπεδα mRNA του κυτταρικού γονιδίου YWHAZ χρησιμοποιήθηκαν για τη κανονικοποίηση των τιμών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς τη τιμή που προέκυψε από τα μολυσμένα κύτταρα στις 24 h ρι στη συνθήκη 20% O₂, την οποία θεωρούμε ως 1.

Δ.3.4 Συν(ανοσοκατακρήμνιση) για διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στη DDC και τη PI3K. Επιβεβαίωση ότι Η DDC και η PI3K αλληλεπιδρούν σε ηπατοκύτταρα.

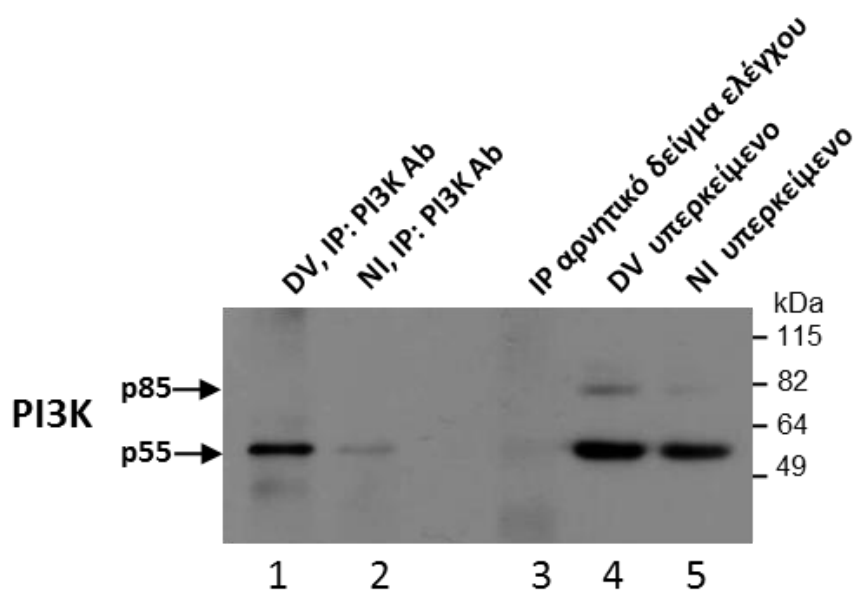
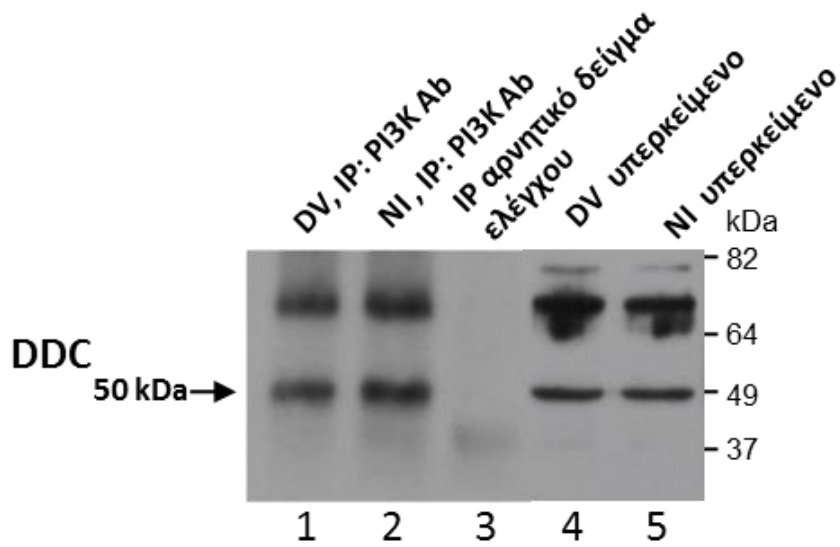
Στα σφαιρίδια με τη IgA δεσμεύσαμε ομοιοπολικά ειδικό αντίσωμα έναντι της PI3K, σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Παράλληλα, στρώσαμε κύτταρα Huh7 σε 2 φλάσκες F75 σε πληρότητα 30%. Στις 24 h μετά, μολύναμε τη μία εκ των δύο

με τον ιό του δάγκειου πυρετού ($moi=0,5$) (I) , αλλάξαμε το θρεπτικό υλικό και στις 2 φλάσκες 4 ώρες μετά τη μόλυνση (4hpi) και τα κύτταρα επώαστηκαν μέχρι τις 48 h. Στις 48 h pi λύθηκαν τα κύτταρα με 300 μ l RIPA buffer το οποίο είναι ήπιο λυτικό διάλυμα και στο οποίο προστέθηκε PIC 20x ώστε η τελική του συγκέντρωση στο λυτικό να είναι 1x. Για τη λύση των δειγμάτων, ανασηκώσαμε τα κύτταρα με θρυψίνη, τα φυγοκεντρήσαμε στα 800rpm και τα ξεπλύνουμε 2 φορές με PBS 1X. Τέλος τα λύσαμε με το RIPA buffer όπως προαναφέρθηκε και προσδιορίσαμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford. Για την ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος, στη προκειμένη περίπτωση, χρησιμοποιήσαμε αραιωμένα τα δείγματα σε H_2O 1:50 και σκέτο RIPA buffer αραιωμένο σε H_2O 1:50 ως τυφλό. Ο σκοπός μας ήταν να προσθέσουμε στα σφαιρίδια με το ομοιοπολικό προσδεδεμένο αντίσωμα ίση ποσότητα πρωτεΐνης από τα δύο δείγματα.

Αφού απομακρύνουμε τις μη ειδικά προσδεδεμένες πρωτεΐνες στα σφαιρίδια από τα δείγματα μας, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, δεσμεύσαμε τα σύμπλοκα της PI3K στα σφαιρίδια με το ειδικό αντίσωμα, τα επώασαμε και στη τελική φάση τα απομακρύνουμε από τα σφαιρίδια και πραγματοποιήσαμε ανοσοδοκιμασία western. Τα δείγματα που ηλεκτροφορήσαμε περιείχαν πλέον μόνο τη PI3K και τις πρωτεΐνες που είναι σε άμεση αλληλεπίδραση με αυτή. Χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της PI3K σε αραιώση 1:500 και έναντι της DDC (C-T) σε αραιώση 1:1000 ανιχνεύσαμε τη PI3K και τη DDC αντίστοιχα συμπεραίνοντας πως οι 2 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα.

Στη πρώτη εικόνα στα πηγάδια 1 και 2 ανιχνεύεται η PI3K. Στο πηγάδι 3 βλέπουμε την εικόνα από σφαιρίδια που έχουν προσδέσει αντίσωμα έναντι της PI3K χωρίς να έχουν επωαστεί με δείγμα τα οποία χρησιμοποιήσαμε ως αρνητικό δείγμα ελέγχου και στα πηγάδια 4 και 5 τα υπερκείμενα των δειγμάτων (I και NI αντίστοιχα), μετά τη πρόσδεση στα σφαιρίδια με τη προσδεδεμένη PI3K, τα οποία χρησιμοποιήσαμε ως θετικό δείγμα ελέγχου.

Στη δεύτερη εικόνα στα πηγάδια 1 και 2 διακρίνουμε τη DDC στα δείγματά μας, στο πηγάδι 3 το ίδιο αρνητικό δείγμα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκε νωρίτερα και στα πηγάδια 4 και 5 το ίδιο θετικό δείγμα ελέγχου. Επαναλάβαμε την ανοσοδοκιμασία western μόνο για τα δείγματα μας προκειμένου να επιβεβαιώσουμε την εικόνα. Συνοψίζοντας επιβεβαιώσαμε πως η DDC αλληλεπιδρά με τη PI3K.



Εικόνες 6-7. Καθορισμός του ρόλου του PI3K/AKT μονοπατιού στη μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC. Απεικονίζεται ο σχηματισμός συμπλόκου ανάμεσα στη PI3K και τη DDC. A) Συνοανοσοκατακρήμιση της DDC και της PI3K σε κύτταρα huh7. Ολόκληρα τα κυτταρικά ομογενοποιήματα προετοιμάστηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι της PI3K. Τα western blots πραγματοποιήθηκαν με αντίσωμα έναντι της DDC (άνω) και έναντι της PI3K (κάτω). B) πηγάδια 1,2: Co-IP δείγματα από κύτταρα μολυσμένα με τον DENV (DV) ή μη μολυσμένα (NI). Πηγάδι 3: Co-IP χωρίς κυτταρικό ομογενοποιήμα

ως αρνητικό δείγμα ελέγχου (NC). Πηγάδια 4,5: υπερκείμενα από μολυσμένα με τον DENV κύτταρα (DV) ή μη μολυσμένα κύτταρα (NI) πριν το IP. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη των πρωτεϊνών.

Δ.3.5 Παρακολούθηση της επίδρασης της μόλυνσης με DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της DDC παρουσία χημικής υποξίας με ανοσοδοκιμασία western.

Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών. Μία ημέρα μετά, μολύνθηκαν τα μισά πηγάδια σε κάθε πλάκα ώστε να υπάρχει αντιστοιχία σε μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Η μόλυνση έγινε με τον DENV (moi=0,1) σε θρεπτικό υλικό που περιείχε τα χημικά της υποξίας CoCl₂, DMOG και DFO σε συγκεντρώσεις CoCl₂ 75Μμ, DMOG 62,5Μμ και DFO 37,5Μμ. Τα ίδια χημικά, στις ίδιες συγκεντρώσεις, προστέθηκαν αντίστοιχα στα μη μολυσμένα πηγάδια. Κρατήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα ελέγχου (M) μολυσμένα και μη μολυσμένα κύτταρα στα οποία προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό απουσία χημικού. Στις 4hrπ αφαιρέθηκε ο ιός και έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα ενώ το πλήρες θρεπτικό υλικό που προστέθηκε περιείχε κατά δείγμα το αντίστοιχο χημικό στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τα χημικά για 24-48h και λύθηκαν στις 24 και 48hrπ. Ακολούθως, ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα με τη μέθοδο Bradford.

Ακολουθώντας αντίστοιχο πρωτόκολλο με αυτό που περιγράψαμε ανωτέρω, πραγματοποιήσαμε ανεξάρτητο πείραμα και μολύναμε ταυτόχρονα κύτταρα Huh7 με τον DENV σε moi=0,01 παρουσία του χημικού CoCl₂ στη διπλάσια συγκέντρωση, 150μM. Στις 24hrπ λύσαμε τα κύτταρα και υπολογίσαμε τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.

Στη συνέχεια, και στα δύο ανεξάρτητα πειράματα, ακολούθησε ανοσοσύστημα τύπου Western όπου οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν η DDC, η PI3K και η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene).

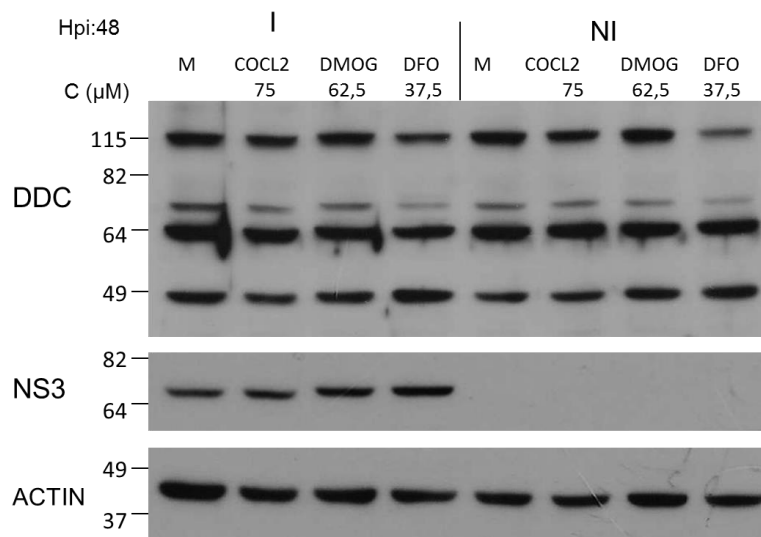
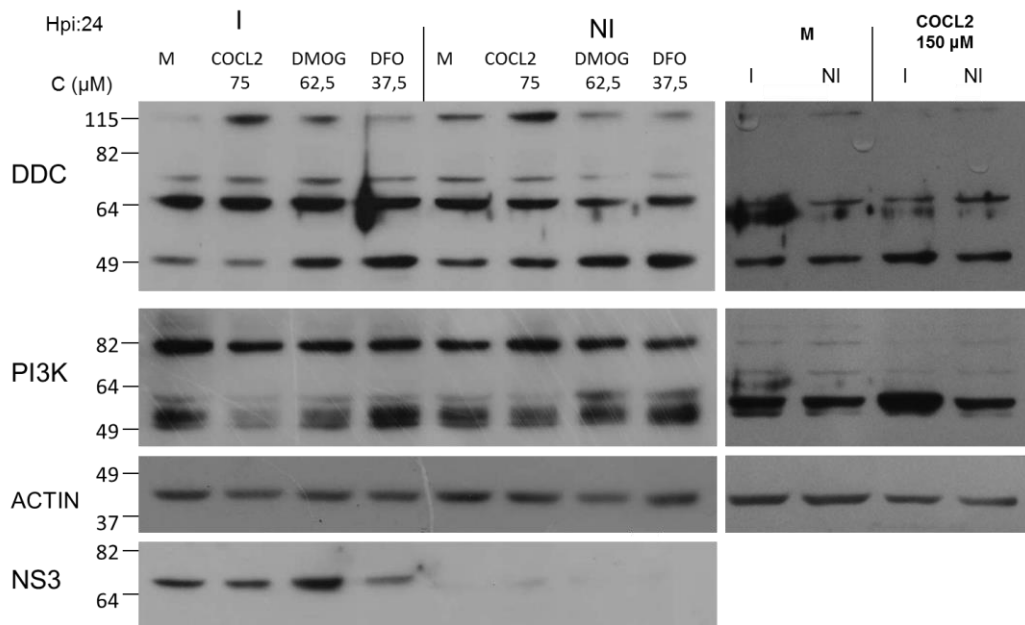
Στο πρώτο πείραμα, στις 24h μετά τη μόλυνση παρατηρούμε αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα της μονομερούς DDC παρουσία του ιού και μάλιστα αυτή η αύξηση είναι μεγαλύτερη και παρουσία των χημικών που επάγουν τον HIF σε σχέση με τα μη μολυσμένα δείγματα. Επίσης, η DDC φαίνεται να είναι αυξημένη παρουσία του DFO. Όσον αφορά στη PI3K φαίνεται αυξημένη παρουσία του ιού. Η ιική πρωτεΐνη NS3 ανιχνεύεται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα και παρατηρείται αυξημένη κυρίως παρουσία του χημικού DMOG.

Στις 48hrπ παρατηρούμε αύξηση στα επίπεδα την ανενεργής μονομερούς DDC παρουσία του ιού σε σχέση με τα αντίστοιχα μη μολυσμένα δείγματα, ενώ

όπως και πρωτύτερα η DDC φαίνεται αυξημένη παρουσία του DFO. Η ιϊκή πρωτεΐνη NS3, η οποία ανιχνεύεται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα, αυξάνεται παρουσία των χημικών και κυρίως παρουσία των DMOG και DFO, ενώ η κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη που αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα είναι σταθερή σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η ανίχνευση της DDC έγινε με το ειδικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού της άκρου, το C-T σε αραιώση 1:1000.

Στο δεύτερο πείραμα, όπου χρησιμοποιήθηκε η διπλάσια συγκέντρωση του χημικού CoCl_2 και μικρότερο ιϊκό φορτίο (moi 0,01) παρατηρούμε πως παρουσία του ιού και του χημικού αυξάνεται η ανενεργή DDC και η PI3K σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Όσον αφορά την κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδά της είναι ίδια σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η ανίχνευση της DDC έγινε με το ειδικό αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού της άκρου το C-T σε αραιώση 1:1000.

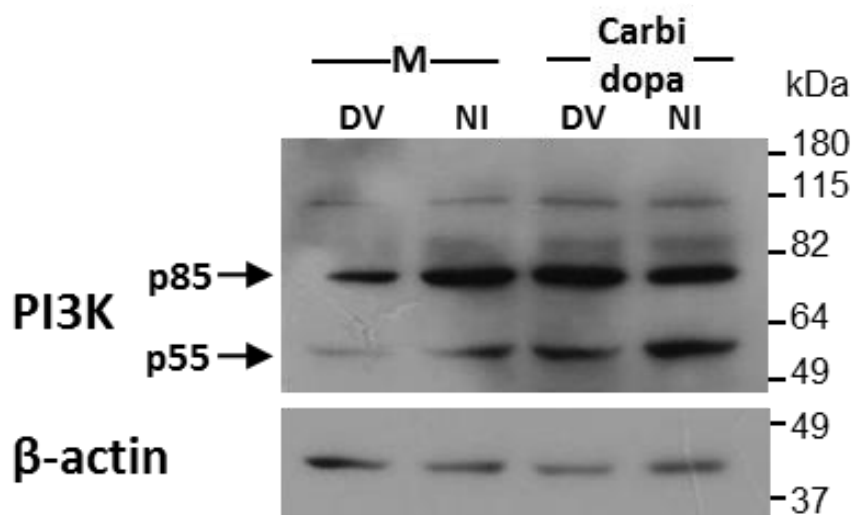
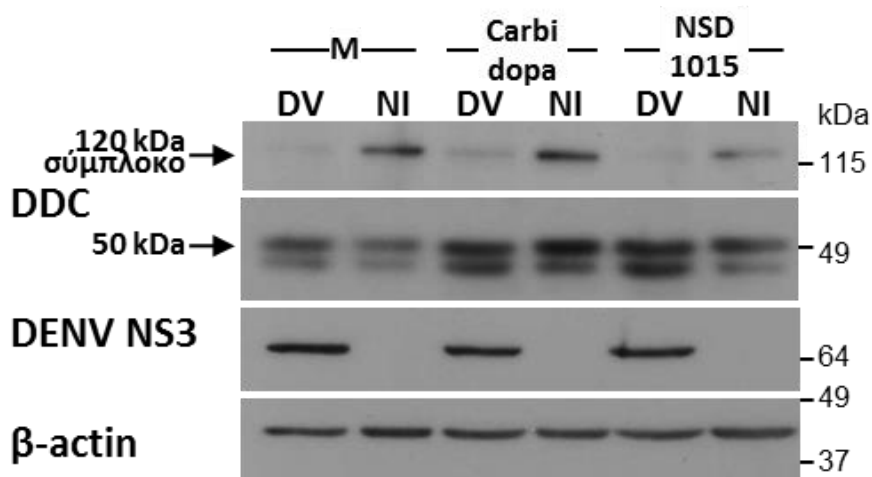


Εικόνες 8-9. Παρουσιάζεται η επίδραση της μόλυνσης με τον DENV και της ενεργοποίησης του HIF στα ενδοκυττάρια επίπεδα της DDC και της PI3K. Ανοσοστύπωμα τύπου western που έχουν χρησιμοποιηθεί anti-DDC, anti-PI3K ή anti-DENV NS3 αντισώματα σε κύτταρα Huh7 που έχουν προεπωαστεί στο 20%, έχουν επωαστεί για 4h με τον DENV (μοί 0,1) και έχουν δεχθεί τα χημικά της υποξίας CoCl₂, DMOG και DFO σε συγκεντρώσεις CoCl₂ 75Μμ, DMOG 62,5Μμ και DFO 37,5Μμ. Ως δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μολυσμένα (I) και μη (NI) που επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό απουσία χημικού (M). Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα αριστερά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.

Δ.3.6 Παρακολούθηση της επίδρασης της αναστολής της DDC στην επίδραση του DENV στα ενδοκυττάρια επίπεδα της μονομερούς DDC και της PI3K σε κύτταρα Huh7 με ανοσοδοκιμασία Western.

Κύτταρα Huh7 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με DENV (moi=0,5) τα μισά πηγάδια ώστε να υπάρχουν σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Στις 4hpi αφαιρέθηκε ο ιός και έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα και προσθήκη των αναστολέων της DDC σε συγκεντρώσεις carbidopa 2mM και NSD 250μM ενώ στα κύτταρα ελέγχου (M) προστέθηκε πλήρες θρεπτικό υλικό με το διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση 0,2%. Οι πλάκες επώστηκαν μέχρι τις 48h, τα κύτταρα λύθηκαν στις 48hpi και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε ανοσοδοκιμασία western όπου ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες DDC, PI3K NS3 και Actin. Παρατηρούμε συσσώρευση της ανενεργής μορφής της DDC παρουσία του ιού και ενίσχυση της συσσώρευσής της παρουσία των αναστολέων της, γεγονός το οποίο υποστηρίζει την αύξησή της μονομερούς μορφής της DDC στη μόλυνση. Η κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη που αποτελεί τον εσωτερικό μάρτυρα είναι ίδια σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η ανίχνευση της DDC έγινε με το ειδικό έναντι του καρβοξυτελικού της άκρου αντίσωμα C-T σε αραιώση 1:1000.

Όσον αφορά στη PI3K βλέπουμε συσσώρευση των υπομονάδων της p55 και p85 παρουσία του αναστολέα της DDC carbidopa, δηλαδή την αντίθετη εικόνα σε σχέση με τη DDC.

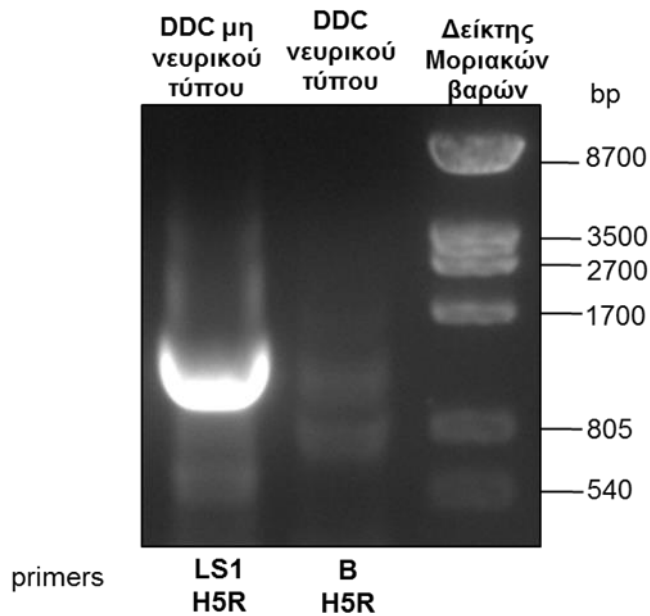


Εικόνες 10-11. Παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της αναστολής της DDC στην μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC (άνω) και στα επίπεδα της PI3K (κάτω). Άνω: Ανοσοστύπωμα τύπου western που έχουν χρησιμοποιηθεί anti-DDC και anti-DENV NS3 αντισώματα σε κύτταρα huh7 που είναι μολυσμένα με τον DENV (DVR2A, μοί 0,5) έχουν επωαστεί με τους αναστολείς της DDC καρβιντόπα (carbidopa 2mM) ή NSD1015 (250μM) για 48h. Κάτω: Ανοσοστύπωμα τύπου western που έχει χρησιμοποιηθεί anti-PI3K αντίσωμα σε κύτταρα huh7 μολυσμένα με τον DENV (DV-R2A, μοί 0,5) που έχουν επωαστεί με τον αναστολέα της DDC καρβιντόπα (2Mm) για 48h. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.

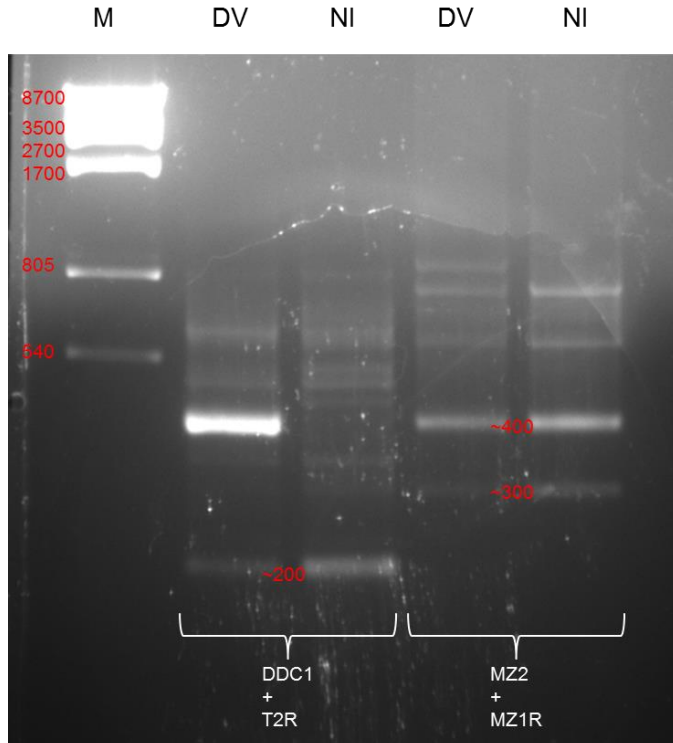
Δ3.7. Αντίστροφη μεταγραφή ακολουθούμενη από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για την ανίχνευση των ισομορφών της DDC σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα

Κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και επώαστηκαν μέχρι τις 48 h. Τα κύτταρα λύθηκαν στις 48 h, απομονώθηκε το ολικό RNA και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (RT) όπου χρησιμοποιήσαμε oligodT με annealing στους 54 °C. Το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε gel αγαρόζης 2%, χρησιμοποιώντας το ειδικό ζεύγος εκκινητών για το μη νευρικού τύπου μετάγραφο LS1-H5R και το ειδικό ζεύγος εκκινητών για το νευρικού τύπου μετάγραφο B-H5R. Στην εικόνα που ακολουθεί βλέπουμε τις ζώνες της DDC με το αντίστοιχο μοριακό βάρος ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών. Παρατηρούμε πως στα ηπατοκύτταρα ανιχνεύουμε και τη νευρικού τύπου ισομορφή της DDC και τη μη νευρικού τύπου.

Παράλληλα, κύτταρα Huh7 στρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών σε 30% πυκνότητα και μία ημέρα μετά μολύνθηκαν με τον DENV τα μισά πηγάδια ώστε να υπάρχουν σε αντιστοιχία μολυσμένα και μη μολυσμένα πηγάδια. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τον ιό για 4 h, στις 4 h πρ έγινε αλλαγή του θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 h. Στη συνέχεια, λύθηκαν στις 72 h πρ, απομονώθηκε το ολικό RNA και ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή (RT) όπου χρησιμοποιήθηκαν oligodT με annealing στους 54 °C. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2%, χρησιμοποιώντας στη πρώτη περίπτωση το ειδικό ζεύγος εκκινητών για τη DDC DDC1-T2R, και στη δεύτερη περίπτωση το ειδικό ζεύγος MZ2R-MZ1R. Στις εικόνες που ακολουθούν βλέπουμε τις ζώνες της DDC με το αντίστοιχο μοριακό βάρος ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών. Παρατηρούμε πως στα ηπατοκύτταρα ανιχνεύουμε το πλήρες μετάγραφο της DDC (DDC full length) που αντιστοιχεί στη ζώνη των 200 kb για το ζεύγος DDC1-T2R και στη ζώνη των 400 kb για το ζεύγος MZ2-MZ1R, και την εναλλακτική μορφή της, που της λείπει το εξώνιο 3 και αντιστοιχεί στη ζώνη των 300 kb για το ζεύγος MZ2-MZ1R



Εικόνα 12. Ισομορφές του m-RNA της DDC σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα Huh7. Ενίσχυση του mRNA της DDC σε κύτταρα Huh7 με RT-PCR: εξώνια 1-14 του μη νευρικού τύπου μετάγραφου της DDC και του νευρικού τύπου μετάγραφου χρησιμοποιώντας ως πρόσθιους εκκινητές τους LS1 και B αντίστοιχα και τον αντίστροφο H5R.



Εικόνα 13. Ισομορφές του m-RNA της DDC σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα Huh7 μολυσμένα με τον DENV. Ενίσχυση του mRNA της DDC σε κύτταρα Huh7 με RT-PCR: εξώνια 2-3 χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή DDC1

και τον αντίστροφο T2R και τα εξώνια 2-4 χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή MZ2 και τον αντίστροφο MZ1R.

Δ4. Επιβεβαίωση του συντηρημένου ρόλου της DDC στο κύκλο ζωής των φλαβοϊών, δείχνοντας τη συσχέτιση ανάμεσα στη DDC και στην αντιγραφή του HCV στη κυτταροκαλλιέργεια και σε ηπατικό ιστό.

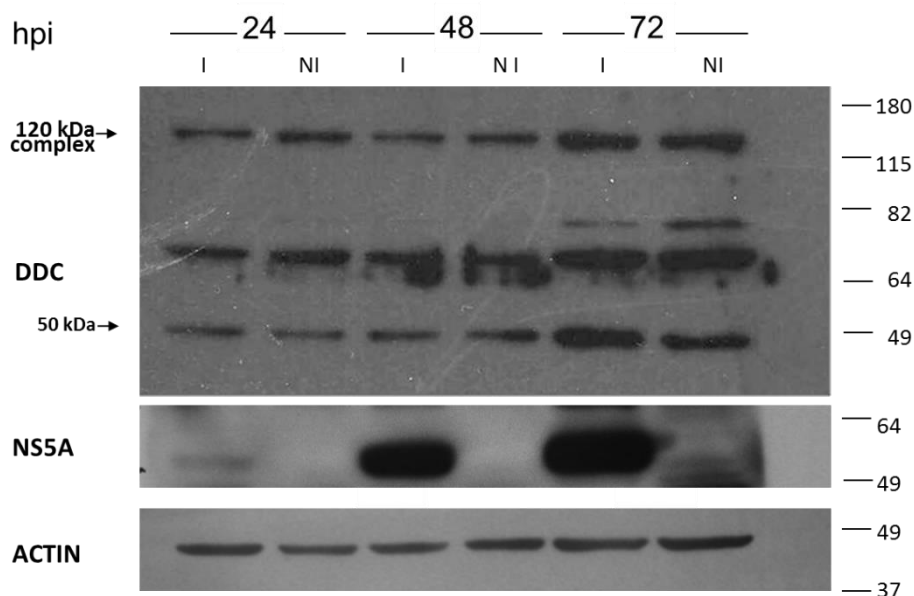
Ελέγξαμε το πως επηρεάζει η μόλυνση με τον HCV την αναλογία στα ενδοκυττάρια επίπεδα της DDC. Χρησιμοποιήσαμε ανοσοδοκιμασία western για να ανιχνεύσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της σε κύτταρα Huh7.5 ύστερα από επώαση σε κλασσικές συθήκες κυτταροκαλλιέργειας (20% O₂) και RT-QPCR για να ποσοτικοποιήσουμε το RNA της σε βιοψίες ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο.

Δ4.1 Έλεγχος της επίδρασης της μόλυνσης με τον HCV στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων των ισομορφών ενεργή/ανενεργή της DDC σε ηπατοκύτταρα Huh7.5 με ανοσοδοκιμασία Western.

Κύτταρα Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 6 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και 24 ώρες μετά μόλυνθηκαν τα μισά πηγάδια με HCV γονοτύπου 2A στελέχους JFH1 με προσαρμοστικές μεταλλαγές, ώστε να έχουμε σε αντιστοιχία μολυσμένα (I) και μη μολυσμένα πηγάδια (NI). Στις 4hpi προσθέσαμε θρεπτικό υλικό στα μολυσμένα πηγάδια και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24-72 h. Λύθηκαν στις 24, 48 και 72h μετά τη μόλυνση. Τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία western. Ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες DDC και NS5A ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene). Στην πρώτη εικόνα που ακολουθεί, παρατηρούμε αύξηση στην ανενεργή μονομερή μορφή της DDC παρουσία του ιού σε όλες τις χρονικές στιγμές και κυρίως στη μετέπειτα των 72 h pi. Αντίθετα, φαίνεται μείωση στο ανθεκτικό σε SDS σύμπλοκο των 120kDa που πιθανόν να αντιστοιχεί στην ενεργή μορφή της, παρουσία του ιού σε όλες τις χρονικές στιγμές. Η ιϊκή πρωτεΐνη NS5A αυξάνεται όσο περνούν οι ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-ακτίνης είναι σταθερά σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η DDC ανιχνεύθηκε με το ειδικό αντίσωμα C-T αραιωμένο 1:1000.

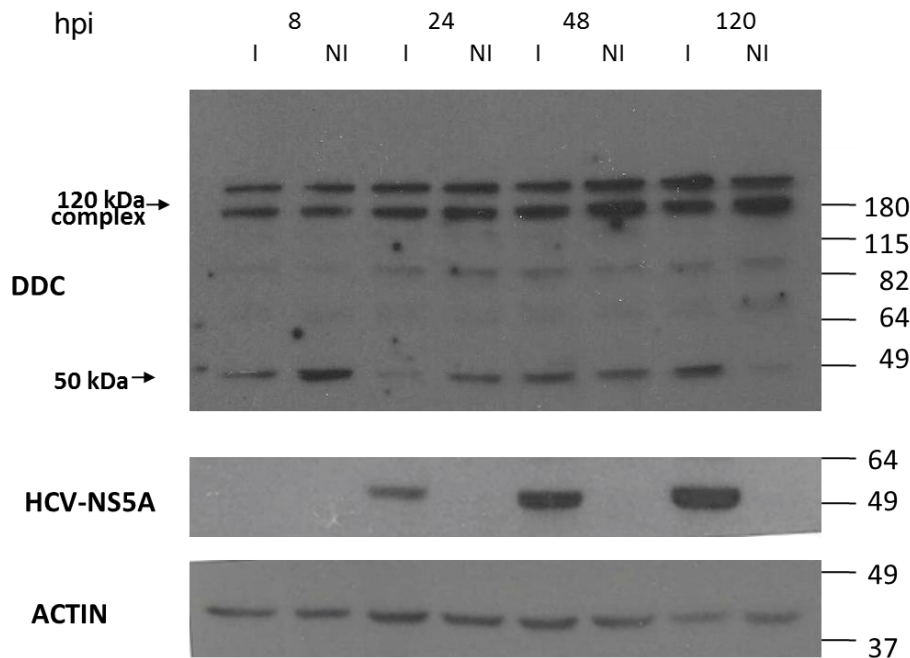
Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα μέχρι τις 120hpi με τον χιμαιρικό Jc1 (j6-jfh1) αυτή τη φορά, που είναι πιο αποδοτικός ιός. Κύτταρα

Huh7.5 επιστρώθηκαν σε πλάκα 12 πηγαδιών με πυκνότητα 30% και 24 ώρες μετά μολύνθηκαν τα μισά πηγάδια της πλάκας με τον πιο αποδοτικό ιό ώστε να έχουμε σε αντιστοιχία μολυσμένα (I) και μη μολυσμένα (NI) πηγάδια. Στις 4 h pi προσθέσαμε θρεπτικό υλικό στα μολυσμένα πηγάδια και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8-120 h. Τα κύτταρα λύθηκαν στις 8, 24, 48 και 120 h μετά τη μόλυνση (h pi). Τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία western. Ανιχνεύθηκαν η πρωτεΐνη DDC, με το αντίσωμα έναντι ολόκληρης της πρωτεΐνης αραιωμένο 1/200, και η ιϊκή πρωτεΐνη NS5A ενώ ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική πρωτεΐνη ακτίνη, τα επίπεδα της οποίας παραμένουν σταθερά στα κύτταρα (housekeeping gene). Στην δεύτερη εικόνα που ακολουθεί παρατηρούμε πως η ιϊκή πρωτεΐνη NS5A, αυξάνεται όσο περνούν οι ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης, φαίνεται αύξηση στην ανενεργή μονομερή μορφή της DDC παρουσία του ιού κυρίως στη μετέπειτα χρονική στιγμή των 120 h pi. Αντίθετα, φαίνεται να υπάρχει μείωση στο ανθεκτικό σε SDS σύμπλοκο των 120kDa που πιθανόν να αντιστοιχεί στην ενεργή μορφή της, παρουσία του ιού επίσης στις 120hpi. Όσον αφορά την κυτταρική πρωτεΐνη β-ακτίνη, τα επίπεδά της είναι ίδια σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η DDC ανιχνεύθηκε με το ειδικό αντίσωμα έναντι ολόκληρου του μήκους της αραιωμένο 1:200.



Εικόνα 14. Παρουσιάζεται η επίδραση της μόλυνσης με HCV στα επίπεδα της DDC: Ανοσοσύτρωμα τύπου western που έχουν χρησιμοποιηθεί αντισώματα anti-HCV NS5A και anti-DDC σε κύτταρα huh7.5 που είναι μολυσμένα με τον HCV γονοτύπου 2A στελέχους JFH1 με προσαρμοστικές μεταλλάξεις και έχουν επωαστεί για 24-72 h. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως

εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.



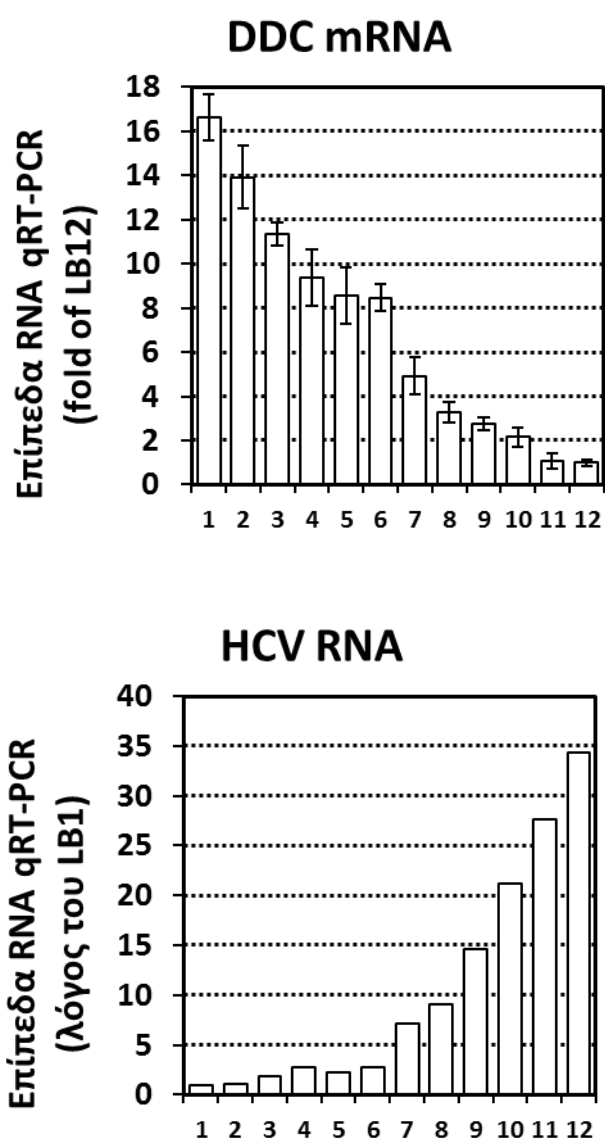
Εικόνα 15. Παρουσιάζεται η επίδραση της μόλυνσης με HCV στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων ενεργή/ανενεργή της DDC: Ανοσοστύπωμα τύπου western που έχουν χρησιμοποιηθεί αντισώματα anti-HCV NS5A και anti-DDC (anti-full length DDC) σε κύτταρα Huh7.5 που είναι μολυσμένα με τον χμιαρικό Jc1 (j6-jfh1) HCV και έχουν επωαστεί για 8-120 h. Η β ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας. Οι αριθμοί στα δεξιά αναφέρονται στα μοριακά βάρη του δείκτη πρωτεϊνών.

Δ4.2 Συσχέτιση των επιπέδων του m-RNA της DDC με τα επίπεδα RNA του HCV σε δείγματα από βιοψίες ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο

Η μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση cDNA, από ολικό κυτταρικό RNA που απομονώθηκε από ηπατοκύτταρα 13 ασθενών οι οποίοι είναι μολυσμένοι με τον HCV (HCV-βιοψίες), προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση ανάμεσα στο m-RNA της DDC και στο ιϊκό RNA. Αυτά τα δείγματα ηπατικού ιστού έχουν χαρακτηριστεί στο παρελθόν (Vassilaki et al, J.Vir, 2013). Πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για το γονίδιο της DDC και

για το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ. Επίσης πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για το RNA του ιού HCV και το σταθερά εκφραζόμενο κυτταρικό γονίδιο YWHAZ.

Τα αποτελέσματα της qPCR κατέδειξαν μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στο m-RNA της DDC και στο RNA του HCV αφού φαίνεται να μειώνεται το m-RNA της DDC όσο αυξάνεται το RNA του ιού και αντιστρόφως. Το αποτέλεσμά μας αυτό είναι μία ένδειξη για την ύπαρξη αλληλεπίδρασης ανάμεσα στον HCV και τη DDC.



Διαγράμματα 25-26 RT-qPCR ανάλυση του m-RNA της DDC από το ολικό RNA που απομονώθηκε από 12 δείγματα ηπατικού ιστού από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα, που έχουν χαρακτηριστεί παλαιότερα (Vassilaki et al.

J.Virol. 2013, 87:2935-2948). Τα επίπεδα m-RNA του YWHAZ χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση.

Μέρος Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος της ενδοκυτταρικής τάσης οξυγόνου στο κύκλο ζωής των Φλαβοϊών δεν είχε μελετηθεί προηγουμένως. Σε αυτή την εργασία δείξαμε πως η ηπατική νορμοξία (3% v/v O₂), όταν εφαρμόζεται σε ηπατοκύτταρα, αθανατοποιημένα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα και Vero, ευνοεί την αντιγραφή του RNA του DENV έως και 9 φορές σε σύγκριση με τις συμβατικές συνθήκες καλλιέργειας του ατμοσφαιρικού οξυγόνου (20% O₂). Βρέθηκε επίσης πως αυτή η ενίσχυση λόγω της εφαρμογής χαμηλής τάσης οξυγόνου, συμβαίνει σε ένα πρώιμο στάδιο της μόλυνσης, εξαρτάται από την ενεργοποίηση του HIF και του μονοπατιού κυτταρικής επιβίωσης/κυτταρικού πολλαπλασιασμού PI3K/AKT και σχετίζεται άμεσα με μία αύξηση στην αναερόβια γλυκόλυση. Ταυτόχρονα παρατηρήσαμε πως ο πολλαπλασιασμός του DENV ρυθμίζει προς τα άνω την ενεργοποίηση του HIF και την ενεργοποίηση δεικτών της αναερόβιας γλυκόλυσης (πχ HK2, GLUT1) σε πρώιμους χρόνους, μετά τη μόλυνση (24 h). Συνολικά αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν πως ο DENV επάγει μία κυτταρική υποξική απόκριση και έναν επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού ώστε να υποστηρίξει την αποδοτική αντιγραφή του. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα και με βάση τα δεδομένα που έχουν αναφερθεί προηγουμένως για τον HCV [432], η εξαρτώμενη από το οξυγόνο ενίσχυση στην ιϊκή αντιγραφή φαίνεται να είναι διατηρημένη στους φλαβοϊούς. Ωστόσο, η κινητική της ενεργοποίησης του HIF και η συμβολή του στην ιϊκή αντιγραφή κατά την οξεία λυτική λοίμωξη του DENV είναι διαφορετική σε σχέση με τη λοίμωξη με τον HCV. Ο HCV ενεργοποιεί τον HIF μόνο στα μετέπειτα στάδια του ιϊκού κύκλου ζωής (72hpi) και επομένως ο HIF δεν εμπλέκεται στην ενίσχυση του HCV που πραγματοποιείται λόγω της χαμηλής τάσης οξυγόνου [432].

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως στη δεδομένη μελέτη παρατηρήσαμε για πρώτη φορά πως ένας κυτταρικός παράγοντας που ρυθμίζεται από τη χαμηλή τάση οξυγόνου, η L-Dopa Decarboxylase (DDC) σχηματίζει σύμπλοκα με τη PI3K σε ηπατοκύτταρα και η ειδική εκλεκτική ενζυμική αναστολή της DDC ρυθμίζει προς τα άνω τις ρυθμιστικές ισομορφές p85 και p55 της PI3K. Επιπλέον η μόλυνση με τον DENV αυξάνει την αναλογία των ενδοκυτταρικών επιπέδων του ανενεργού μονομερούς των 50kDa της DDC έναντι του ανθεκτικού σε SDS συμπλέγματος, των 120kDa που πιθανά αντιστοιχεί στην ενεργή διμερή μορφή της, με διαφορετική κινητική στη νορμοξία (3% v/v O₂) απ' ότι στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο και με τρόπο εξαρτώμενο από το μονοπάτι PI3K/AKT. Η μόλυνση με τον DENV επίσης μειώνει τα επίπεδα του mRNA της

DDC. Έτσι, μελετώντας την αλληλεπίδραση του DENV με τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού οξυγόνου, ταυτοποιήσαμε ένα νέο καθοριστικό παράγοντα της ιϊκής αντιγραφής και της ιϊκής παθογονικότητας. Αυτός ο καινούργιος καθοριστικός παράγοντας φαίνεται να έχει ένα διατηρημένο ρόλο στο κύκλο ζωής των φλαβοϊών, αφού σχετίστηκε και με την αντιγραφή του HCV.

Σε συμφωνία με τα δεδομένα από τη κυτταροκαλλιέργεια, παρατηρήσαμε μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του mRNA της DDC και στο γενωμικό RNA του HCV σε βιοψίες ήπατος από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα (κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα). Η συσχέτιση του DENV και του HCV με τη DDC δεν είχε διερευνηθεί πρωτότερα, αν και η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο μονοπάτι PI3K/AKT και τον ιϊκό πολλαπλασιασμό είναι γνωστό πως συνεισφέρει στην εγκαθίδρυση της οξείας/αποπτωτικής λοίμωξης με τον DENV και της χρόνιας/επίμονης λοίμωξης με τον HCV [177, 455, 459]. Τα αποτελέσματα από αυτή την εργασία προτείνουν μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στις δράσεις των DDC και PI3K και του ιϊκού πολλαπλασιασμού που είναι σε συμφωνία με τις ήδη γνωστές λειτουργίες της DDC στον ενεργειακό (γλυκολυτικό) μεταβολισμό [467] και στη κυτταρική επιβίωση/αναπαραγωγή [468].

Τέλος, σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα Huh7 ανιχνεύσαμε και τις δύο ισομορφές του μεταγράφου της DDC, εκείνης που αντιστοιχεί στο νευρικού τύπου μετάγραφο και εκείνης που αντιστοιχεί στη μη νευρικού τύπου όπως και την εναλλακτική μορφή του ενζύμου.

Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι ένα κυτταρικό εξαρτώμενο από 5-φωσφορική πυριδοξάλη ένζυμο που ασκεί τη βιοσυνθετική λειτουργία του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, με κεντρικό ρόλο στη κατάλυση της αποκαρβοξυλίωσης της λ-3,4 διϋδροξυφαινυλαανίνης (L-Dopa) σε ντοπαμίνη, και έχει ευρεία κατανομή σε μία σειρά από περιφερικά όργανα όπως το ήπαρ, στο οποίο ο βιολογικός της ρόλος δεν έχει καθοριστεί ακόμα [469, 470]. Η DDC έχει αρνητικό ρόλο στον ενεργειακό (γλυκολυτικό) μεταβολισμό [467] και αν και έχει προταθεί πως ίσως εμπλέκεται στην ενζυματική μετατροπή άλλων αρωματικών αμινοξέων σε εξωνευρικούς ιστούς [469], όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν πως η περιφερική ντοπαμίνη εμπλέκεται στη κυτταρική επιβίωση και το κυτταρικό πολλαπλασιασμό [468]. Αν και είχε αναφερθεί πως ο πολλαπλασιασμός του DENV εμποδίζεται από μία ομάδα μικρομοριακών ανταγωνιστών του υποδοχέα d4 της ντοπαμίνης [345], το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa, η παρούσα εργασία ήταν η πρώτη που διερεύνησε και έδειξε τη συσχέτιση του DENV με τη DDC.

Δείξαμε την ύπαρξη θετικής σχέσης ανάμεσα στην ηπατική νορμοξία και στον πολλαπλασιασμό του DENV. Παράλληλα αποδείξαμε πως η χαμηλή τάση οξυγόνου προκαλεί αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP και στους δείκτες υποξίας και γλυκόλυσης με αποτέλεσμα να υποστηρίζεται ένας βιοενεργητικός

επαναπρογραμματισμός στο κύτταρο που εξυπηρετεί την ενίσχυση της αναπαραγωγής του ιού. Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ηπατοκύτταρα και αθανатоποιημένα κύτταρα. Αρχικά καθορίσαμε την επίδραση της ενδοκυτταρικής τάσης οξυγόνου στα ενδοκυττάρια επίπεδα του DENV σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Για να γίνει αυτό, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν στο 20% v/v O₂ και στο 3% v/v O₂, εμβολιάστηκαν με τον DV-R2A που εκφράζει γονίδιο λουσιφεράσης, και επώαστηκαν μέχρι για 48-72h στις δύο συνθήκες. Δείξαμε πως η ιϊκή αντιγραφή, όπως μετρήθηκε με την ενεργότητα λουσιφεράσης, ενισχύεται υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου σε σχέση με το ατμοσφαιρικό σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν μέχρι και 9 φορές. Στα κύτταρα Huh7 επιβεβαιώσαμε αυτήν την ενίσχυση στο επίπεδο του ιϊκού RNA με RT-QPCR και στο επίπεδο της ιϊκής πρωτεΐνης με western blotting. Παράλληλα με RT-qPCR διαπιστώσαμε πως η χαμηλή τάση οξυγόνου ενίσχυσε τα ενδοκυττάρια επίπεδα ATP σε μολυσμένα και μη κύτταρα όπως και τους δείκτες υποξίας (VEGF) και αυτούς της αναερόβιας γλυκόλυσης (HK2, GLUT1), υποστηρίζοντας έτσι ένα βιοενεργητικό επαναπρογραμματισμό σε συμφωνία με τα προηγούμενα δεδομένα στη μόλυνση με HCV, στην υποξία. Μία παρόμοια αύξηση στα ενδοκυττάρια επίπεδα ενέργειας παρατηρήθηκε και στα Vero και στα IHH κύτταρα.

Στη συνέχεια εξακριβώσαμε πως το στάδιο του ιϊκού κύκλου ζωής που ενισχύεται από το χαμηλό οξυγόνο είναι εκείνο του πολλαπλασιασμού του ιού και όχι της μετάφρασης, χωρίς να αποκλείεται και μία ενίσχυση κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Κύτταρα Huh7 που είχαν προεπωαστεί στο 20% ή στο 3% O₂ υποβλήθηκαν σε ηλεκτροδιάτρηση με το υπογενωμικό ρεπλικόνιο του DENV (sg-DV) και στη συνέχεια με το προσδιορισμό της ενεργότητας λουσιφεράσης στις 24 ή 48 h επιβεβαιώθηκε πως η επίδραση του οξυγόνου συμβαίνει σε ένα στάδιο, μετά από την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Για να διακρίνουμε την επίδραση ανάμεσα στην ιϊκή αντιγραφή και την ιϊκή μετάφραση, χρησιμοποιήσαμε παράλληλα και την ελαττωματική στην αντιγραφή ιϊκή αλληλουχία (GND).

Ακολούθως, επιβεβαιώσαμε πως η σχέση ανάμεσα στον ιό και στη χαμηλή τάση οξυγόνου είναι αμφίδρομη και πως ο DENV επάγει μία κυτταρική υποξική απάντηση και έναν επαναπρογραμματισμό του ενεργειακού μεταβολισμού ώστε να υποστηρίξει την αποδοτική αναπαραγωγή του. Επιλέξαμε να χαρακτηρίσουμε την επίδραση της μόλυνσης με τον DENV στην ενεργοποίηση του HIF και είδαμε μία αύξηση στα επίπεδα του HIF-1α, η οποία ήταν ανιχνεύσιμη σε ανάλυση western blot μόνο ύστερα από χημική επαγωγή του HIF (COCL₂, DMOG). Επίσης με RT-qPCR είδαμε πως νωρίς μετά τη ιϊκή μόλυνση (24h) με τον DENV, ήταν επίσης επαγμένοι και οι δείκτες της υποξίας (VEGF) και της αναερόβιας γλυκόλυσης (HK2, GLUT1). Στη περίπτωση του GLUT1 η επαγωγή που πραγματοποιείται στη μόλυνση με τον DENV είναι

σημαντική μόνο υπό χαμηλό οξυγόνο, το οποίο είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα του GLUT-1.

Παράλληλα, υπερεκφράσαμε τον HIF και είδαμε την αντιγραφή του RNA του ιού να αυξάνεται κατά 2.5 φορές. Για την υπερέκφραση του HIF συνεπιμολύναμε σε συνθήκες 20% O₂ κύτταρα Huh7 με φορείς που εκφράζουν τις αλληλουχίες των ισομορφών του HIF, HIF1α και HIF2α και με το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του DENV (sg-DV) και αντίστοιχα με κενούς φορείς και με το υπογονιδιωματικό ρεπλικόνιο του DENV (sg-DV). Τα πειράματα ελέγχου επιβεβαίωσαν τη προς τα άνω ρύθμιση της HRE-luc κατά την υπερεκφραση του HIF.

Στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε ο κυριος ρόλος του μονοπατιού επιβίωσης και πολλαπλασιασμού PI3K/AKT, το οποίο είναι ένας κύριος μεσολαβητής του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού, στην εξαρτώμενη από το οξυγόνο αύξηση του DENV. Κύτταρα μολυσμένα με τον DENV υποβλήθηκαν σε αγωγή με τον αναστολέα AKT VIII με αποτέλεσμα να καταργείται η αύξηση στον πολλαπλασιασμό του ιού στο 3% O₂ και την ίδια στιγμή να μειώνεται σημαντικά η αντίστοιχη αναλογία στις δύο συνθήκες οξυγόνου, ως προς τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ATP.

Επαληθεύσαμε το ρόλο του άξονα γλυκόλυση/PI3K-AKT/HIF στη παρατηρούμενη ενίσχυση στο πολλαπλασιασμό του DENV παρουσία υποξίας. Η γλυκόλυση ρυθμίζεται και από το μονοπάτι του HIF και από εκείνο του PI3K/AKT. Αλλάξαμε ενεργειακά θρεπτικά υποστρώματα κυτταροκαλλιέργειας από υψηλή γλυκόζη σε χαμηλή ή γαλακτόζη, αναγκάζοντας τα κύτταρα να αλλάξουν το μεταβολισμό τους από αναερόβια γλυκόλυση σε οξειδωτική φωσφορυλίωση, με αποτέλεσμα να δούμε μείωση στην αναλογία της αύξησης του πολλαπλασιασμού του DENV ανάμεσα στο 20% O₂ και στο 3% O₂. Το γεγονός αυτό συσχετίζει άμεσα τη μεσολαβούμενη από χαμηλό οξυγόνο ενίσχυση του ιϊκού πολλαπλασιασμού με την αναερόβια γλυκόλυση. Σε συμφωνία, με την αλλαγή των θρεπτικών υποστρωμάτων μειώθηκαν και τα αντίστοιχα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ATP.

Χαρακτηρίσαμε την αρνητική σχέση ανάμεσα στη μόλυνση με τον DENV και την DDC σε επίπεδο πρωτεΐνης και RNA, και μάλιστα καταδείξαμε πως υπάρχει διαφορετική κινητική στις δύο συνθήκες οξυγόνου. Η DDC αποτελεί ένα κυτταρικό ένζυμο εξαρτώμενο από 5 φωσφορική πυριδοξάλη που ασκεί λειτουργία βιοσύνθεσης νευροδιαβιβαστή και έχει ευρεία κατανομή σε μία σειρά από περιφερικά όργανα, στα οποία περιέχεται και το ήπαρ και στο οποίο ο βιολογικός της ρόλος δεν έχει καθοριστεί ακόμα. Η DDC ρυθμίζεται από το χαμηλό οξυγόνο, έχει έναν αρνητικό ρόλο στον ενεργειακό γλυκολυτικό μεταβολισμό και μία δράση στην κυτταρική επιβίωση/κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η συσχέτιση ανάμεσα στον DENV και τη DDC δεν είχε διερευνηθεί πρωτίτερα αν και είχε αναφερθεί πως η ιϊκή αναπαραγωγή

εμποδίζεται από μία τάξη μικρομοριακών ενώσεων που ανταγωνίζονται τον υποδοχέα d4 της ντοπαμίνης, που είναι το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa. Για να χαρακτηρίσουμε τη σχέση τους, κύτταρα Huh7 προεπεώστηκαν στο 20% O₂ ή 3% O₂, μολύνθηκαν με τον DENV (DV-R2A) και καλλιεργήθηκαν για 24-48h στις 2 συνθήκες. Με ανάλυση western blot είδαμε πως η μόλυνση με τον DENV αυξάνει την αναλογία των ενδοκυτταρικών επιπέδων της ανενεργής μονομερούς DDC των 50kDa έναντι ενός συμπλόκου 120kDa ανθεκτικού σε SDS που πιθανά να αντιστοιχεί στην ενεργή διμερή μορφή της DDC με διαφορετική κινητική στην υποξία από ότι στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Πιο συγκεκριμένα, αν και η μείωση στα επίπεδα του συμπλόκου των 120 kDa είναι εμφανής ήδη από τις 24 h pi και στις δύο συνθήκες οξυγόνου, υπάρχει μία καθυστέρηση στην αύξηση των επιπέδων του μονομερούς των 50kDa στο 20% O₂ σε σχέση με το 3%. Σε συμφωνία με την προς τα άνω ρύθμιση της ανενεργούς μορφής της DDC, η μόλυνση με τον DENV μειώνει και τα επίπεδα του mRNA της DDC μέχρι και 2 φορές.

Παράλληλα, δείξαμε πως το μονοπάτι PI3K/AKT εμπλέκεται στη μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC, αφού με την αναστολή του AKT καταργείται η μεσολαβούμενη από τον DENV επίδραση στην αναλογία των ενδοκυττάρων επιπέδων ενεργής/ανενεργής DDC. Επιλέξαμε και διερευνήσαμε το ρόλο του PI3K-AKT μονοπατιού στη μεσολαβούμενη από τον DENV ρύθμιση της DDC στο 20% και στο 3% O₂, επειδή η κινητική της επίδρασης του DENV στη DDC διαφέρει στην υποξία σε σχέση με ατμοσφαιρικό οξυγόνο και επειδή το AKT εμπλέκεται στην ενίσχυση της ιϊκής αντιγραφής από την υποξία.

Με βάση προηγούμενες πρώιμες μελέτες της Καθ. κ. Δ. Βασιλακοπούλου σε κύτταρα νευροβλαστώματος που δείχνουν αλληλεπίδραση της DDC με την PI3K, σκεφτήκαμε και μελετήσαμε τη σχέση του μονοπατιού PI3K-AKT στη ρύθμιση της DDC από τον ιό και δείξαμε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στις πρωτεΐνες PI3K και DDC στη μόλυνση με τον DENV. Πραγματοποιήσαμε σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό και σε μη, πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-IP) χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της PI3K και στη συνέχεια ανάλυση της DDC με western blot. Η DDC ανιχνεύθηκε μετά την ανοσοκατακρήμνιση, παρουσιάζοντας σχηματισμό συμπλόκου με τη PI3K. Επιπροσθέτως, η επώαση με τον αναστολέα της DDC καρβιντόπα, η οποία ως ήταν αναμενόμενο αύξησε τα επίπεδα του μονομερούς της DDC των 50kDa, οδήγησε σε προς τα άνω ρύθμιση των ρυθμιστικών ισομορφών της PI3K, p85 και p55 κάτι που καταδεικνύει αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη DDC και τη PI3K. Αυτά τα δεδομένα αποκαλύπτουν το σημαντικό ρόλο του PI3K/AKT μονοπατιού στην εξαρτώμενη από το DENV ρύθμιση της DDC και είναι σε συμφωνία με τον προηγουμένως αναφερθέντα αρνητικό ρόλο της DDC στον ενεργειακό γλυκολυτικό μεταβολισμό [467] .

Δείξαμε πως και ο HCV επηρεάζει την αναλογία ενεργή/ανενεργή των ισομορφών της DDC σε παρόμοιο τρόπο με τον DENV και καταδείξαμε το συντηρημένο ρόλο της DDC στο κύκλο ζωής των Φλαβοϊών. Για το σκοπό μας αυτό κύτταρα Huh7.5 μολύνθηκαν με στελέχη HCV, καλλιεργήθηκαν μέχρι τις 120 h pi και λύθηκαν για ανάλυση western blot. Από την άλλη πλευρά με ποσοτικοποίηση των επιπέδων του mRNA της DDC παρατηρήσαμε σε κύτταρα μολυσμένα με τον HCV στις 24-120 h μετά τη μόλυνση, πως σε σχέση με τα μη μολυσμένα, η μόλυνση με τον HCV μειώνει ελαφρώς το mRNA της DDC μόνο σε ένα μετέπειτα στάδιο της μόλυνσης.

Σε συμφωνία με τα δεδομένα από τη κυτταροκαλλιέργεια, στη παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε μία σημαντική αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα του mRNA της DDC και το γενωμικό RNA του HCV σε βιοψίες ήπατος από ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα (κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), που έχουν ήδη χαρακτηριστεί. Αν και η αλληλεπίδραση ανάμεσα στο PI3K/AKT και τον ιικό πολλαπλασιασμό είναι γνωστό να συνεισφέρει στην εγκαθίδρυση της οξείας/αποπρωτικής λοίμωξης από τον DENV και της χρόνιας/επίμονης λοίμωξης από τον HCV, αυτή είναι η πρώτη φορά που έχει δειχθεί συσχέτιση ανάμεσα στους ιούς DENV και HCV με τη DDC.

ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Scheel, T.K., P. Simmonds, and A. Kapoor, *Surveying the global virome: identification and characterization of HCV-related animal hepaciviruses*. *Antiviral Res*, 2015. **115**: p. 83-93.
2. Knodell, R.G., et al., *Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis*. *Gastroenterology*, 1975. **69**(6): p. 1278-85.
3. Prince, A.M., et al., *Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus*. *Lancet*, 1974. **2**(7875): p. 241-6.
4. Alter, H.J., et al., *Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis*. *Lancet*, 1975. **2**(7940): p. 838-41.
5. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science*, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
6. Kuo, G., et al., *An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis*. *Science*, 1989. **244**(4902): p. 362-4.
7. Maheshwari, A., S. Ray, and P.J. Thuluvath, *Acute hepatitis C*. *Lancet*, 2008. **372**(9635): p. 321-32.
8. Conry-Cantilena, C., et al., *Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(26): p. 1691-6.
9. Hoofnagle, J.H., *Course and outcome of hepatitis C*. *Hepatology*, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S21-9.
10. Poynard, T., et al., *Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c*. *J Hepatol*, 2001. **34**(5): p. 730-9.

11. Zignego, A.L., et al., *Extrahepatic manifestations of Hepatitis C Virus infection: a general overview and guidelines for a clinical approach*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(1): p. 2-17.
12. Louie, K.S., et al., *Prevalence of thrombocytopenia among patients with chronic hepatitis C: a systematic review*. J Viral Hepat, 2011. **18**(1): p. 1-7.
13. Alter, M.J., *HCV routes of transmission: what goes around comes around*. Semin Liver Dis, 2011. **31**(4): p. 340-6.
14. Tohme, R.A. and S.D. Holmberg, *Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission?* Hepatology, 2010. **52**(4): p. 1497-505.
15. Ponde, R.A., *Hidden hazards of HCV transmission*. Med Microbiol Immunol, 2011. **200**(1): p. 7-11.
16. Lam, N.C., P.B. Gotsch, and R.C. Langan, *Caring for pregnant women and newborns with hepatitis B or C*. Am Fam Physician, 2010. **82**(10): p. 1225-9.
17. Mast, E.E., *Mother-to-infant hepatitis C virus transmission and breastfeeding*. Adv Exp Med Biol, 2004. **554**: p. 211-6.
18. Thomas, D.L., et al., *Perinatal transmission of hepatitis C virus from human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. Women and Infants Transmission Study*. J Infect Dis, 1998. **177**(6): p. 1480-8.
19. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-41.
20. Abdelwahab, K.S. and Z.N. Ahmed Said, *Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(2): p. 862-73.
21. Hagan, H., E.R. Pouget, and D.C. Des Jarlais, *A systematic review and meta-analysis of interventions to prevent hepatitis C virus infection in people who inject drugs*. J Infect Dis, 2011. **204**(1): p. 74-83.
22. Schiff, E.R., M. de Medina, and R.S. Kahn, *New perspectives in the diagnosis of hepatitis C*. Semin Liver Dis, 1999. **19** Suppl 1: p. 3-15.
23. Germer, J.J. and N.N. Zein, *Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications*. Mayo Clin Proc, 2001. **76**(9): p. 911-20.
24. *National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement: management of hepatitis C*. Hepatology, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 2S-10S.
25. Shimizu, Y.K., et al., *Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy*. Hepatology, 1996. **23**(2): p. 205-9.
26. Shimoike, T., et al., *Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 9718-25.
27. Paul, D., V. Madan, and R. Bartenschlager, *Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(5): p. 569-79.
28. Andre, P., et al., *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6919-28.
29. Moradpour, D. and H.E. Blum, *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(5): p. 477-83.
30. Dubuisson, J., *Hepatitis C virus proteins*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2406-15.
31. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
32. Rijnbrand, R.C. and S.M. Lemon, *Internal ribosome entry site-mediated translation in hepatitis C virus replication*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **242**: p. 85-116.
33. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, *Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence*. Adv Virus Res, 2004. **63**: p. 71-180.

34. Vassilaki, N., et al., *Role of the hepatitis C virus core+1 open reading frame and core cis-acting RNA elements in viral RNA translation and replication*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11503-15.
35. Friebe, P., et al., *Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12047-57.
36. Kim, Y.K., et al., *Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 105-12.
37. Friebe, P. and R. Bartenschlager, *Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5326-38.
38. Yi, M. and S.M. Lemon, *3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3557-68.
39. Yi, M. and S.M. Lemon, *Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication*. RNA, 2003. **9**(3): p. 331-45.
40. Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz, *Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 1): p. 113-20.
41. Cristofari, G., et al., *The hepatitis C virus Core protein is a potent nucleic acid chaperone that directs dimerization of the viral (+) strand RNA in vitro*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(8): p. 2623-31.
42. Boulant, S., et al., *Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11353-65.
43. Kushima, Y., T. Wakita, and M. Hijikata, *A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9118-27.
44. de Chasse, B., et al., *Hepatitis C virus infection protein network*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 230.
45. Boulant, S., et al., *Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22236-47.
46. Bartenschlager, R., et al., *Assembly of infectious hepatitis C virus particles*. Trends Microbiol, 2011. **19**(2): p. 95-103.
47. Dubuisson, J., *Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **242**: p. 135-48.
48. Ralston, R., et al., *Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6753-61.
49. Deleersnyder, V., et al., *Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 697-704.
50. Carrere-Kremer, S., et al., *Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3720-30.
51. Clarke, D., et al., *Evidence for the formation of a heptameric ion channel complex by the hepatitis C virus p7 protein in vitro*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 37057-68.
52. Luik, P., et al., *The 3-dimensional structure of a hepatitis C virus p7 ion channel by electron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12712-6.
53. Chandler, D.E., et al., *The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(9): p. e1002702.
54. Steinmann, E. and T. Pietschmann, *Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy*. Viruses, 2010. **2**(9): p. 2078-95.

55. Wozniak, A.L., et al., *Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production*. PLoS Pathog, 2010. **6**(9): p. e1001087.
56. Schregel, V., et al., *Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5342-7.
57. Gallinari, P., et al., *Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6758-69.
58. Wolk, B., et al., *Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines*. J Virol, 2000. **74**(5): p. 2293-304.
59. Bartenschlager, R., et al., *Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 3835-44.
60. Borowski, P., et al., *Nonstructural protein 3 of hepatitis C virus blocks the distribution of the free catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 2838-43.
61. Gale, M., Jr. and E.M. Foy, *Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 939-45.
62. Serebrov, V. and A.M. Pyle, *Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase*. Nature, 2004. **430**(6998): p. 476-80.
63. Levin, M.K., M. Gurjar, and S.S. Patel, *A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 429-35.
64. Asabe, S.I., et al., *The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 790-6.
65. Hugle, T., et al., *The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein*. Virology, 2001. **284**(1): p. 70-81.
66. Egger, D., et al., *Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex*. J Virol, 2002. **76**(12): p. 5974-84.
67. Gosert, R., et al., *Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5487-92.
68. Lin, C., et al., *The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6465-71.
69. Einav, S., et al., *Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(9): p. 1019-27.
70. Einav, S., et al., *A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11288-95.
71. Thompson, A.A., et al., *Biochemical characterization of recombinant hepatitis C virus nonstructural protein 4B: evidence for ATP/GTP hydrolysis and adenylate kinase activity*. Biochemistry, 2009. **48**(5): p. 906-16.
72. Jones, D.M., et al., *The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2163-77.
73. Macdonald, A., et al., *The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 3): p. 721-9.
74. Reed, K.E., J. Xu, and C.M. Rice, *Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein in vitro and in vivo: properties of the NS5A-associated kinase*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7187-97.

75. Brass, V., et al., *An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8130-9.
76. Penin, F., et al., *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40835-43.
77. Moradpour, D., V. Brass, and F. Penin, *Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A*. Hepatology, 2005. **42**(3): p. 732-5.
78. Gale, M.J., Jr., et al., *Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein*. Virology, 1997. **230**(2): p. 217-27.
79. Enomoto, N., et al., *Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 224-30.
80. Behrens, S.E., L. Tomei, and R. De Francesco, *Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 12-22.
81. Lohmann, V., et al., *Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity*. J Virol, 1997. **71**(11): p. 8416-28.
82. Lesburg, C.A., et al., *Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(10): p. 937-43.
83. Simister, P., et al., *Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase*. J Virol, 2009. **83**(22): p. 11926-39.
84. Harrus, D., et al., *Further insights into the roles of GTP and the C terminus of the hepatitis C virus polymerase in the initiation of RNA synthesis*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 32906-18.
85. Simmonds, P., et al., *Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 11): p. 2391-9.
86. Nakano, T., et al., *An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region*. Liver Int, 2012. **32**(2): p. 339-45.
87. Ohno, O., et al., *New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(1): p. 201-7.
88. Kato, N., et al., *Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **189**(1): p. 119-27.
89. Walewski, J.L., et al., *Mutation Master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core, alternate reading frame, and NS2 coding regions*. Rna, 2002. **8**(5): p. 557-71.
90. Rosen, H.R., *Clinical practice. Chronic hepatitis C infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(25): p. 2429-38.
91. Forton, D.M., et al., *New insights into hepatitis C*. Clin Med, 2002. **2**(6): p. 554-9.
92. Isaguliantis, M.G., *Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy*. Curr Pharm Biotechnol, 2003. **4**(3): p. 169-83.
93. Poenisch, M. and R. Bartenschlager, *New insights into structure and replication of the hepatitis C virus and clinical implications*. Semin Liver Dis, 2010. **30**(4): p. 333-47.
94. Kuiken, C. and P. Simmonds, *Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus*. Methods Mol Biol, 2009. **510**: p. 33-53.
95. Bartenschlager, R. and V. Lohmann, *Replication of hepatitis C virus*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 7): p. 1631-48.

96. Rice, C.M., *New insights into HCV replication: potential antiviral targets*. Top Antivir Med, 2011. **19**(3): p. 117-20.
97. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
98. Agnello, V., et al., *Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12766-71.
99. Blanchard, E., et al., *Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 6964-72.
100. Hsu, M., et al., *Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7271-6.
101. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
102. Wang, C., P. Sarnow, and A. Siddiqui, *Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism*. J Virol, 1993. **67**(6): p. 3338-44.
103. Reynolds, J.E., et al., *Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation*. Embo J, 1995. **14**(23): p. 6010-20.
104. Hellen, C.U. and T.V. Pestova, *Translation of hepatitis C virus RNA*. J Viral Hepat, 1999. **6**(2): p. 79-87.
105. Bushell, M. and P. Sarnow, *Hijacking the translation apparatus by RNA viruses*. J Cell Biol, 2002. **158**(3): p. 395-9.
106. Lindenbach, B.D. and C.M. Rice, *Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 933-8.
107. Dubuisson, J., F. Penin, and D. Moradpour, *Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(11): p. 517-23.
108. Drazan, K.E., *Molecular biology of hepatitis C infection*. Liver Transpl, 2000. **6**(4): p. 396-406.
109. Gastaminza, P., S.B. Kapadia, and F.V. Chisari, *Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11074-81.
110. Lohmann, V., et al., *Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3007-19.
111. Blight, K.J., J.A. McKeating, and C.M. Rice, *Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication*. J Virol, 2002. **76**(24): p. 13001-14.
112. Pietschmann, T., et al., *Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4008-21.
113. Blight, K.J., et al., *Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3181-90.
114. Rice, C.M., *New insights into HCV replication: potential antiviral targets*. Top Antivir Med. **19**(3): p. 117-20.
115. Wakita, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-6.
116. Zhong, J., et al., *Robust hepatitis C virus infection in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9294-9.
117. Kato, T., et al., *Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1808-17.
118. Disson, O., et al., *Impaired clearance of virus-infected hepatocytes in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 859-72.
119. Mercer, D.F., et al., *Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 927-33.

120. Lee, S.S., et al., *Treating chronic hepatitis C with pegylated interferon alfa-2a (40 KD) and ribavirin in clinical practice*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **23**(3): p. 397-408.
121. Ge, D., et al., *Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance*. *Nature*, 2009. **461**(7262): p. 399-401.
122. Chung, R.T., et al., *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(5): p. 451-9.
123. Torriani, F.J., et al., *Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(5): p. 438-50.
124. Carrat, F., et al., *Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2004. **292**(23): p. 2839-48.
125. Manns, M.P., et al., *Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial*. *Lancet*, 2001. **358**(9286): p. 958-65.
126. Fried, M.W., et al., *Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(13): p. 975-82.
127. Feld, J.J. and J.H. Hoofnagle, *Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C*. *Nature*, 2005. **436**(7053): p. 967-72.
128. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. *Hepatology*, 2005. **42**(4): p. 962-73.
129. Foster, G.R., et al., *Efficacy of sofosbuvir plus ribavirin with or without peginterferon-alfa in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection and treatment-experienced patients with cirrhosis and hepatitis C virus genotype 2 infection*. *Gastroenterology*, 2015. **149**(6): p. 1462-70.
130. Curry, M.P., et al., *Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV in Patients with Decompensated Cirrhosis*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(27): p. 2618-28.
131. Foster, G.R., et al., *Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 2 and 3 Infection*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(27): p. 2608-17.
132. Feld, J.J., et al., *Sofosbuvir and Velpatasvir for HCV Genotype 1, 2, 4, 5, and 6 Infection*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(27): p. 2599-607.
133. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(7): p. 482-96.
134. Guzman, A. and R.E. Isturiz, *Update on the global spread of dengue*. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. **36 Suppl 1**: p. S40-2.
135. Hammon, W.M., A. Rudnick, and G.E. Sather, *Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand*. *Science*, 1960. **131**(3407): p. 1102-3.
136. Hotta, S., *Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus*. *J Infect Dis*, 1952. **90**(1): p. 1-9.
137. Sabin, A.B. and R.W. Schlesinger, *Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice*. *Science*, 1945. **101**(2634): p. 640-2.
138. Gubler, D.J., *Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status*. *Novartis Found Symp*, 2006. **277**: p. 3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-3.
139. Whitehorn, J. and C.P. Simmons, *The pathogenesis of dengue*. *Vaccine*, 2011. **29**(42): p. 7221-8.
140. Aggarwal, A., et al., *An epidemic of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome in children in Delhi*. *Indian Pediatr*, 1998. **35**(8): p. 727-32.
141. Rigau-Perez, J.G., et al., *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. *Lancet*, 1998. **352**(9132): p. 971-7.

142. Kyle, J.L. and E. Harris, *Global spread and persistence of dengue*. *Annu Rev Microbiol*, 2008. **62**: p. 71-92.
143. Khan, M.I., et al., *Factors predicting severe dengue in patients with dengue Fever*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2013. **5**(1): p. e2013014.
144. Halstead, S.B., *Dengue*. *Lancet*, 2007. **370**(9599): p. 1644-52.
145. Pang, T., M.J. Cardoso, and M.G. Guzman, *Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS)*. *Immunol Cell Biol*, 2007. **85**(1): p. 43-5.
146. Costa, V.V., et al., *Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction*. *Am J Pathol*, 2013. **182**(6): p. 1950-61.
147. Martina, B.E., P. Koraka, and A.D. Osterhaus, *Dengue virus pathogenesis: an integrated view*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(4): p. 564-81.
148. Coleman, J.C. and D.M. McLean, *Dengue virus transmission by Aedes aegypti mosquitoes following intrathoracic inoculation*. *Am J Trop Med Hyg*, 1973. **22**(1): p. 124-9.
149. Whitehead, S.S., et al., *Prospects for a dengue virus vaccine*. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(7): p. 518-28.
150. Hadinegoro, S.R., et al., *Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(13): p. 1195-206.
151. Pitisuttithum, P. and A. Bouckenoghe, *The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection*. *Expert Rev Vaccines*, 2016. **15**(7): p. 795-8.
152. Guy, B., et al., *Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward*. *Vaccine*, 2015. **33**(50): p. 7100-11.
153. Lang, J., *Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2012. **54 Suppl 18**: p. S15-7.
154. Poo, J., et al., *Live-attenuated Tetravalent Dengue Vaccine in Dengue-naive Children, Adolescents, and Adults in Mexico City: Randomized Controlled Phase 1 Trial of Safety and Immunogenicity*. *Pediatr Infect Dis J*, 2011. **30**(1): p. e9-17.
155. Guy, B., M. Saville, and J. Lang, *Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine*. *Hum Vaccin*, 2010. **6**(9).
156. Guzman, M.G., et al., *Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997*. *Int J Infect Dis*, 1999. **3**(3): p. 130-5.
157. Rosen, L., M.T. Drouet, and V. Deubel, *Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection*. *Am J Trop Med Hyg*, 1999. **61**(5): p. 720-4.
158. Kao, C.L., et al., *Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(10): p. 3672-7.
159. Cardoso, M.J., et al., *IgM capture ELISA for detection of IgM antibodies to dengue virus: comparison of 2 formats using hemagglutinins and cell culture derived antigens*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1992. **23**(4): p. 726-9.
160. Kong, Y.Y., et al., *Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR*. *J Virol Methods*, 2006. **138**(1-2): p. 123-30.
161. Zhang, Y., V.A. Kostyuchenko, and M.G. Rossmann, *Structural analysis of viral nucleocapsids by subtraction of partial projections*. *J Struct Biol*, 2007. **157**(2): p. 356-64.
162. Khera, G. *Scientific Animations* Available from: <http://www.scientificanimations.com/>.
163. Net, D.V. *Dengue Virus*. Available from: <http://www.denguevirusnet.com/dengue-virus.html>.

164. Filomatori, C.V., et al., *A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome*. *Genes Dev*, 2006. **20**(16): p. 2238-49.
165. Iglesias, N.G., C.V. Filomatori, and A.V. Gamarnik, *The F1 motif of dengue virus polymerase NS5 is involved in promoter-dependent RNA synthesis*. *J Virol*, 2011. **85**(12): p. 5745-56.
166. Filomatori, C.V., et al., *RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(9): p. 6929-39.
167. Friebe, P., et al., *Composition of the sequence downstream of the dengue virus 5' cyclization sequence (dCS) affects viral RNA replication*. *Virology*, 2012. **422**(2): p. 346-56.
168. Groat-Carmona, A.M., et al., *A novel coding-region RNA element modulates infectious dengue virus particle production in both mammalian and mosquito cells and regulates viral replication in Aedes aegypti mosquitoes*. *Virology*, 2012. **432**(2): p. 511-26.
169. Mohan, P.M. and R. Padmanabhan, *Detection of stable secondary structure at the 3' terminus of dengue virus type 2 RNA*. *Gene*, 1991. **108**(2): p. 185-91.
170. Romero, T.A., et al., *Secondary structure of dengue virus type 4 3' untranslated region: impact of deletion and substitution mutations*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 11): p. 3291-6.
171. Hahn, C.S., et al., *Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences*. *J Mol Biol*, 1987. **198**(1): p. 33-41.
172. Manzano, M., et al., *Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(25): p. 22521-34.
173. Trent, D.W., et al., *Partial nucleotide sequence of St. Louis encephalitis virus RNA: structural proteins, NS1, ns2a, and ns2b*. *Virology*, 1987. **156**(2): p. 293-304.
174. Yu, L. and L. Markoff, *The Topology of Bulges in the Long Stem of the Flavivirus 3' Stem-Loop Is a Major Determinant of RNA Replication Competence*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(4): p. 2309-2324.
175. Brinton, M.A., A.V. Fernandez, and J.H. Disposito, *The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure*. *Virology*, 1986. **153**(1): p. 113-121.
176. Liu, R., et al., *Identification and characterization of small sub-genomic RNAs in dengue 1-4 virus-infected cell cultures and tissues*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. **391**(1): p. 1099-1103.
177. Liu, Y., et al., *Dengue virus subgenomic RNA induces apoptosis through the Bcl-2-mediated PI3k/Akt signaling pathway*. *Virology*, 2014. **448**: p. 15-25.
178. Jones, C.T., et al., *Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein*. *J Virol*, 2003. **77**(12): p. 7143-9.
179. Ma, L., et al., *Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(10): p. 3414-9.
180. Pong, W.L., et al., *RNA binding property and RNA chaperone activity of dengue virus core protein and other viral RNA-interacting proteins*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(16): p. 2575-81.
181. Zhang, W., et al., *Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(11): p. 907-12.
182. Wong, S.S., et al., *The dengue virus M protein localises to the endoplasmic reticulum and forms oligomers*. *FEBS Lett*, 2012. **586**(7): p. 1032-7.
183. Wang, S., R. He, and R. Anderson, *PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein*. *J Virol*, 1999. **73**(3): p. 2547-51.

184. Junjhon, J., et al., *Differential modulation of prM cleavage, extracellular particle distribution, and virus infectivity by conserved residues at nonfurin consensus positions of the dengue virus pr-M junction*. J Virol, 2008. **82**(21): p. 10776-91.
185. Keelapang, P., et al., *Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2367-81.
186. Klein, D.E., J.L. Choi, and S.C. Harrison, *Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate*. J Virol, 2013. **87**(4): p. 2287-93.
187. Lin, S.R., et al., *The helical domains of the stem region of dengue virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry*. J Virol, 2011. **85**(10): p. 5159-71.
188. Falgout, B., R. Chanock, and C.J. Lai, *Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 1852-60.
189. Leblois, H. and P.R. Young, *Maturation of the dengue-2 virus NS1 protein in insect cells: effects of downstream NS2A sequences on baculovirus-expressed gene constructs*. J Gen Virol, 1995. **76 (Pt 4)**: p. 979-84.
190. Gutsche, I., et al., *Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(19): p. 8003-8.
191. Xie, X., et al., *Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein*. J Virol, 2013. **87**(8): p. 4609-22.
192. Huang, Q., et al., *Expression, purification, and initial structural characterization of nonstructural protein 2B, an integral membrane protein of Dengue-2 virus, in detergent micelles*. Protein Expr Purif, 2011. **80**(2): p. 169-75.
193. Benarroch, D., et al., *The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core*. Virology, 2004. **328**(2): p. 208-18.
194. Cui, T., et al., *Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein*. Virology, 1998. **246**(2): p. 409-17.
195. Li, H., et al., *The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3108-16.
196. Preugschat, F., C.W. Yao, and J.H. Strauss, *In vitro processing of dengue virus type 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B, and NS3*. J Virol, 1990. **64**(9): p. 4364-74.
197. Luo, D., et al., *Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 173-83.
198. Niyomrattanakit, P., et al., *Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13708-16.
199. Matusan, A.E., et al., *Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 proteinase and the production of growth-restricted virus*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 7): p. 1647-56.
200. Preugschat, F., E.M. Lenches, and J.H. Strauss, *Flavivirus enzyme-substrate interactions studied with chimeric proteinases: identification of an intragenic locus important for substrate recognition*. J Virol, 1991. **65**(9): p. 4749-58.
201. Valle, R.P. and B. Falgout, *Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 624-32.
202. Heaton, N.S., et al., *Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17345-50.

203. Wang, C.C., et al., *Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein*. FEBS Lett, 2009. **583**(4): p. 691-6.
204. Xu, T., et al., *Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10278-88.
205. Matusan, A.E., et al., *Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9633-43.
206. Miller, S., et al., *The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8873-82.
207. Cahour, A., B. Falgout, and C.J. Lai, *Cleavage of the dengue virus polyprotein at the NS3/NS4A and NS4B/NS5 junctions is mediated by viral protease NS2B-NS3, whereas NS4A/NS4B may be processed by a cellular protease*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1535-42.
208. Miller, S., S. Sparacio, and R. Bartenschlager, *Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8854-63.
209. Leitmeyer, K.C., et al., *Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis*. J Virol, 1999. **73**(6): p. 4738-47.
210. Mazzon, M., et al., *Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation*. J Infect Dis, 2009. **200**(8): p. 1261-70.
211. Kroschewski, H., et al., *Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19410-21.
212. Issur, M., et al., *The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure*. RNA, 2009. **15**(12): p. 2340-50.
213. Kumar, A., et al., *Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 does not strictly correlate with efficient viral RNA replication and inhibition of type I interferon signaling*. J Virol, 2013. **87**(8): p. 4545-57.
214. Rawlinson, S.M., et al., *CRM1-mediated nuclear export of dengue virus RNA polymerase NS5 modulates interleukin-8 induction and virus production*. J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15589-97.
215. Medin, C.L., K.A. Fitzgerald, and A.L. Rothman, *Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11053-61.
216. Kapoor, M., et al., *Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5*. J Biol Chem, 1995. **270**(32): p. 19100-6.
217. Takahashi, H., et al., *Establishment of a robust dengue virus NS3-NS5 binding assay for identification of protein-protein interaction inhibitors*. Antiviral Res, 2012. **96**(3): p. 305-14.
218. Bhattacharya, D., et al., *Protein kinase G phosphorylates mosquito-borne flavivirus NS5*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9195-205.
219. Yon, C., et al., *Modulation of the nucleoside triphosphatase/RNA helicase and 5'-RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 nonstructural protein 3 (NS3) by interaction with NS5, the RNA-dependent RNA polymerase*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27412-9.
220. Egloff, M.P., et al., *An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization*. EMBO J, 2002. **21**(11): p. 2757-68.

221. Egloff, M.P., et al., *Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5*. J Mol Biol, 2007. **372**(3): p. 723-36.
222. Yap, T.L., et al., *Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4753-65.
223. Guzman, M.G., et al., *Dengue: a continuing global threat*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(12 Suppl): p. S7-16.
224. Halstead, S.B., *Dengue hemorrhagic fever: two infections and antibody dependent enhancement, a brief history and personal memoir*. Rev Cubana Med Trop, 2002. **54**(3): p. 171-9.
225. 2014; Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>.
226. Acosta, E.G., A. Kumar, and R. Bartenschlager, *Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology*. Adv Virus Res, 2014. **88**: p. 1-109.
227. Wu, S.J., et al., *Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 816-20.
228. Mota, J. and R. Rico-Hesse, *Dengue virus tropism in humanized mice recapitulates human dengue fever*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20762.
229. Huerre, M.R., et al., *Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children*. Virchows Arch, 2001. **438**(2): p. 107-15.
230. Salazar, M.I., et al., *Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 9.
231. St John, A.L., S.N. Abraham, and D.J. Gubler, *Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(6): p. 420-6.
232. Marchette, N.J., et al., *Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. 3. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections*. J Infect Dis, 1973. **128**(1): p. 23-30.
233. Kuhn, R.J., et al., *Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion*. Cell, 2002. **108**(5): p. 717-25.
234. Welsch, S., et al., *Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(4): p. 365-75.
235. Alvarez, D.E., et al., *Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication*. Virology, 2005. **339**(2): p. 200-12.
236. Ryan, M.D. and J. Drew, *Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein*. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 928-33.
237. Masse, N., et al., *Dengue virus replicons: production of an interserotypic chimera and cell lines from different species, and establishment of a cell-based fluorescent assay to screen inhibitors, validated by the evaluation of ribavirin's activity*. Antiviral Res, 2010. **86**(3): p. 296-305.
238. Mondotte, J.A., et al., *Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7136-48.
239. Leardkamolkarn, V., et al., *Development of Dengue type-2 virus replicons expressing GFP reporter gene in study of viral RNA replication*. Virus Res, 2012. **163**(2): p. 552-62.
240. Zou, G., et al., *Development and characterization of a stable luciferase dengue virus for high-throughput screening*. Antiviral Res, 2011. **91**(1): p. 11-9.

241. Pierro, D.J., et al., *Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 8): p. 2263-8.
242. Sriburi, R., et al., *Construction of infectious dengue 2 virus cDNA clones using high copy number plasmid*. J Virol Methods, 2001. **92**(1): p. 71-82.
243. Fischl, W. and R. Bartenschlager, *High-throughput screening using dengue virus reporter genomes*. Methods Mol Biol, 2013. **1030**: p. 205-19.
244. Bente, D.A. and R. Rico-Hesse, *Models of dengue virus infection*. Drug Discov Today Dis Models, 2006. **3**(1): p. 97-103.
245. Cologna, R. and R. Rico-Hesse, *American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 3929-38.
246. Cologna, R., P.M. Armstrong, and R. Rico-Hesse, *Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes*. J Virol, 2005. **79**(2): p. 853-9.
247. Bente, D.A., et al., *Dengue fever in humanized NOD/SCID mice*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13797-9.
248. Shrestha, S., et al., *Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10208-17.
249. Huang, K.J., et al., *Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 9): p. 2177-82.
250. Noble, C.G., et al., *Strategies for development of Dengue virus inhibitors*. Antiviral Res, 2010. **85**(3): p. 450-62.
251. Ng, C.Y., et al., *Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing*. Antiviral Res, 2007. **76**(3): p. 222-31.
252. Xie, X., et al., *Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein*. J Virol, 2011. **85**(21): p. 11183-95.
253. Holtz, P., R. Heise, and K. Lüdtke, *Fermentativer Abbau von L-Dioxyphenylalanin (Dopa) durch Niere*. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 1938. **191**(1): p. 87-118.
254. Lancaster, G.A. and T.L. Sourkes, *Purification and Properties of Hog-Kidney 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase*. Canadian Journal of Biochemistry, 1972. **50**(7): p. 791-797.
255. Christenson, J.G., W. Dairman, and S. Udenfriend, *Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1970. **141**(1): p. 356-367.
256. Paterson, I.A., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *2-Phenylethylamine: A Modulator of Catecholamine Transmission in the Mammalian Central Nervous System?* Journal of Neurochemistry, 1990. **55**(6): p. 1827-1837.
257. Dyck, L.E. and K.M. Dewar, *Inhibition of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase and Tyrosine Aminotransferase by the Monoamine Oxidase Inhibitor Phenelzine*. Journal of Neurochemistry, 2006. **46**(6): p. 1899-1903.
258. Jones, R.S.G. and A.A. Boulton, *Interactions between p-tyramine, m-tyramine, or β -phenylethylamine and dopamine on single neurones in the cortex and caudate nucleus of the rat*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1980. **58**(2): p. 222-227.
259. Gillbro, J.M., et al., *Autocrine Catecholamine Biosynthesis and the β 2-Adrenoceptor Signal Promote Pigmentation in Human Epidermal Melanocytes*. Journal of Investigative Dermatology, 2004. **123**(2): p. 346-353.
260. Eaton, M.J., et al., *Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology*. The Journal of Comparative Neurology, 1993. **337**(4): p. 640-654.

261. Christenson, J.G., W. Dairman, and S. Udenfriend, *On the Identity of DOPA Decarboxylase and 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1972. **69**(2): p. 343-347.
262. Crow, T.J., *Positive and negative schizophrenia symptoms and the role of dopamine*. The British Journal of Psychiatry, 1981. **139**(3): p. 251-254.
263. Tison, F., et al., *Aromatic l-amino-acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in dopaminergic and serotonergic cells of the rat brainstem*. Neuroscience Letters, 1991. **127**(2): p. 203-206.
264. Beltramo, M., et al., *Aromatic amino acid decarboxylase (AADC) immunohistochemistry in vertebrate brainstem with an antiserum raised against AADC made in E. coli*. Brain Research Bulletin, 1993. **32**(2): p. 123-132.
265. Snyder, S.H., *Catecholamines in the Brain as Mediators of Amphetamine Psychosis*. Archives of General Psychiatry, 1972. **27**(2): p. 169.
266. Fahn, S., L.R. Libsch, and R.W. Cutler, *Monoamines in the human neostriatum: Topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor*. Journal of the Neurological Sciences, 1971. **14**(4): p. 427-455.
267. Kandel, D.B. and M. Davies, *Cocaine Use in a National Sample of U.S. Youth (NLSY): Ethnic Patterns, Progression, and Predictors*. Substance Use & Misuse, 2009. **32**(12-13): p. 1757-1762.
268. Ben-Jonathan, N. and R. Hnasko, *Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor*. Endocrine Reviews, 2001. **22**(6): p. 724-763.
269. Reymond, M.J. and J.C. Porter, *Involvement of Hypothalamic Dopamine in the Regulation of Prolactin Secretion*. Hormone Research, 1985. **22**(3): p. 142-152.
270. Jaeger, C., et al., *Some neurons of the rat central nervous system contain aromatic-L-amino-acid decarboxylase but not monoamines*. Science, 1983. **219**(4589): p. 1233-1235.
271. Mura, A., et al., *Aromatic l-amino acid decarboxylase immunoreactive cells in the rat striatum: a possible site for the conversion of exogenous l-DOPA to dopamine*. Brain Research, 1995. **704**(1): p. 51-60.
272. Bowsher, R.R. and D.P. Henry, *Decarboxylation of p-Tyrosine: A Potential Source of p-Tyramine in Mammalian Tissues*. Journal of Neurochemistry, 1983. **40**(4): p. 992-1002.
273. Lindstrom, P.E.R. and J. Sehlin, *Mechanisms Underlying the Effects of 5-Hydroxytryptamine and 5-Hydroxytryptophan in Pancreatic Islets. A Proposed Role for L-Aromatic Amino Acid Decarboxylase**. Endocrinology, 1983. **112**(4): p. 1524-1529.
274. Mappouras, D.G. and E.G. Fragoulis, *l-DOPA decarboxylase in Ceratitis capitata white puparia and human: A comparative study*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1990. **97**(2): p. 301-306.
275. Rahman, M.K., N. Toshiharu, and K. Takeshi, *Aromatic l-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with l-dopa and l-5-hydroxytryptophan as substrates*. Biochemical Pharmacology, 1981. **30**(6): p. 645-649.
276. Eisenhofer, G., et al., *Substantial Production of Dopamine in the Human Gastrointestinal Tract*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1997. **82**(11): p. 3864-3871.
277. Lauweryns, J.M. and L. Van Ranst, *Immunocytochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase in human, rat, and mouse bronchopulmonary and gastrointestinal endocrine cells*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2017. **36**(9): p. 1181-1186.

278. Hussein, H.S. and H.O. Balzer, *Use of TSK-SW columns for the high-performance liquid chromatographic analysis of proteins, isolated from sympathetic nerves and fractionated by fractogel TSK-HW chromatography*. Journal of Chromatography A, 1984. **297**: p. 375-383.
279. Borri Voltattorni, C., et al., *Purification and Characterization of 3,4-Dihydroxyphenylalanine Decarboxylase from Pig Kidney*. European Journal of Biochemistry, 1979. **93**(1): p. 181-188.
280. Ichinose, H., et al., *Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase*. Biochemistry, 2002. **31**(46): p. 11546-11550.
281. Maneckjee, R. and S.B. Baylin, *Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase*. Biochemistry, 2002. **22**(26): p. 6058-6063.
282. Mappouras, D., J. Stiakakis, and E. Fragoulis, *Purification and characterization of L-DOPA decarboxylase from human kidney*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1990. **94**(2): p. 147-156.
283. Ando-Yamamoto, M., et al., *Purification of L-DOPA Decarboxylase from Rat Liver and Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies against It1*. The Journal of Biochemistry, 1987. **101**(2): p. 405-414.
284. Nishigaki, I., et al., *Purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody*. Biochemical Journal, 1988. **252**(2): p. 331-335.
285. Shiota, K. and H. Fujisawa, *Purification and Characterization of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase from Rat Kidney and Monoclonal Antibody to the Enzyme*. Journal of Neurochemistry, 1988. **51**(2): p. 426-434.
286. Siow, Y. and K. Dakshinamurti, *Purification of DOPA decarboxylase from bovine striatum*. Molecular and Cellular Biochemistry, 1990. **94**(2): p. 121-131.
287. Nasrin, S., H. Ichinose, and T. Nagatsu, *Comparison of characteristics of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase with human enzyme*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1118**(3): p. 318-322.
288. Dominici, P., P.S. Moore, and C.B. Voltattorni, *Modified Purification of L-Aromatic Amino Acid Decarboxylase from Pig Kidney*. Protein Expression and Purification, 1993. **4**(4): p. 345-347.
289. Maras, B., et al., *Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) decarboxylase. Primary structure and relationship to other amino acid decarboxylases*. European Journal of Biochemistry, 1991. **201**(2): p. 385-391.
290. Burkhard, P., et al., *Nature Structural Biology*, 2001. **8**(11): p. 963-967.
291. Bertoldi, M., *Mammalian dopa decarboxylase: Structure, catalytic activity and inhibition*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **546**: p. 1-7.
292. Ichinose, H., et al., *Simple purification of aromatic L-amino acid decarboxylase from human pheochromocytoma using high-performance liquid chromatography*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(2): p. 408-414.
293. Siow, Y.L. and K. Dakshinamurti, *Effect of pyridoxine deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase in adult rat brain*. Experimental Brain Research, 1985. **59**(3).
294. Rahman, M.K. and T. Nagatsu, *Demonstration of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in human brain with L-dopa and L-5-hydroxytryptophan as substrates by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Neurochemistry International, 1982. **4**(1): p. 1-6.
295. Sims, K.L., G.A. Davis, and F.E. Bloom, *ACTIVITIES OF 3,4-DIHYDROXY-L-PHENYLALANINE AND 5-HYDROXY-L-TRYPTOPHAN DECARBOXYLASES IN RAT BRAIN:*

- ASSAY CHARACTERISTICS AND DISTRIBUTION. *Journal of Neurochemistry*, 1973. **20**(2): p. 449-464.
296. Rahman, M.K., et al., *AROMATIC L-AMINO ACID DECARBOXYLASE ACTIVITY IN BRAINS FROM NORMAL HUMAN SUBJECTS AND FROM PATIENTS WITH EXTRAPYRAMIDAL DISEASES*. *Biomedical Research*, 1981. **2**(5): p. 560-566.
297. Bender, D.A. and W.F. Coulson, *VARIATIONS IN AROMATIC AMINO ACID DECARBOXYLASE ACTIVITY TOWARDS DOPA AND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN CAUSED BY pH CHANGES AND DENATURATION*. *Journal of Neurochemistry*, 1972. **19**(12): p. 2801-2810.
298. Kuntzman, R., et al., *Microanalytical Procedures for Fluoro-Metric Assay of Brain Dopa-5htp Decarboxylase, Norepinephrine and Serotonin, and a Detailed Mapping of Decarboxylase Activity in Brain*. *Journal of Neurochemistry*, 1961. **6**(3): p. 226-231.
299. Zuo, D.M. and P.H. Yu, *High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of aromatic l-amino acid decarboxylase activity towards 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1991. **567**(2): p. 381-388.
300. Srinivasan, K. and J. Awapara, *Substrate specificity and other properties of DOPA decarboxylase from guinea pig kidneys*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 1978. **526**(2): p. 597-604.
301. Dairman, W., et al., *THE PROPORTIONATE LOSS OF L-3,4-DIHYDROXYPHENYLALANINE AND L-5-HYDROXYTRYPTOPHAN DECARBOXYLATING ACTIVITY IN RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM FOLLOWING INTRACISTERNAL ADMINISTRATION OF 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE OR 6-HYDROXYDOPAMINE*. *Journal of Neurochemistry*, 1975. **24**(4): p. 619-623.
302. Melamed, E., et al., *Aromatic L-amino acid decarboxylase in rat corpus striatum: Implications for action of L-dopa in parkinsonism*. *Neurology*, 1981. **31**(6): p. 651-651.
303. Tanaka, T., et al., *Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. **86**(20): p. 8142-8146.
304. Ichinose, H., et al., *Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989. **164**(3): p. 1024-1030.
305. Sumi, C., H. Ichinose, and T. Nagatsu, *Characterization of Recombinant Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Expressed in COS Cells*. *Journal of Neurochemistry*, 1990. **55**(3): p. 1075-1078.
306. Jebai, F., et al., *Expression, Purification, and Characterization of Rat Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase in Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1997. **11**(2): p. 185-194.
307. Coge, F., et al., *Comparative and quantitative study of L-DOPA decarboxylase mRNA in rat neuronal and non-neuronal tissues*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990. **170**(3): p. 1006-1012.
308. Gudehithlu, K.P., et al., *Expression of cloned aromatic l-amino acid decarboxylase in Xenopus laevis oocytes*. *Neurochemistry International*, 1992. **21**(2): p. 275-279.
309. Siaterli, M.-Z., *Neurochemical Research*, 2003. **28**(6): p. 797-803.
310. Porter, C.C., et al., *Inhibition of dopa decarboxylase by the hydrazino analog of α -methyl-dopa*. *Biochemical Pharmacology*, 1962. **11**(11): p. 1067-1077.
311. Carlsson, A., *The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia*. *Neuropsychopharmacology*, 1988. **1**(3): p. 179-186.

312. Maycock, A.L., S.D. Aster, and A.A. Patchett, *Inactivation of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine decarboxylase by 2-(fluoromethyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)alanine*. *Biochemistry*, 2002. **19**(4): p. 709-718.
313. Jonkers, N., et al., *Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat*. *Journal of Neural Transmission*, 2001. **108**(5): p. 559-570.
314. Black, B.C., E.S. Pentz, and T.R.F. Wright, *The alpha methyl dopa hypersensitive gene, l(2)amd, and two adjacent genes in Drosophila melanogaster: Physical location and direct effects of amd on catecholamine metabolism*. *MGG Molecular & General Genetics*, 1987. **209**(2): p. 306-312.
315. Bertoldi, M., M. Gonsalvi, and C. Borri Voltattorni, *Green Tea Polyphenols: Novel Irreversible Inhibitors of Dopa Decarboxylase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **284**(1): p. 90-93.
316. Sumi-Ichinose, C., et al., *Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis*. *Biochemistry*, 2002. **31**(8): p. 2229-2238.
317. Craig, S.P., et al., *Localisation of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase (DDC) to chromosome 7p13→p11 by in situ hybridisation*. *Cytogenetic and Genome Research*, 1992. **61**(2): p. 114-116.
318. Scherer, L.J., et al., *Human dopa decarboxylase: Localization to human chromosome 7p11 and characterization of hepatic cDNAs*. *Genomics*, 1992. **13**(2): p. 469-471.
319. Hahn, S.L., et al., *Structure of the Rat Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene: Evidence for an Alternative Promoter Usage*. *Journal of Neurochemistry*, 1993. **60**(3): p. 1058-1064.
320. Jahng, J.W., et al., *Alternate Promoters in the Rat Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene for Neuronal and Nonneuronal Expression: An In Situ Hybridization Study*. *Journal of Neurochemistry*, 2002. **66**(1): p. 14-19.
321. Kokkinou, I., et al., *Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2009. **42**(1): p. 92-98.
322. Eveleth, D.D. and J.L. Marsh, *Sequence and expression of the Cc gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of Drosophila: possible translational regulation*. *Nucleic Acids Research*, 1986. **14**(15): p. 6169-6183.
323. Li, X.-M., et al., *Specific Irreversible Monoamine Oxidase B Inhibitors Stimulate Gene Expression of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase in PC12 Cells*. *Journal of Neurochemistry*, 2006. **59**(6): p. 2324-2327.
324. Li, X.-M., et al., *l-Deprenyl induces aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) mRNA in the rat substantia nigra and ventral tegmentum*. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 1998. **35**(1-3): p. 149-155.
325. Kim, K.-T., D.H. Park, and T.H. Joh, *Parallel Up-Regulation of Catecholamine Biosynthetic Enzymes by Dexamethasone in PC12 Cells*. *Journal of Neurochemistry*, 1993. **60**(3): p. 946-951.
326. Li, X.-M., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *Induction of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA by interleukin-1 β and prostaglandin E2 in PC12 cells*. *Neurochemical Research*, 1994. **19**(5): p. 591-595.
327. Li, X.-M., A.V. Juorio, and A.A. Boulton, *NSD-1015 alters the gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat PC12 pheochromocytoma cells*. *Neurochemical Research*, 1993. **18**(8): p. 915-919.

328. Buckland, P.R., M.C. O'Donovan, and P. McGuffin, *Changes in dopa decarboxylase mRNA but not tyrosine hydroxylase mRNA levels in rat brain following antipsychotic treatment*. *Psychopharmacology*, 1992. **108**(1-2): p. 98-102.
329. Hadjiconstantinou, M., et al., *Dizocilpine enhances striatal tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase activity*. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology*, 1995. **289**(1): p. 97-101.
330. Wessel, T.C. and T.H. Joh, *Parallel upregulation of catecholamine-synthesizing enzymes in rat brain and adrenal gland: effects of reserpine and correlation with immediate early gene expression*. *Molecular Brain Research*, 1992. **15**(3-4): p. 349-360.
331. Li, X.-M., et al., *Amantadine increases aromatic 1L-amino acid decarboxylase mRNA in PC12 cells*. *Journal of Neuroscience Research*, 1998. **53**(4): p. 490-493.
332. Buckland, P.R., G. Spurlock, and P. McGuffin, *Amphetamine and vigabatrin down regulate aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA levels*. *Molecular Brain Research*, 1996. **35**(1-2): p. 69-76.
333. Li, X.M., et al., *Reciprocal regulation of the content of aromatic L-amino acid decarboxylase and tyrosine hydroxylase mRNA by NGF in PC12 cells*. *Journal of Neuroscience Research*, 1997. **47**(4): p. 449-454.
334. O'Malley, K.L., et al., *The Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Gene Can Be Alternatively Spliced To Generate Unique Protein Isoforms*. *Journal of Neurochemistry*, 2002. **65**(6): p. 2409-2416.
335. Chang, Y.T., G. Mues, and K. Hyland, *Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA*. *Neuroscience Letters*, 1996. **202**(3): p. 157-160.
336. Kokkinou, I., E.G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, *The U937 macrophage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase*. *Journal of Neuroimmunology*, 2009. **216**(1-2): p. 51-58.
337. Rorsman, F., et al., *Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(19): p. 8626-8629.
338. Vassilacopoulou, D., et al., *Identification and Characterization of a Novel Form of the Human L-Dopa Decarboxylase mRNA*. *Neurochemical Research*, 2004. **29**(10): p. 1817-1823.
339. Kang, S.-H., M.S. Fuchs, and P.M. Webb, *Purification and characterization of DOPA-decarboxylase from adult gravid Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry*, 1980. **10**(5): p. 501-508.
340. Young, E.A., N.H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, *Evidence for Cyclic AMP-Mediated Increase of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Activity in the Striatum and Midbrain*. *Journal of Neurochemistry*, 1993. **60**(6): p. 2331-2333.
341. Young, E.A., N.H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, *Phorbol Ester Administration Transiently Increases Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Activity of the Mouse Striatum and Midbrain*. *Journal of Neurochemistry*, 2002. **63**(2): p. 694-697.
342. Keabian, P.R., J.W. Keabian, and D.O. Carpenter, *Regulation of cyclic AMP in heart and gill of by the putative neurotransmitters dopamine and serotonin*. *Life Sciences*, 1979. **24**(19): p. 1757-1764.
343. Campiani, G., et al., *New Antipsychotic Agents with Serotonin and Dopamine Antagonist Properties Based on a Pyrrolo[2,1-b][1,3]benzothiazepine Structure*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1998. **41**(20): p. 3763-3772.
344. Liljefors, T. and K.P. Boegesoe, *Conformational analysis and structural comparisons of (1R,3S)-(+)- and (1S,3R)-(-)-tefludazine, (S)-(+)- and (R)-(-)-octoclothebin, and (+)-*

- dexclamol in relation to dopamine receptor antagonism and amine-uptake inhibition.* Journal of Medicinal Chemistry, 1988. **31**(2): p. 306-312.
345. Smith, J.L., et al., *Inhibition of Dengue Virus Replication by a Class of Small-Molecule Compounds That Antagonize Dopamine Receptor D4 and Downstream Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling.* Journal of Virology, 2014. **88**(10): p. 5533-5542.
346. Huff, R.M., *Signal transduction pathways modulated by the D2 subfamily of dopamine receptors.* Cellular Signalling, 1996. **8**(6): p. 453-459.
347. Ramos, M.M., et al., *Early clinical features of dengue infection in Puerto Rico.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2009. **103**(9): p. 878-884.
348. Simanjuntak, Y., et al., *Repurposing of Prochlorperazine for Use Against Dengue Virus Infection.* Journal of Infectious Diseases, 2015. **211**(3): p. 394-404.
349. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors.* Pharmacological Reviews, 2011. **63**(1): p. 182-217.
350. Gastaminza, P., C. Whitten-Bauer, and F.V. Chisari, *Unbiased probing of the entire hepatitis C virus life cycle identifies clinical compounds that target multiple aspects of the infection.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **107**(1): p. 291-296.
351. Wang, L.H., *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.* The Journal of Cell Biology, 1993. **123**(5): p. 1107-1117.
352. Blanchard, E., et al., *Hepatitis C Virus Entry Depends on Clathrin-Mediated Endocytosis.* Journal of Virology, 2006. **80**(14): p. 6964-6972.
353. Ishida, H., et al., *Alterations in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(1): p. 92-97.
354. Pramod, A.B., et al., *SLC6 transporters: Structure, function, regulation, disease association and therapeutics.* Molecular Aspects of Medicine, 2013. **34**(2-3): p. 197-219.
355. Bartel, D.P., *MicroRNAs.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
356. Cheng, Mary H. and I. Bahar, *Molecular Mechanism of Dopamine Transport by Human Dopamine Transporter.* Structure, 2015. **23**(11): p. 2171-2181.
357. Šerý, O., et al., *A 40-bp VNTR polymorphism in the 3'-untranslated region of DAT1/SLC6A3 is associated with ADHD but not with alcoholism.* Behavioral and Brain Functions, 2015. **11**(1).
358. Ettinger, U., N. Merten, and J. Kambeitz, *Meta-analysis of the association of the SLC6A3 3'-UTR VNTR with cognition.* Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2016. **60**: p. 72-81.
359. Sano, A., et al., *A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene.* Human Genetics, 1993. **91**(4).
360. Jia, X., et al., *miR-137 and miR-491 Negatively Regulate Dopamine Transporter Expression and Function in Neural Cells.* Neuroscience Bulletin, 2016. **32**(6): p. 512-522.
361. Richter, S., et al., *Role of Hypoxia and HIF2 α in Development of the Sympathoadrenal Cell Lineage and Chromaffin Cell Tumors with Distinct Catecholamine Phenotypic Features.* 2013. **68**: p. 285-317.
362. Brown, S.T., et al., *Hypoxia inducible factor (HIF)-2 α is required for the development of the catecholaminergic phenotype of sympathoadrenal cells.* Journal of Neurochemistry, 2009. **110**(2): p. 622-630.

363. Buchkovich, N.J., et al., *The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K–Akt–mTOR signalling pathway*. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. **6**(4): p. 266-275.
364. Munter, S., M. Way, and F. Frischknecht, *Signaling During Pathogen Infection*. *Science Signaling*, 2006. **2006**(335): p. re5-re5.
365. Hale, B.G., et al., *The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses*. *Journal of General Virology*, 2008. **89**(10): p. 2359-2376.
366. Langland, J.O. and B.L. Jacobs, *The Role of the PKR-Inhibitory Genes, E3L and K3L, in Determining Vaccinia Virus Host Range*. *Virology*, 2002. **299**(1): p. 133-141.
367. Berro, R., et al., *CDK13, a New Potential Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitory Factor Regulating Viral mRNA Splicing*. *Journal of Virology*, 2008. **82**(14): p. 7155-7166.
368. Sugden, B., et al., *Activation of Host Translational Control Pathways by a Viral Developmental Switch*. *PLoS Pathogens*, 2009. **5**(3): p. e1000334.
369. Vogt, P.K., et al., *Phosphatidylinositol 3-Kinase: The Oncoprotein*. 2010. **347**: p. 79-104.
370. Kuriyan, J., et al., *Intramolecular and Intermolecular Interactions of Protein Kinase B Define Its Activation In Vivo*. *PLoS Biology*, 2007. **5**(4): p. e95.
371. Downward, J., *Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt*. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998. **10**(2): p. 262-267.
372. Facchinetti, V., et al., *The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C*. *The EMBO Journal*, 2008. **27**(14): p. 1932-1943.
373. Biggs, W.H., et al., *Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(13): p. 7421-7426.
374. Robey, R.B. and N. Hay, *Is Akt the “Warburg kinase”?—Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis*. *Seminars in Cancer Biology*, 2009. **19**(1): p. 25-31.
375. Dunn, E.F. and J.H. Connor, *HijAkt*. 2012. **106**: p. 223-250.
376. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR Signaling in Growth and Metabolism*. *Cell*, 2006. **124**(3): p. 471-484.
377. Gao, X., et al., *Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid–TOR signalling*. *Nature Cell Biology*, 2002. **4**(9): p. 699-704.
378. Ramaswamy, S., et al., *Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(5): p. 2110-2115.
379. Kane, L.P., et al., *Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase*. *Current Biology*, 1999. **9**(11): p. 601-S1.
380. Cooray, S., *The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival*. *Journal of General Virology*, 2004. **85**(5): p. 1065-1076.
381. Lee, C.J., C.L. Liao, and Y.L. Lin, *Flavivirus Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling To Block Caspase-Dependent Apoptotic Cell Death at the Early Stage of Virus Infection*. *Journal of Virology*, 2005. **79**(13): p. 8388-8399.
382. Peng, L., et al., *Hepatitis C Virus NS5A Activates the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway, Contributing to Cell Survival by Disrupting the Interaction between FK506-binding Protein 38 (FKBP38) and mTOR*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(27): p. 20870-20881.
383. Bai, X., et al., *Rheb Activates mTOR by Antagonizing Its Endogenous Inhibitor, FKBP38*. *Science*, 2007. **318**(5852): p. 977-980.
384. Kaur, S., E. Katsoulidis, and L.C. Plataniias, *Akt and mRNA translation by interferons*. *Cell Cycle*, 2014. **7**(14): p. 2112-2116.

385. Kaur, S., et al., *Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(12): p. 4808-4813.
386. Thomas, K.W., et al., *Respiratory Syncytial Virus Inhibits Apoptosis and Induces NF- κ B Activity through a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(1): p. 492-501.
387. He, Y., et al., *Subversion of Cell Signaling Pathways by Hepatitis C Virus Nonstructural 5A Protein via Interaction with Grb2 and P85 Phosphatidylinositol 3-Kinase*. Journal of Virology, 2002. **76**(18): p. 9207-9217.
388. Street, A., et al., *The Hepatitis C Virus NS5A Protein Activates a Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Survival Signaling Cascade*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(13): p. 12232-12241.
389. Banerjee, S., et al., *Hepatitis C Virus Core Protein Upregulates Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs the Downstream Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway for Insulin Resistance*. Journal of Virology, 2007. **82**(6): p. 2606-2612.
390. Bose, S.K., et al., *Hepatitis C Virus Activates the mTOR/S6K1 Signaling Pathway in Inhibiting IRS-1 Function for Insulin Resistance*. Journal of Virology, 2012. **86**(11): p. 6315-6322.
391. Liu, Z., et al., *Transient Activation of the PI3K-AKT Pathway by Hepatitis C Virus to Enhance Viral Entry*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(50): p. 41922-41930.
392. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2004. **15**(2): p. 177-182.
393. Cox, A.D. and C.J. Der, *The dark side of Ras: regulation of apoptosis*. Oncogene, 2003. **22**(56): p. 8999-9006.
394. Mannova, P. and L. Beretta, *Activation of the N-Ras-PI3K-Akt-mTOR Pathway by Hepatitis C Virus: Control of Cell Survival and Viral Replication*. Journal of Virology, 2005. **79**(14): p. 8742-8749.
395. Coito, C., et al., *High-Throughput Screening of the Yeast Kinome: Identification of Human Serine/Threonine Protein Kinases That Phosphorylate the Hepatitis C Virus NS5A Protein*. Journal of Virology, 2004. **78**(7): p. 3502-3513.
396. Pietschmann, T., et al., *Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs*. Journal of Virology, 2001. **75**(3): p. 1252-1264.
397. Hay, N., *Upstream and downstream of mTOR*. Genes & Development, 2004. **18**(16): p. 1926-1945.
398. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras*. Nature, 1994. **370**(6490): p. 527-532.
399. Bosch, F.X., et al., *Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends*. Gastroenterology, 2004. **127**(5): p. S5-S16.
400. Faried, L.S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) by rapamycin increases chemosensitivity of CaSki cells to paclitaxel*. European Journal of Cancer, 2006. **42**(7): p. 934-947.
401. Sahin, F., *mTOR and P70 S6 Kinase Expression in Primary Liver Neoplasms*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(24): p. 8421-8425.
402. Zhou, L., et al., *The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma*. Medical Oncology, 2009. **27**(2): p. 255-261.
403. Samuels, Y., *High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers*. Science, 2004. **304**(5670): p. 554-554.
404. Brugge, J., M.-C. Hung, and G.B. Mills, *A New Mutational activation in the PI3K Pathway*. Cancer Cell, 2007. **12**(2): p. 104-107.

405. Bleeker, F.E., et al., *AKT1E17K in human solid tumours*. *Oncogene*, 2008. **27**(42): p. 5648-5650.
406. Malanga, D., et al., *Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT in a subset of squamous cell carcinoma of the lung*. *Cell Cycle*, 2014. **7**(5): p. 665-669.
407. Zhou, Q., V.W.Y. Lui, and W. Yeo, *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma*. *Future Oncology*, 2011. **7**(10): p. 1149-1167.
408. Honda, M., et al., *Cell cycle regulation of hepatitis C virus internal ribosomal entry site-directed translation*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(1): p. 152-162.
409. Castellanos, J.E., J.I. Neissa, and S.J. Camacho, *La infección con el virus del dengue induce apoptosis en células del neuroblastoma humano SH-SY5Y*. *Biomédica*, 2016. **36**: p. 156.
410. Courageot, M.-P., A. Catteau, and P. Desprès, *Mechanisms of Dengue virus-induced cell death*. 2003. **60**: p. 157-186.
411. Chen, H.-H., et al., *AR-12 suppresses dengue virus replication by down-regulation of PI3K/AKT and GRP78*. *Antiviral Research*, 2017. **142**: p. 158-168.
412. Booth, L., et al., *AR-12 Inhibits Multiple Chaperones Concomitant With Stimulating Autophagosome Formation Collectively Preventing Virus Replication*. *Journal of Cellular Physiology*, 2016. **231**(10): p. 2286-2302.
413. Gao, M., et al., *OSU-03012, a Novel Celecoxib Derivative, Induces Reactive Oxygen Species-Related Autophagy in Hepatocellular Carcinoma*. *Cancer Research*, 2008. **68**(22): p. 9348-9357.
414. Chang, T.-H., C.-L. Liao, and Y.-L. Lin, *Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF- κ B activation*. *Microbes and Infection*, 2006. **8**(1): p. 157-171.
415. Vassilaki, N. and E. Frakolaki, *Virus-host interactions under hypoxia*. *Microbes and Infection*, 2017. **19**(3): p. 193-203.
416. Vassilaki, N. and E. Frakolaki, *Virus-host interactions under hypoxia*. *Microbes Infect*, 2017. **19**(3): p. 193-203.
417. Carreau, A., et al., *Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia*. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
418. de Groot, H. and T. Noll, *Oxygen gradients: the problem of hypoxia*. *Biochem Soc Trans*, 1987. **15**(3): p. 363-5.
419. Jobst, G., et al., *Thin-film Clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1993. **8**(3-4): p. 123-128.
420. Paulson, O.B., *Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2002. **12**(6): p. 495-501.
421. Zhang, C.C. and H.A. Sadek, *Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(12): p. 1891-901.
422. Torre, C., C. Perret, and S. Colnot, *Molecular determinants of liver zonation*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2010. **97**: p. 127-50.
423. Hijmans, B.S., et al., *Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences*. *Biochimie*, 2014. **96**: p. 121-9.
424. Semenza, G.L., *Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease*. *New England Journal of Medicine*, 2011. **365**(6): p. 537-547.
425. Bracken, C.P., et al., *Cell-specific Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Stabilization and Transactivation in a Graded Oxygen Environment*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(32): p. 22575-22585.
426. Ho, P.L., et al., *Activation of Hypoxia Inducible Factor 1 Is a General Phenomenon in Infections with Human Pathogens*. *PLoS ONE*, 2010. **5**(7): p. e11576.

427. Richard, D.E., et al., *p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(46): p. 32631-32637.
428. Kwon, S.J., *Signal Pathway of Hypoxia-Inducible Factor-1 Phosphorylation and its Interaction with von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein During Ischemia in MiaPaCa-2 Pancreatic Cancer Cells*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(21): p. 7607-7613.
429. Webster, K.A., *Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(17): p. 2911-2922.
430. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
431. Levine, A.J. and A.M. Puzio-Kuter, *The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Science, 2010. **330**(6009): p. 1340-1344.
432. Vassilaki, N., et al., *Low Oxygen Tension Enhances Hepatitis C Virus Replication*. Journal of Virology, 2012. **87**(5): p. 2935-2948.
433. Cuthbertson, D.P., *Creatine and Creatinine Metabolism*. Nature, 1944. **154**(3914): p. 564-565.
434. Ch'ng, W.-C., et al., *The Oncolytic Activity of Newcastle Disease Virus in Clear Cell Renal Carcinoma Cells in Normoxic and Hypoxic Conditions: The Interplay Between von Hippel-Lindau and Interferon- β Signaling*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2013. **33**(7): p. 346-354.
435. Parrish, C., et al., *Productive Parvovirus B19 Infection of Primary Human Erythroid Progenitor Cells at Hypoxia Is Regulated by STAT5A and MEK Signaling but not HIF α* . PLoS Pathogens, 2011. **7**(6): p. e1002088.
436. Ivanovic, Z., *Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm*. Journal of Cellular Physiology, 2009. **219**(2): p. 271-275.
437. Parmar, K., et al., *Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(13): p. 5431-5436.
438. Ngo, H., et al., *The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities*. Molecular Biology Reports, 2014. **42**(4): p. 825-834.
439. Nasimuzzaman, M., et al., *Hepatitis C Virus Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor 1 and Stimulates the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor*. Journal of Virology, 2007. **81**(19): p. 10249-10257.
440. Ripoli, M., et al., *Hepatitis C Virus-Linked Mitochondrial Dysfunction Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Glycolytic Adaptation*. Journal of Virology, 2009. **84**(1): p. 647-660.
441. Wilson, G.K., et al., *A dual role for hypoxia inducible factor-1 α in the hepatitis C virus lifecycle and hepatoma migration*. Journal of Hepatology, 2012. **56**(4): p. 803-809.
442. Fontaine, K.A., et al., *Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication*. Journal of Virology, 2015. **89**(4): p. 2358-2366.
443. Yu, Y., T.G. Maguire, and J.C. Alwine, *ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, enhances glucose metabolism to support biosynthesis in human cytomegalovirus-infected cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(5): p. 1951-1956.
444. Ramiere, C., et al., *Activity of Hexokinase Is Increased by Its Interaction with Hepatitis C Virus Protein NS5A*. Journal of Virology, 2014. **88**(6): p. 3246-3254.
445. Massacesi, C., et al., *PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design*. OncoTargets and Therapy, 2016: p. 203.

446. Mayer, I.A. and C.L. Arteaga, *The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment*. Annual Review of Medicine, 2016. **67**(1): p. 11-28.
447. McKeown, S.R., *Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response*. The British Journal of Radiology, 2014. **87**(1035): p. 20130676.
448. Masson, N. and P.J. Ratcliffe, *Hypoxia signaling pathways in cancer metabolism: the importance of co-selecting interconnected physiological pathways*. Cancer & Metabolism, 2014. **2**(1): p. 3.
449. Zhou, Qiong L., et al., *Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Biochemical Journal, 2008. **411**(3): p. 647-655.
450. Miiinea, Cristinel P., et al., *AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain*. Biochemical Journal, 2005. **391**(1): p. 87-93.
451. Kanzaki, M., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Regulates Adipocyte Actin Dynamics and GLUT4 Vesicle Recycling*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30622-30633.
452. Chae, Y.C., et al., *Mitochondrial Akt Regulation of Hypoxic Tumor Reprogramming*. Cancer Cell, 2016. **30**(2): p. 257-272.
453. Kim, K., et al., *Curcumin inhibits hepatitis C virus replication via suppressing the Akt-SREBP-1 pathway*. FEBS Letters, 2010. **584**(4): p. 707-712.
454. Guo, D., et al., *Targeting SREBP-1-driven Lipid Metabolism to Treat Cancer*. Current Pharmaceutical Design, 2014. **20**(15): p. 2619-2626.
455. Mankouri, J., et al., *Enhanced hepatitis C virus genome replication and lipid accumulation mediated by inhibition of AMP-activated protein kinase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(25): p. 11549-11554.
456. Bonini, M.G. and B.N. Gantner, *The multifaceted activities of AMPK in tumor progression—why the “one size fits all” definition does not fit at all?* IUBMB Life, 2013. **65**(11): p. 889-896.
457. Street, A., et al., *Hepatitis C Virus NS5A-Mediated Activation of Phosphoinositide 3-Kinase Results in Stabilization of Cellular β -Catenin and Stimulation of β -Catenin-Responsive Transcription*. Journal of Virology, 2005. **79**(8): p. 5006-5016.
458. Park, C.-Y., et al., *Hepatitis C Virus Nonstructural 4B Protein Modulates Sterol Regulatory Element-binding Protein Signaling via the AKT Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(14): p. 9237-9246.
459. Awad, A. and A. Gassama-Diagne, *PI3K/SHIP2/PTEN pathway in cell polarity and hepatitis C virus pathogenesis*. World Journal of Hepatology, 2017. **9**(1): p. 18.
460. Avgeris, M., et al., *Expression analysis and clinical utility of L-Dopa decarboxylase (DDC) in prostate cancer*. Clinical Biochemistry, 2008. **41**(14-15): p. 1140-1149.
461. Kontos, C.K., et al., *Quantitative expression analysis and prognostic significance of L-DOPA decarboxylase in colorectal adenocarcinoma*. British Journal of Cancer, 2010. **102**(9): p. 1384-1390.
462. Patsis, C., et al., *L-DOPA Decarboxylase (DDC) Expression Status as a Novel Molecular Tumor Marker for Diagnostic and Prognostic Purposes in Laryngeal Cancer*. Translational Oncology, 2012. **5**(4): p. 288-296.
463. Whitehorn, J. and C.P. Simmons, *The pathogenesis of dengue*. Vaccine, 2011. **29**(42): p. 7221-7228.
464. Chalatsa, I., et al., *L-Dopa decarboxylase expression profile in human cancer cells*. Molecular Biology Reports, 2010. **38**(2): p. 1005-1011.
465. Groenman, F.A., et al., *Effect of chemical stabilizers of hypoxia-inducible factors on early lung development*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2007. **293**(3): p. L557-L567.

466. Scaturro, P., et al., *Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins*. PLoS Pathog, 2015. **11**(11): p. e1005277.
467. Tyce, G.M., *THE EFFECT OF L-DOPA AND AN INHIBITOR OF PERIPHERAL DECARBOXYLATION ON GLUCOSE METABOLISM IN BRAIN*. Journal of Neurochemistry, 1976. **27**(6): p. 1397-1403.
468. Rubí, B. and P. Maechler, *Minireview: New Roles for Peripheral Dopamine on Metabolic Control and Tumor Growth: Let's Seek the Balance*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5570-5581.
469. Zhu, M.Y. and A.V. Juorio, *Aromatic l-amino acid decarboxylase: Biological characterization and functional role*. General Pharmacology: The Vascular System, 1995. **26**(4): p. 681-696.
470. Berry, M.D., et al., *Aromatic l-amino acid decarboxylase: A neglected and misunderstood enzyme*. Neurochemical Research, 1996. **21**(9): p. 1075-1087.