



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ
ΤΜΗΜΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική εργασία

**Μελέτη του λιπιδικού προφίλ του ξενιστή παρουσία παραγόντων
που επηρεάζουν τον ηπατικό λιπιδικό μεταβολισμό στην HCV
μόλυνση**

Δελής Αλφόνσος Ελευθέριος

Επιβλέποντες

Ευάγγελος Τόπακας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Σχολή Χημικών Μηχανικών,
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Πελαγία Φωκά, Εντεταλμένη Ερευνήτρια, Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας,
Ελληνικό Ίδρυμα Παστέρ

ΑΘΗΝΑ 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο "Μελέτη του λιπιδικού προφίλ του ξενιστή παρουσία παραγόντων που επηρεάζουν τον ηπατικό λιπιδικό μεταβολισμό στον HCV-επαγόμενο ηπατοκυτταρικό καρκίνο" πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. και εκπονήθηκε στο Ελληνικό Ίδρυμα Παστέρ, στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του τμήματος Μικροβιολογίας, υπό την επίβλεψη της Δρ Πελαγίας Φωκά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την Δρ Πελαγία Φωκά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την έρευνα της διπλωματικής μου εργασίας στο εργαστήριο της Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π.. Ακόμα, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την συνεχή καθοδήγηση και στήριξη που μου προσέφερε, μαθαίνοντας μου παράλληλα τον σωστό τρόπο αντιμετώπισης επιστημονικών ερωτημάτων.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Ευάγγελο Τόπακα, που δέχθηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής μου στο Ε.Μ.Π., καθώς και για την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου προσέφερε, όντας πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Ουρανία Γεωργοπούλου, Διευθύντρια Ερευνών του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. που με δέχτηκε και ήταν πάντα πρόθυμη να με συμβουλέψει και να με βοηθήσει. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις υποψήφια διδάκτορες Βανέσσα Βαλιάκου και Γεωργία Παπαδοπούλου, για την εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε και τη συνεχή υποστήριξη που μου παρείχαν, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, την μετα-διδασκαλική ερευνήτρια Ειρήνη Καραμιχάλη, τον κο Θάνο Κακκανά την υποψήφια διδάκτορα Ευθυμιάννα Κουφογεώργου και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Κωνσταντίνα Ανδρεσάκη και Δομνίκη Λουκάκη για την βοήθεια και το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον του εργαστηρίου που μου παρείχαν.

Τέλος, ολοκληρώνοντας τον κύκλο των προπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και του φίλους μου για όλη την συμπαράσταση και όλες τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε τα τελευταία πέντε χρόνια.

Δελής Αλφόνσος-Ελευθέριος

Αθήνα 2021

Περίληψη

Η χρόνια λοίμωξη που προκαλείται από τον ιό της Ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί σοβαρό πρόβλημα της παγκόσμιας δημόσιας υγείας, με περίπου 71 εκατομμύρια φορείς του ιού. Ένα μεγάλο ποσοστό των HCV ασθενών εμφανίζουν ηπατική φλεγμονή και στεάτωση, οι οποίες εξελίσσονται σε ηπατική ίνωση, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ). Η αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό είναι πολυεπίπεδη, καθώς ο ιός χρησιμοποιεί λιπίδια σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του. Κυτταρικοί και επιγενετικοί ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού του ξενιστή, όπως τα βιομόρια ANGPTL-3 (Angiopoietin-like 3) και LSD1 (Lysine-specific demethylase 1) αλλά πιθανώς και άλλες συγγενείς πρωτεΐνες όπως οι ANGPTL-4 και LSD2 εμπλέκονται σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του λιπιδικού προφίλ ηπατικών κυτταροσειρών που υπερέκφραζουν τους παραπάνω ρυθμιστικούς παράγοντες παρουσία ή απουσία του HCV.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, προσδιορίστηκε η ενζυμική ενεργότητα της ηπατικής λιπάσης (HL) στόχου των ANGPTLs σε ηπατικές κυτταροσειρές υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 και βρέθηκε πως η αυξημένη έκφραση αυτών των μορίων προκαλεί μερική αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της HL. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση των ενδογενών επιπέδων των ηπατικών τριγλυκεριδίων, πιθανόν λόγω μειωμένης εισόδου λιπιδίων από την κυκλοφορία μέσω της HL, καθώς και μείωση του αριθμού των λιποσταγονιδίων – αποθηκών των τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές αυτές. Η μόλυνση των κυτταροσειρών με τα ιικά στελέχη HCV-2a και HCV-3a δεν κατάφερε να αναστρέψει τις παρατηρούμενες μειώσεις στις δοκιμαζόμενες παραμέτρους του ηπατικού λιπιδικού μεταβολισμού, αν και ο HCV έχει δειχθεί να αυξάνει την ηπατική λιπογένεση.

Κατά την ποιοτική εκτίμηση του αριθμού των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων σε κυτταροσειρά υπερέκφρασης του επιγενετικού παράγοντα LSD1, ο οποίος είναι θετικός ρυθμιστής της ANGPTL-3, αυτά βρέθηκαν μειωμένα. Παρατηρήθηκε και σε αυτή τη περίπτωση πως η μόλυνση αυτού του κλώνου με τον ιό HCV-3a δεν κατάφερε να αποκαταστήσει τα φυσιολογικά επίπεδα των λιποσταγονιδίων. Τέλος, εξετάστηκε για πρώτη φορά η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του συγγενικού με την LSD1 επιγενετικού παράγοντα LSD2 με τον HCV. Ύστερα από προσδιορισμό των επιπέδων mRNA της LSD2 σε ηπατοκύτταρα Huh7.5 μετά από μόλυνση με το ιικό στέλεχος HCV-3a, διαπιστώθηκε πως ο ιός επηρεάζει διαφορετικά την έκφραση της κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του, υποδεικνύοντας ένα νέο μηχανισμό ιικής ρύθμισης του λιπιδικού μεταβολισμού του ξενιστή. Τέλος, φάνηκε πως η υπερέκφραση της LSD2 σε ηπατοκύτταρα μολυσμένα με HCV, περιορίζει σημαντικά τον ιικό αναδιπλασιασμό.

Η ταυτοποίηση τέτοιων μηχανισμών βοηθά στην καλύτερη κατανόηση του κύκλου ζωής του HCV και της παθολογίας της HCV-εξαρτώμενης ηπατικής νόσου, ενώ παράλληλα μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών.

Λέξεις Κλειδιά: HCV, Λιπιδικός μεταβολισμός, Κυτταρικοί ρυθμιστές, Επιγενετικοί ρυθμιστές, ANGPTL-3, ANGPTL-4, LSD1, LSD2.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is a serious global public health problem, with approximately 71 million chronically infected individuals. A high percentage of HCV patients develops liver inflammation and steatosis, which progress to liver fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC). The interaction of the virus with cellular lipid metabolism is multifaceted, as the virus uses lipids at all stages of its life cycle. Cellular and epigenetic regulators of host lipid metabolism, such as the biomolecules ANGPTL-3 (Angiopoietin-like 3) and LSD1 (Lysine-specific demethylase 1), but possibly other related proteins such as ANGPTL-4 and LSD2, are also involved in these interactions.

The aim of this dissertation is to study the lipid profile of hepatic cell lines that overexpress the above regulatory factors in the presence or absence of HCV.

In the performed experiments, we determined the enzymatic activity of hepatic lipase (HL), a target molecule of ANGPTLs in hepatic cell lines that overexpress ANGPTL-3 and ANGPTL-4. It was found that increased expression of these molecules causes partial inhibition of HL's enzymatic activity. The endogenous levels of hepatic triglycerides were also found decreased in these cell lines, possibly due to reduced lipid uptake from the circulation through HL. This finding was complemented by a lower number of hepatic lipid droplets that serve as intracellular stores for triglycerides. Infection of the overexpressing cell lines with the viral strains HCV-2a and HCV-3a failed to reverse the observed reductions in the tested parameters of hepatic lipid metabolism, despite the fact that HCV has been shown to increase hepatic lipogenesis.

When we performed a qualitative assessment of the number of intracellular lipid droplets in a hepatic cell line that overexpresses the epigenetic factor LSD1, which is a positive regulator of ANGPTL-3, they were found to be reduced. It was also observed in this case that the infection of this clone with the HCV-3a virus failed to restore the normal levels of the lipid droplets. Finally, the possibility of interaction of LSD1-related epigenetic factor LSD2 with HCV was examined for the first time. After determining the mRNA levels of LSD2 in Huh7.5 hepatocytes following infection with the viral strain HCV-3a, it was shown that the virus differentially affects its expression during its life cycle, indicating a new mechanism of viral regulation of lipid metabolism of the host. Finally, overexpression of LSD2 in HCV-infected hepatocytes has been demonstrated to significantly reduce viral replication.

In conclusion, we observed that the increased expression of the studied cellular and epigenetic regulatory molecules significantly affects the lipid profile of hepatocytes and consequently the progression of viral infection. The identification and characterization of such mechanisms helps to

better understand the life cycle of HCV and the pathobiology of HCV-dependent liver disease, while at the same time it can lead to the development of novel therapies.

Keywords: HCV, Lipid metabolism, Cellular regulators, Epigenetic regulators, ANGPTL-3, ANGPTL-4, LSD1, LSD2.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Ηπατίτιδα C.....	1
1.1.1	Ασθένεια της ηπατίτιδας C.....	1
1.1.2	Ιός της ηπατίτιδας C - HCV	4
1.2	Λιπίδια- Λιπιδικός Μεταβολισμός	8
1.2.1	Λιπίδια.....	8
1.2.2	Λιποπρωτεΐνες.....	9
1.2.3	Μεταβολισμός των λιπιδίων	12
1.2.4	Λιπάσες	14
1.2.5	Λιποσταγονίδια.....	15
1.3	HCV και Λιπιδικός Μεταβολισμός.....	16
1.3.1	Λιπιδικός μεταβολισμός και HCV-επαγόμενη στεάτωση	16
1.3.2	Λιποπρωτεΐνες και λιπιδική σύσταση των σωματιδίων HCV.....	17
1.3.3	Κύκλος ζωής HCV και λιπιδικός μεταβολισμός	17
1.4	Ρυθμιστές Λιπιδικού Μεταβολισμού- ANGPTL-3, ANGPTL-4	20
1.4.1	ANGPTL-3.....	21
1.4.2	ANGPTL-4.....	22
1.5	Επιγενετική Ρύθμιση του Λιπιδικού Μεταβολισμού	23
1.5.1	Επιγενετική	23
1.5.2	Επιγενετικός ρυθμιστής LSD1	24
1.5.3	Επιγενετικός ρυθμιστής LSD2	26
2	Σκοπός της μελέτης	29
3	Υλικά και Μέθοδοι	31
3.1	Κυτταροκαλλιέργειες.....	31
3.1.1	Υλικά κυτταροκαλλιέργειας.....	31
3.1.2	Κυτταροσειρές	33
3.1.3	Ανακαλλιέργεια κυττάρων	35
3.1.4	Κρυοσυντήρηση κυττάρων.....	36
3.1.5	Απόψυξη κυττάρων.....	36
3.2	Τεχνικές Μοριακής Ιολογίας.....	37
3.2.1	Μόλυνση ηπατοκυττάρων με τα εργαστηριακά στελέχη HCV-2a και HCV-3a	37
3.3	Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας.....	39
3.3.1	Απομόνωση ολικού RNA	39
3.3.2	Αντίδραση αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription - RT).....	41

3.3.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction - qPCR).	43
3.4	Τεχνικές Βιοχημείας	50
3.4.1	Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Ηπατικής Λιπάσης	50
3.4.2	Προσδιορισμός Ενδοκυττάριας Συγκέντρωσης Τριγλυκεριδίων	52
3.5	Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού	55
3.5.1	Χρώση BODIPY και Hoechst	55
4	Αποτελέσματα	57
4.1	Προσδιορισμός επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας ηπατικής λιπάσης (HL)	57
4.2	Προσδιορισμός επιπέδων ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων	58
4.2.1	Προσδιορισμός ενδογενών επιπέδων ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4) και ANGPTL-4 (G5)	58
4.2.2	Επίδραση της HCV μόλυνσης στα επίπεδα ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων των κυτταροσειρών υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4) και ANGPTL-4 (G5)	59
4.3	Παρατήρηση και ποιοτική εκτίμηση αριθμού κυτταρικών λιποσταγονιδίων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού	62
4.3.1	Παρατήρηση ενδογενών κυτταρικών λιποσταγονιδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και LSD1 (Hu1b)	62
4.3.2	Επίδραση της HCV μόλυνσης στα κυτταρικά λιποσταγονίδια των κυτταροσειρών υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και LSD1 (Hu1b)	63
4.4	Επίδραση της HCV μόλυνσης στα ενδογενή επίπεδα mRNA του επιγενετικού παράγοντα LSD2 σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα	66
4.5	Προσδιορισμός ιικού ρυθμού αναδιπλασιασμού κατά την υπερέκφραση του επιγενετικού παράγοντα LSD2 σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα	70
5	Συζήτηση	73
5.1	Μελλοντικοί Στόχοι	79
6	Βιβλιογραφία	81

1 Εισαγωγή

1.1 Ηπατίτιδα C

1.1.1 Ασθένεια της ηπατίτιδας C

Η ηπατίτιδα C είναι μια ηπατική νόσος που προκαλείται από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), ο οποίος ανακαλύφθηκε το 1989 [1]. Η μόλυνση από HCV μπορεί να προκαλέσει οξεία ηπατίτιδα, ο ορισμός της οποίας κατά σύμβαση αναφέρεται στην παρουσία κλινικών συμπτωμάτων ηπατίτιδας για περίοδο 6 μηνών ή λιγότερων μετά τον υποτιθέμενο χρόνο έκθεσης σε HCV [2]. Περίπου το 30% (15-45%) των μολυσμένων ατόμων καθαρίζει αυθόρμητα τον ιό εντός 6 μηνών από τη μόλυνση χωρίς καμία θεραπεία. Το υπόλοιπο 70% (55-85%) των ατόμων θα εμφανίσει χρόνια λοίμωξη από HCV. Από αυτούς με χρόνια λοίμωξη HCV, ο κίνδυνος κίρρωσης κυμαίνεται μεταξύ 15% και 30% εντός 20 ετών, ενώ κάθε χρόνο ένα ποσοστό 4% αυτών αναπτύσσουν ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma, HCC) [3], [4],[5]. Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρούνται και εξωηπατικά συμπτώματα προκαλούμενα από την μόλυνση HCV [6], [7], [8].

Η μόλυνση από τον ιό της χρόνιας ηπατίτιδας C (HCV) είναι πρόβλημα δημόσιας υγείας, με περίπου 71 (64-103) εκατομμύρια άτομα μολυσμένα παγκοσμίως [3], [6]. Είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας που σχετίζεται με το ήπαρ μέσω της προδιάθεσής της για ίνωση, κίρρωση και καρκίνο του ήπατος και αποτελεί την συχνότερη ένδειξη για μεταμόσχευση ήπατος στις ανεπτυγμένες χώρες [9],[5]. Κάθε χρόνο, η ηπατίτιδα C προκαλεί περίπου 399.000 θανάτους παγκοσμίως, κυρίως από κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)[3].

Σε παγκόσμιο επίπεδο ο επιπολασμός του ιού υπολογίζεται σε 1-1.5% του παγκοσμίου πληθυσμού, ωστόσο υπάρχουν πολύ μεγάλες γεωγραφικές διαφοροποιήσεις με μερικές χώρες που έχουν ιστορικό υψηλών ιατρογενών μολύνσεων να έχουν επιπολασμό άνω του 5%, όπως το Καμερούν, η Αίγυπτος, η Γεωργία κ.α.[6]. Στην Ελλάδα ο επιπολασμός του ιού υπολογίζεται σε 1.5-2% του πληθυσμού[10].

1.1.1.1 Τρόποι μετάδοσης

Ο ιός της ηπατίτιδας C είναι ένας που μεταδίδεται κυρίως μέσω του αίματος και των παραγώγων του. Συνήθως μεταδίδεται μέσω:

- χρήσης ενέσιμων ναρκωτικών από την ανταλλαγή εξοπλισμού ένεσης.
- την επαναχρησιμοποίηση ή την ανεπαρκή αποστείρωση ιατρικού εξοπλισμού, ιδίως συρίγγων και βελονών σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης.
- τη μετάγγιση αίματος και προϊόντων αίματος χωρίς έλεγχο (κυρίως πριν το 1990, καθώς από τότε ξεκίνησε ο έλεγχος του αίματος προς μετάγγιση).
- σεξουαλικές πρακτικές που οδηγούν σε έκθεση στο αίμα.

Ο HCV μπορεί επίσης να μεταδοθεί από μολυσμένη μητέρα στο μωρό της. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος μετάδοσης είναι λιγότερο συνηθισμένος. Η ηπατίτιδα C δεν μεταδίδεται μέσω μητρικού γάλακτος, τροφής, νερού ή περιστασιακής επαφής[3], [11].

1.1.1.2 Επιδημιολογία

Ο HCV είναι ένας ιός με μεγάλη γενετική ποικιλομορφία. Οι φυλογενετικές αναλύσεις των στελεχών HCV που απομονώθηκαν σε διάφορες περιοχές του κόσμου έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό επτά κύριων γονότυπων HCV, που ορίζονται ως 1-7, ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και 8^{ος} γονότυπος [12], [13]. Οι γονότυποι HCV περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό υποτύπων, που προσδιορίζονται με πεζά γράμματα (1a, 1b και ούτω καθεξής)[6]. Τα γονιδιώματα του HCV από απομονωμένα στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικούς μείζονες γονοτύπους διαφέρουν κατά 30% περίπου σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Οι υπότυποι συνήθως διαφέρουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 15% . Ο γονότυπος επηρεάζει την πορεία της νόσου και την ανταπόκριση στην αντιική θεραπεία [6],[14],[15].

1.1.1.3 Διάγνωση

Επειδή οι νέες λοιμώξεις από HCV είναι συνήθως ασυμπτωματικές, λίγα άτομα διαγιγνώσκονται όταν η λοίμωξη είναι πρόσφατη. Σε εκείνους τους ανθρώπους που συνεχίζουν και αναπτύσσουν χρόνια λοίμωξη από HCV, η λοίμωξη είναι επίσης συχνά μη διαγνώσιμη, διότι παραμένει ασυμπτωματική έως και δεκαετίες μετά τη μόλυνση, όταν πλέον αναπτύσσονται συμπτώματα λόγω της προκαλούμενης ηπατικής βλάβης.

Η λοίμωξη HCV διαγιγνώσκεται σε 2 βήματα:

1. Έλεγχος για αντισώματα κατά του HCV με ορολογική δοκιμή εντοπίζει άτομα που έχουν μολυνθεί με τον ιό.

2. Εάν το τεστ είναι θετικό για αντισώματα αντι-HCV, απαιτείται δοκιμή νουκλεϊνικού οξέος για ριβονουκλεϊκό οξύ HCV (RNA) για την επιβεβαίωση της χρόνιας λοίμωξης επειδή περίπου το 30% των ατόμων που έχουν μολυνθεί με HCV καθαρίζουν αυθόρμητα τη μόλυνση λόγω ισχυρής ανοσοαπόκρισης, χωρίς ανάγκη για θεραπεία.

Αφού ένα άτομο έχει διαγνωστεί με χρόνια λοίμωξη από HCV, θα πρέπει να αξιολογηθεί ο βαθμός ηπατικής βλάβης (ίνωση και κίρρωση) που έχει υποστεί. Αυτό μπορεί να γίνει με βιοψία ήπατος ή με ποικιλία άλλων μη επεμβατικών εξετάσεων, όπως η ελαστογραφία ήπατος (Fibroscan). Ο βαθμός ηπατικής βλάβης χρησιμοποιείται για να καθοδηγήσει τις αποφάσεις θεραπείας και τη διαχείριση της νόσου στον κάθε ασθενή [3], [11].

1.1.1.4 Θεραπεία

Η καταπολέμηση της νόσου ξεκίνησε ακόμη και πριν από την ανακάλυψη του ιού της ηπατίτιδας C το 1989, με τη χρήση ιντερφερόνης (IFN) ήδη από το 1986. Το 1998 στη θεραπεία αυτή προστέθηκε η ριμπαβιρίνη, ένας μη ειδικός αντικός παράγοντας και το 2001 στα μόρια της ιντερφερόνης προστέθηκε πολυαιθυλενογλυκόλη (πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη). Αυτές οι ουσίες ήταν μέχρι πρόσφατα η συνήθης θεραπεία κατά της λοίμωξης από HCV. Ωστόσο, από το 2014 άρχισαν να διατίθενται νέες θεραπείες που είναι πολύ αποτελεσματικές και βασίζονται στα λεγόμενα αντιικά άμεσης δράσης (direct acting antivirals, DAAs) που έχουν αναπτυχθεί μέσω ερευνητικών προσπαθειών από την ακαδημαϊκή κοινότητα και τη βιομηχανία. Αυτά τα μόρια άνοιξαν μια νέα εποχή στη θεραπεία του HCV, επιτυγχάνοντας υψηλότερα ποσοστά πλήρους ίασης για τους περισσότερους ιικούς γονότυπους, με μικρότερη διάρκεια θεραπείας και λιγότερες παρενέργειες [16]. Η θεραπεία ορίζεται ως το σημείο όπου τα επίπεδα HCV RNA στο αίμα είναι μη ανιχνεύσιμα (παρατεταμένη ιολογική απόκριση-sustained virological response, SVR) στις 12 ή 24 εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας, ανάλογα με τη παρουσία ή απουσία κίρρωσης[6]. Όπως υποδηλώνει το όνομά τους, τα DAA στοχεύουν άμεσα ικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού και συγκεκριμένα για τις NS5A, NS5B και NS3/NS4A, για τις οποίες θα γίνει εκτενής αναφορά παρακάτω. Οι ενημερωμένες οδηγίες του ΠΟΥ για το 2018 προτείνουν θεραπεία με παν-γονοτυπικά αντιικά άμεσης δράσης (DAAs)[3].

Η πρόσβαση στη θεραπεία HCV βελτιώνεται, αλλά παραμένει πολύ περιορισμένη. Το 2017, από τα 71 εκατομμύρια άτομα που ζούσαν με λοίμωξη από HCV παγκοσμίως, εκτιμάται ότι μόλις το 19% (13,1 εκατομμύρια) γνώριζε τη διάγνυσή τους, και από εκείνους που είχαν διαγνωστεί με χρόνια λοίμωξη από HCV, περίπου 5 εκατομμύρια άτομα είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με DAAs μέχρι το τέλος του 2017. Πρέπει να γίνουν πολύ περισσότερα για να επιτευχθεί ο στόχος του ΠΟΥ για θεραπείας του 80% των HCV λοιμώξεων έως το 2030 [3].

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι η λοίμωξη από HCV δεν παρέχει προστατευτική ανοσία, άτομα που έχουν καθαρίσει μια προηγούμενη λοίμωξη HCV είτε αυθόρμητα είτε μετά από θεραπεία παραμένουν σε κίνδυνο για επαναμόλυνση (reinfection). Η επαναμόλυνση ορίζεται ως η επανεμφάνιση της HCV λοίμωξης μετά από μια προηγούμενης εκκαθαρισμένη λοίμωξη [17].

1.1.2 Ιός της ηπατίτιδας C - HCV

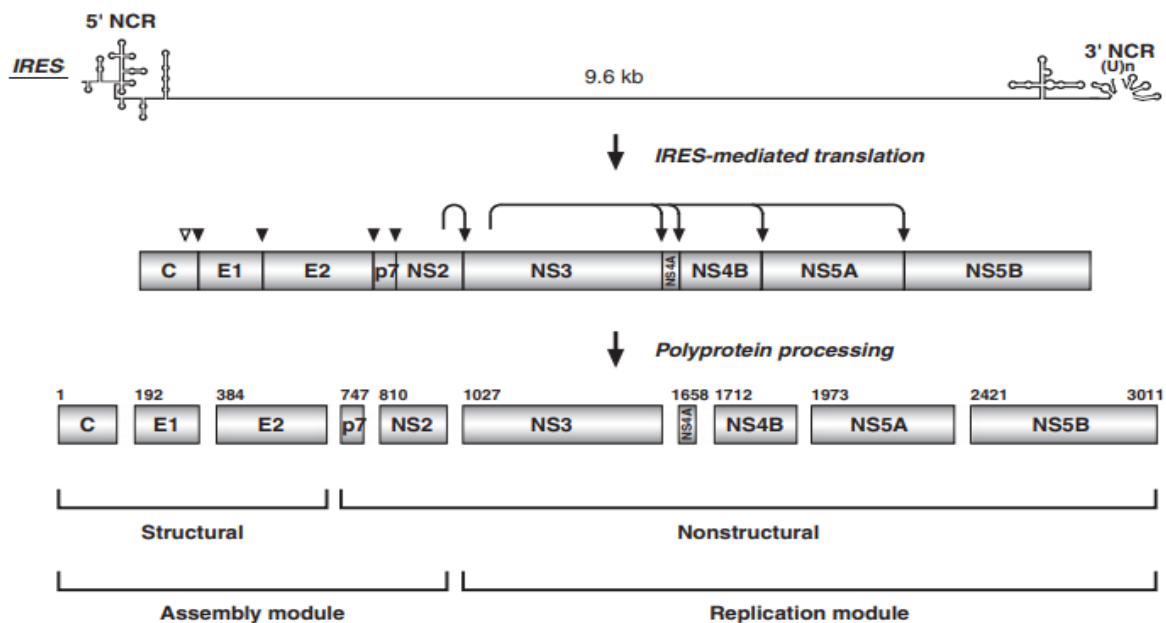
1.1.2.1 Βασικά χαρακτηριστικά του ιού της ηπατίτιδας C

Ο HCV είναι ένας RNA-ιός που ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae* και ειδικότερο στο γένος *Hepacivirus*. Ο HCV έχει ανιχνευθεί στο πλάσμα ατόμων που έχουν μολυνθεί ως σωματίδια διαμέτρου 50nm (45-65nm)[6], [8]. Το ιικό καψίδιο του περιβάλλεται από ένα φάκελο διπλοστιβάδας λιπιδίων, στον οποίο είναι ενσωματωμένες δυο γλυκοπρωτεΐνες (E1, E2). Το ιικό καψίδιο αποτελείται από πολλαπλά αντίγραφα μιας βασικής μικρής πρωτεΐνης καψιδίου της νουκλεοκαψιδιακής πρωτεΐνης (Core) του HCV και περικλείει το γονιδίωμα του ιού [6].

Το γονιδίωμα του ιού είναι ένα κυκλικό, μονόκλωνο μόριο RNA, θετικής πολικότητας, δηλαδή αυτό μπορεί να δράσει τόσο ως mRNA για την απ'ευθείας μετάφραση της αρχικής πολυπρωτεΐνης του ιού, όσο και ως εκμαγείο για την αντιγραφή του γενετικού υλικού του και έχει μέγεθος περίπου 9.6kb. Ειδικότερα, το γονιδίωμα του HCV αποτελείται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF), το οποίο πλαισιώνεται από 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (untranslated region, UTR). Οι 5' και 3' UTR φέρουν πολύ συντηρημένες αλληλουχίες RNA απαραίτητες για την μετάφραση των ιικών πολυπρωτεϊνών και την αντιγραφή του γονιδιώματος, ενώ στην 5' UTR υπάρχει μία εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (internal ribosome entry site, IRES) απαραίτητη στην ιική μετάφραση [18],[19],[20].

Όσον αφορά το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), κωδικοποιεί μια ενιαία πολυπρωτεΐνη περίπου 3.000 αμινοξέων η οποία υποβάλλεται σε επεξεργασία κατά τη διάρκεια και μετά τη μετάφραση από

κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου και από την οποία προκύπτουν 10 ώριμες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε δομικές και μη-δομικές (Εικόνα 1.1-1). Οι δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν το ιικό σωματίδιο, περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη core και τις γλυκοπρωτεΐνες περιβλήματος E1 και E2. Οι μη δομικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν την p7, την NS2 πρωτεάση, το σύμπλοκο NS3-4A που δρα σαν πρωτεάση αλλά και NTPase/RNA ελικάση, τις πρωτεΐνες NS4B και NS5A, και την NS5B RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση [6], [11], [18], [19]. Οι ιικές πρωτεΐνες NS3 έως και NS5B εμπλέκονται στον ιικό αναδιπλασιασμό και αποτελούν στόχους των θεραπειών DAAs.



Εικόνα 1.1-1 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C. Μέσω της IRES-διαμεσολαβούμενης μετάφρασης και επεξεργασίας του γονιδιώματος προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη ~3000 αμινοξέων. Στη συνέχεια μέσω πρωτεολύσεων της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι ιικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν διάφορους ρόλους στην αναπαραγωγή του ιού (D. Moradpour and F. Penin, "Hepatitis C virus proteins: From structure to function," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 113–142, 2013).

1.1.2.2 Κύκλος ζωής HCV

Ο κύκλος ζωής του HCV δεν είναι ακόμα κατανοητός στην πληρότητα του. Οι δυσκολίες στην καθιέρωση ενός *in vitro* μοντέλου αντιγραφής και το πολύπλοκο δίκτυο επιφανειακών μορίων του κυττάρου που συμμετέχουν στην είσοδο του ιού καθυστέρησαν την κατανόηση διαφόρων μοριακών μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων ιού-ξενιστή [21].

Τα επτά βήματα του κύκλου ζωής του ιού, είναι τα ακόλουθα(Εικόνα 1.1-2):

I. Προσκόλληση (Attachment): Το ιικό σωματίδιο, περιτριγυρισμένο με λιποπρωτεΐνες, δεσμεύεται στα κύτταρα στόχους αλληλεπιδρώντας με αρκετούς υποδοχείς (LDLr, HSPGs, SRB1, CD81) οι περισσότεροι από τους οποίους φαίνονται στην Εικόνα 1.1-2. Στο στάδιο της προσκόλλησης συμμετέχουν οι μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του HCV, E1 και E2 [21],[22].

II. Είσοδος/Ενδοκύτωση (Entry/Endocytosis): Μετά την προσκόλληση του ιοσωμάτιου στην επιφάνεια ενός ηπατοκύτταρου, ο ιός εισέρχεται στο ηπατοκύτταρο μέσω ενδοκυττάρωσης που προκαλείται από την κλαθρίνη[22].

III. Απέκδυση καψιδίου (Uncoating): Στη συνέχεια οι κυτταρικές μεμβράνες του ενδοσώματος και εκείνες του ιού συντήκονται και το καψίδιο διασπάται με μια διαδικασία που προκαλείται από το χαμηλό pH του ενδοσώματος. Μετά την σύντηξη των μεμβρανών, το RNA γονιδίωμα του HCV απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα προκειμένου να μεταφραστεί και να αντιγραφεί [23].

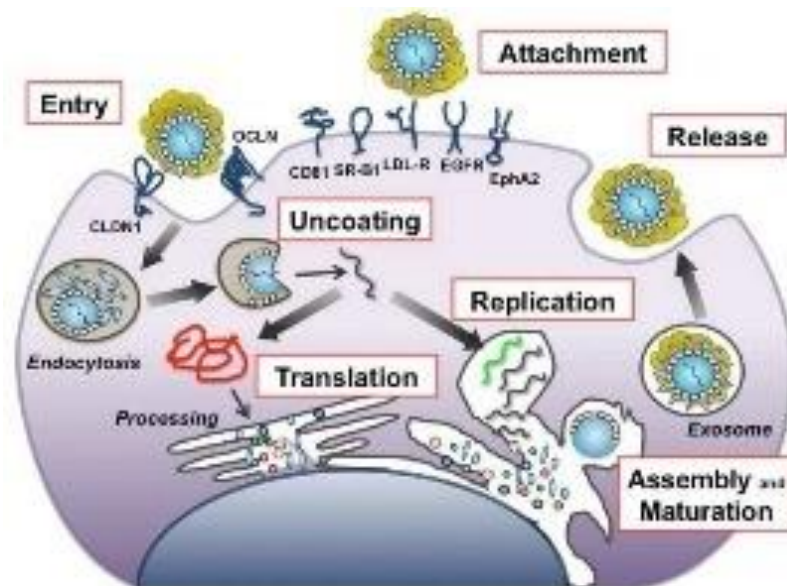
IV. Μετάφραση (Translation): Η διαδικασία της μετάφρασης της πολύπρωτεΐνης HCV ξεκινά όταν οι ριβοσωμικές υπομονάδες συνδέονται στο IRES του HCV RNA στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο. Ύστερα ξεκινά η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης στις επιμέρους πρωτεΐνες. Αρχικά, οι κυτταρικές πρωτεάσες διασπούν τις δομικές πρωτεΐνες, E1, E2 και p7. Στη συνέχεια, η πρωτεάση κυστεΐνης NS2, σε συνδυασμό με το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης NS3, διασπά την NS2 από την NS3. Τέλος, η NS3, υποβοηθούμενη από τη δεσμευμένη στη μεμβράνη NS4A, σχηματίζει ένα σύμπλοκο πρωτεάσης NS3-4A που διασπά τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Το τελικό αποτέλεσμα είναι 10 ώριμες πρωτεΐνες HCV, συμπεριλαμβανομένων δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών [21], [23].

V. Αντιγραφή (Replication): Αρκετές πρωτεΐνες HCV, πιθανώς σε συνδυασμό με παράγοντες του ξενιστή, προκαλούν αναδιάταξη των μεμβρανών του κυττάρου-ξενιστή για να σχηματίσουν έναν μεμβρανώδη ιστό, ο οποίος αποτελεί ένα συσσωμάτωμα κυστιδίων διπλής μεμβράνης λιπιδίων. Σ' αυτό το μεμβρανώδη ιστό, η NS5B RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση καταλύει τη σύνθεση ενός ενδιάμεσου RNA αρνητικής πολικότητας (μήτρα) που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πολυάριθμων αντιγράφων HCV RNA θετικής πολικότητας. Αυτά τα νεοσυντιθέμενα αντίγραφα του HCV RNA είτε πακετάρονται για σχηματισμό νέων ιικών καψιδίων, είτε χρησιμοποιούνται για μετάφραση και αντιγραφή όπως περιγράφεται παραπάνω [6], [23], [24].

VI. Συναρμολόγηση και ωρίμανση (Assembly and Maturation): Η συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, ακόμα δεν έχει είναι πλήρως κατανοητή, καθώς τα εργαστηριακά κυτταρικά μοντέλα δεν αποδίδουν όλες τις αλληλεπιδράσεις με τον λιπιδικό μεταβολισμό του ήπατος και τα παραγόμενα σωματίδια διαφέρουν σε σημαντικό βαθμό από αυτά που συναντώνται σε ασθενείς. Η συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων πραγματοποιείται δίπλα σε λιποσταγονίδια (lipid droplets), οργανίδια αποθήκευσης κυτταροπλασματικών λιπιδίων, όπου με την βοήθεια πρωτεϊνών του

κυττάρου ξενιστή σχηματίζεται το καψίδιο από την ιική πρωτεΐνη Core, περιβάλλοντας το HCV RNA, χρησιμοποιώντας το παράλληλα σαν μήτρα. Στη συνέχεια τα ιικά καψίδια εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο αποκτώντας έναν φάκελο με ετεροδιμερή E1/E2 ιικών γλυκοπρωτεϊνών. Ακολουθεί αμέσως η ωρίμανση και η σύνδεση με ενδογενείς λιποπρωτεΐνες για το σχηματισμό λιποϊκών σωματιδίων [21], [23], [25].

VII. Απελευθέρωση (Release/Egress): Η λιπιδική σύνθεση των λιποϊκών σωματιδίων (lipovirions, LVPs) HCV μοιάζει με εκείνη των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoprotein, VLDL), οπότε εικάζεται πως ο σχηματισμός και η απελευθέρωση των HCV σωματιδίων χρησιμοποιούν το εκκριτικό μονοπάτι των VLDLs για να εξέλθουν από το κύτταρο χωρίς να προκαλέσουν την λύση του [21], [25].



Εικόνα 1.1-2 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού της ηπατίτιδας C. Ο κύκλος ζωής του HCV είναι όμοιος με αυτό όλων των μελών της οικογένειας *Flaviviridae*. *Entry*: Αρχικά, το ιικό σωματίδιο αλληλεπιδρά με υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου και υπόκειται σε ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης. *Uncoating & Translation*: Μετά από σύντηξη των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου με τη μεμβράνη, το ιικό γονιδίωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται στα ριβοσώματα, παράγοντας μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη. Η πολυπρωτεΐνη έπειτα πρωτεολύεται σε 10 ώριμες πρωτεΐνες που συνδέονται σε μια μεμβρανική δομή η οποία μοιάζει με το ενδοπλασματικό δίκτυο αλλά παράγεται από τον ιό και ονομάζεται μεμβρανώδες δίκτυο. *Replication*: Οι ώριμες πρωτεΐνες του HCV αντιγράφουν το γονιδιωματικό RNA μέσω ενός αντιγραφικού ενδιάμεσου μορίου αρνητικής πολικότητας για την παραγωγή απογόνων-θυγατρικών μορίων RNA. *Assembly*: Ένα μέρος από αυτά τα παραχθέντα μόρια πακετάρεται σε νουκλεοκαψίδια και συνδέονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του HCV, σχηματίζοντας νέα ιικά σωματίδια που εκβλαστάνουν στο κυτταρόπλασμα. *Release*: Τα ιικά σωματίδια τέλος, ακολουθούν το κυτταρικό εκκριτικό μονοπάτι και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο (Πηγή: L. B. Dustin, B. Bartolini, M. R. Capobianchi, and M. Pistello, "Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 10. Elsevier B.V., pp. 826–832, 01-Oct-2016).

1.2 Λιπίδια- Λιπιδικός Μεταβολισμός

1.2.1 Λιπίδια

Τα λιπίδια είναι κατηγορία οργανικών ενώσεων των ζωικών και φυτικών οργανισμών που έχουν κοινό χαρακτηριστικό ότι είναι αδιάλυτα στο νερό αλλά διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες με μικρή πολικότητα[26]. Οι χημικές δομές των ενώσεων που ανήκουν στα λιπίδια διαφέρουν σημαντικά. Οι κυριότερες κατηγορίες λιπιδίων είναι τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια, τα σφιγγογλυκολιπίδια και οι στερόλες[27]. Τα λιπίδια έχουν ορισμένες πολύ βασικές βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και του οργανισμού, όπως η αποθήκευση ενέργειας, η χρήση τους σαν δομικό υλικό στις κυτταρικές μεμβράνες (φωσφολιπίδια, χοληστερόλη) και ως διαβιβαστές μηνυμάτων καθώς οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπίδια που χρησιμοποιούν οι οργανισμοί για διαβίβαση μηνυμάτων[28][29].

Η πλειονότητα των λιπιδίων είναι παράγωγα των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα είναι γραμμικά αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα που βιοσυνθέτουν οι οργανισμοί. Πάντα έχουν ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα που κυμαίνεται από 12 έως 20 άτομα και αυτό οφείλεται στον μηχανισμό βιοσύνθεσης. Διακρίνονται σε κορεσμένα και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχουν έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς κυρίως με *cis* και σπάνια με *trans* γεωμετρία[27], [30].

Τα τριγλυκερίδια (triglycerides, TGs) σχηματίζονται συνδυάζοντας γλυκερόλη με τρία μόρια λιπαρών οξέων. Τα TGs, ως κύρια συστατικά της πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (VLDL) και των χυλομικρών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό. Η σύνθεση και η αποθήκευση των TGs συντελείται κυρίως στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό[29], [31].

Τα φωσφολιπίδια είναι TGs, τα οποία είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με μια φωσφορική ομάδα μέσω ενός εστερικού δεσμού. Τα φωσφολιπίδια εκτελούν σημαντικές λειτουργίες, περιλαμβανομένης της ρύθμισης της διαπερατότητας της μεμβράνης και της διατήρησης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Συμμετέχουν στον μηχανισμό της μεταφοράς της χοληστερόλης και βοηθούν στην αποβολή της από το σώμα[29], [30].

Η χοληστερόλη είναι ένα δομικό στοιχείο της κυτταρικής μεμβράνης, όπου απαιτείται για την κατάλληλη διαπερατότητα και ρευστότητα της. Επιπλέον, η χοληστερόλη είναι ένα σημαντικό συστατικό για την παραγωγή χολικών οξέων, στεροειδών ορμονών και βιταμίνης D. Αν και η χοληστερόλη είναι ένα σημαντικό και απαραίτητο μόριο, τα υψηλά επίπεδα της στον ορό του αίματος

είναι ένας δείκτης για ασθένειες όπως οι καρδιακές παθήσεις. Το 20- 25% της συνολικής ημερήσιας χοληστερόλης παράγεται στο ήπαρ[27], [30].

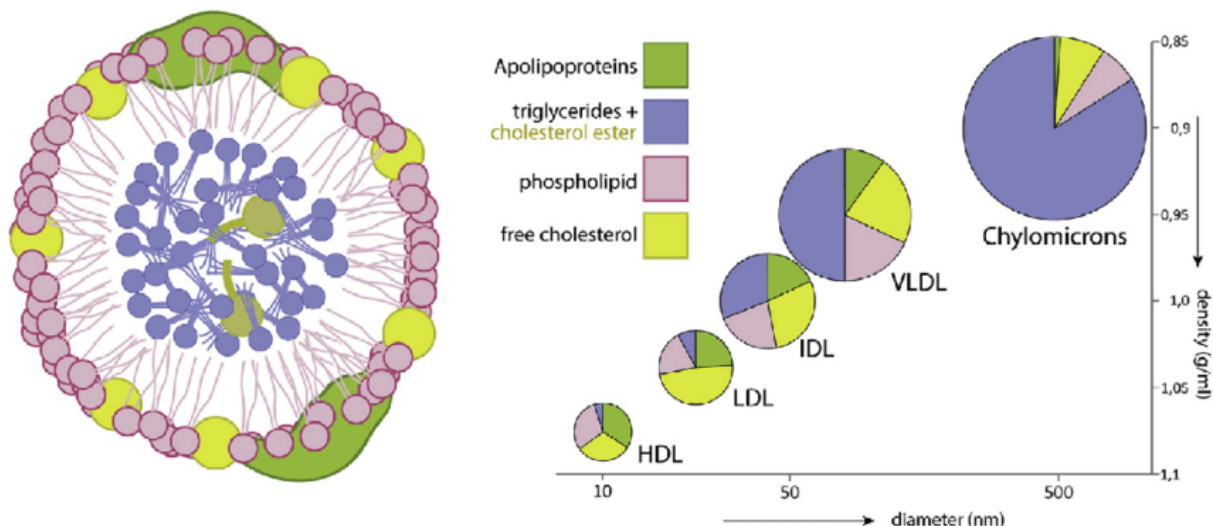
Δεδομένου ότι τα λιπίδια αποτελούν μη υδατοδιαλυτά μόρια και δεν είναι δυνατό να κυκλοφορήσουν από μόνα τους στο πλάσμα του αίματος, το οποίο είναι υδατικό διάλυμα, διακινούνται εντός του ανθρωπίνου οργανισμού μέσα από την κυκλοφορία του αίματος δεσμευμένα στις λιποπρωτεΐνες [27], [31].

1.2.2 Λιποπρωτεΐνες

Οι λιποπρωτεΐνες είναι σύμπλοκα, που αποτελούνται από πρωτεΐνες, πολικά λιπίδια και τριγλυκερίδια (Εικόνα 1.2-1). Οι πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελούνται, ονομάζονται αποπρωτεΐνες ή απολιποπρωτεΐνες και περιλαμβάνουν τις κύριες ομάδες πρωτεϊνών Apo-A, Apo-B, Apo-C, Apo-D και Apo-E[26].

Οι λιποπρωτεΐνες είναι σύνθετα σωματίδια σφαιρικού σχήματος που έχουν έναν κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα μη πολικών λιπιδίων, κυρίως χολυστερυλεστέρες και τριγλυκερίδια. Αυτός ο υδρόφοβος πυρήνας περιβάλλεται από μια υδρόφιλη μεμβράνη που αποτελείται από φωσφολιπίδια, ελεύθερη χοληστερόλη και απολιποπρωτεΐνες[32]. Οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση το μέγεθος, τη σύνθεση λιπιδίων και τις απολιποπρωτεΐνες που περιέχουν και οι κύριες κατηγορίες λιποπρωτεϊνών που προκύπτουν από αυτόν τον διαχωρισμό είναι τα χυλομικρά (chylomicrons), υπολείμματα χυλομικρών (chylomicron remnants) οι πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (very low density lipoprotein, VLDL), οι ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (intermediate-density lipoprotein, IDL), οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low-density lipoprotein, LDL) και οι υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (high-density lipoprotein, HDL) (Εικόνα 1.2-1) [30], [32].

Χυλομικρά (chylomicrons): Αυτά είναι μεγάλα, πλούσια σε τριγλυκερίδια σωματίδια που παράγονται από το έντερο, τα οποία εμπλέκονται στη μεταφορά των διαιτητικών τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στους περιφερειακούς ιστούς και στο ήπαρ. Αυτά τα σωματίδια περιέχουν απολιποπρωτεΐνες AI, A-II, A-IV, B-48, C-II, C-III και E. Η apo B-48 είναι η βασική δομική πρωτεΐνη και κάθε χυλομικρό περιέχει ένα apo B-48 μόριο. Το μέγεθος των χυλομικρών ποικίλλει ανάλογα με την ποσότητα λίπους που καταναλώνεται. Ένα γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οδηγεί στο σχηματισμό μεγάλων σωματιδίων χυλομικρών λόγω της αυξημένης ποσότητας τριγλυκεριδίων που μεταφέρεται ενώ στην κατάσταση νηστείας τα σωματίδια χυλομικρών είναι μικρότερα καθώς φέρουν μειωμένες ποσότητες τριγλυκεριδίων[33].



Εικόνα 1.2-1 Σύνθεση και κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες των κύριων κατηγοριών λιποπρωτεϊνών. Αριστερά: Το εξωτερικό κέλυφος των λιποπρωτεϊνών αποτελείται από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, σε συνδυασμό με απολιποπρωτεΐνες, τα οποία ορίζουν τον τύπο, τη λειτουργία και / ή τον προορισμό της λιποπρωτεΐνης. Τα υδρόφοβα λιπίδια (τριγλυκερίδια, εστέρες χοληστερόλης) βρίσκονται στον πυρήνα της λιποπρωτεΐνης. Οι λιποπρωτεΐνες ταξινομούνται ανάλογα με το μέγεθος, την πυκνότητα και τη σύνθεσή τους σε HDL, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, LDL, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη, IDL, ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη; VLDL, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (Πηγή: E. M. van Leeuwen et al., "A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration," Progress in Retinal and Eye Research, vol. 67. Elsevier Ltd, pp. 56–86, 01-Nov-2018).

Υπολείμματα χυλομικρών (chylomicron remnants): Η απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων από τα χυλομικρά από περιφερειακούς ιστούς οδηγεί σε μικρότερα σωματίδια που ονομάζονται υπολείμματα χυλομικρών. Σε σύγκριση με τα χυλομικρά, αυτά τα σωματίδια είναι εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη και είναι προ-αθηρογόνα[32].

Λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL): Αυτά τα σωματίδια παράγονται από το ήπαρ και είναι πλούσια σε τριγλυκερίδια, μεταφέροντας τα σε περιφερειακούς ιστούς. Περιέχουν απολιποπρωτεΐνη B-100, C-I, C-II, C-III και E. Η Apo B-100 είναι η βασική δομική πρωτεΐνη και κάθε σωματίδιο VLDL περιέχει ένα μόριο Apo B-100. Η VLDL είναι ο τρόπος με τον οποίο το ήπαρ εξαγάγει περίσσεια τριγλυκεριδίων που προέρχονται από ελεύθερα λιπαρά οξέα του πλάσματος και υπολείμματα χυλομικρών. Παρόμοια με τα χυλομικρά, το μέγεθος των σωματιδίων VLDL μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα τριγλυκεριδίων που μεταφέρεται στο σωματίδιο. Όταν αυξάνεται η παραγωγή τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, τα εκκρινόμενα σωματίδια VLDL είναι μεγάλα. Ωστόσο, τα σωματίδια VLDL είναι μικρότερα από τα χυλομικρά[32], [33].

Λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (IDL): Η απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων από τη VLDL με την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (lipoprotein lipase, LPL) οδηγεί στο σχηματισμό σωματιδίων

IDL τα οποία είναι εμπλουτισμένα σε χοληστερόλη. Αυτά τα σωματίδια περιέχουν κυρίως απολιποπρωτεΐνη B-100 και E. Αυτά τα σωματίδια IDL είναι προ-αθηρογόνα [32], [33].

Πίνακας 1.2-1 Σύνθεση και κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες των κύριων κατηγοριών λιποπρωτεϊνών.

Λιποπρωτεΐνες	Πυκνότητα (g/ml)	Μέγεθος (nm)	Κύρια λιπίδια	Κύριες απολιποπρωτεΐνες
Χυλομικρά	<0.930	75-1200	Τριγλυκερίδια	Απο Β-48, Απο C, Απο E, Απο Α-I, Α-II, Α-IV
Υπολείμματα χυλομικρών	0.930- 1.006	30-80	Τριγλυκερίδια Χοληστερόλη	Απο Β-48, Απο E
VLDL	0.930- 1.006	30-80	Τριγλυκερίδια	Απο Β-100, Απο E, Απο C
IDL	1.006- 1.019	25-35	Τριγλυκερίδια Χοληστερόλη	Απο Β-100, Απο E, Απο C
LDL	1.019- 1.063	18- 25	Χοληστερόλη	Απο Β-100
HDL	1.063- 1.210	5- 12	Χοληστερόλη Φωσφολιπίδια	Απο Α-I, Απο Α-II, Απο C, Απο E

Λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (**LDL**): Αυτά τα σωματίδια είναι τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των VLDL και IDL και είναι τα πιο πλούσια σε χοληστερόλη (~60%) όλων των

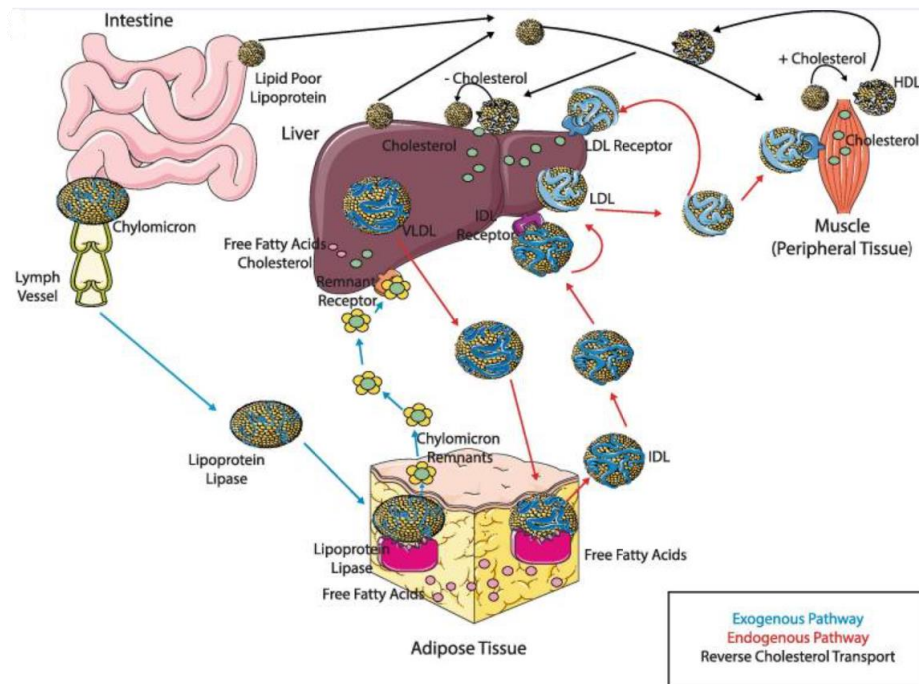
λιποπρωτεϊνών. Η LDL μεταφέρει το μεγαλύτερο μέρος της χοληστερόλης που βρίσκεται στην κυκλοφορία. Η κυρίαρχη απολιποπρωτεΐνη είναι η Β-100 και κάθε σωματίδιο LDL περιέχει ένα μόριο Β-100. Περίπου το 40 έως 60% του συνόλου της LDL εκκαθαρίζεται από το ήπαρ σε μια διαδικασία που μεσολαβεί από υποδοχείς Β και ηπατικού υποδοχέα LDL (LDLr, low density lipoprotein receptor). Τα υπόλοιπα παραλαμβάνονται είτε από ηπατικούς LDL είτε από μη ηπατικούς μη-LDL υποδοχείς. Το μέγεθος των σωματιδίων LDL κυμαίνεται από μεγάλο και σχετικά αραιό σε μικρό και πυκνό. Το μικρό, πυκνό σωματίδιο LDL είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε χοληστερουλεστέρες και σχετίζεται με μεταβολικές διαταραχές όπως η υπερτριγλυκεριδαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη[30], [32].

Λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (**HDL**): Είναι λιποπρωτεΐνες χωρίς χοληστερόλη που συντίθενται τόσο στα εντεροκύτταρα όσο και στο ήπαρ. Στα σωματίδια αυτά εντοπίζονται οι απολιποπρωτεΐνες A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III και E. Η Α-Ι είναι η βασική δομική πρωτεΐνη και κάθε σωματίδιο HDL μπορεί να περιέχει πολλαπλά μόρια Α-Ι. Τα σωματίδια HDL είναι πολύ ετερογενή και μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την πυκνότητα, του μεγέθους, του φορτίου ή της σύνθεσης απολιποπρωτεϊνών. Ο μεταβολισμός των HDL είναι πολύπλοκος, αλλά ένας σημαντικός ρόλος της HDL είναι η απομάκρυνση χοληστερόλης από περιφερειακούς ιστούς και άλλες λιποπρωτεΐνες και η μεταφορά της στο σημείο που χρειάζεται περισσότερο (άλλα κύτταρα, άλλες λιποπρωτεΐνες). Συνολικά αποτελεί έναν αντι-αθηρογονικό παράγοντα[32], [34].

1.2.3 Μεταβολισμός των λιπιδίων

Η κύρια λειτουργία του μεταβολισμού των λιπιδίων είναι η παροχή λιπιδίων σε περιφερικούς ιστούς για χρήση ή η επιστροφή λιπιδίων στο ήπαρ για ανακύκλωση ή κάθαρση (Εικόνα 1.2-2). Υπάρχουν 3 κύριες οδοί του μεταβολισμού των λιπιδίων: εξωγενής, ενδογενής και αντίστροφης χοληστερόλης[35][36].

Η εξωγενής οδός λιπιδικού μεταβολισμού (exogenous pathway) ξεκινά με την ενσωμάτωση διαιτητικών λιπιδίων, το 95% των οποίων είναι τριγλυκερίδια, σε χυλομικρά στο έντερο. Στη συνέχεια τα χυλομικρά περνούν από τα εντεροκύτταρα στο λεμφικό σύστημα και από εκεί στην κυκλοφορία του αίματος. Μέσω αυτής, τα τριγλυκερίδια που φέρονται σε χυλομικρά μεταβολίζονται στους μυς και τον λιπώδη ιστό από λιποπρωτεϊνικές λιπάσες, απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία στη συνέχεια μεταβολίζονται και αυτά από τον μυϊκό και λιπώδη ιστό, ενώ παράλληλα σχηματίζονται τα υπολείμματα χυλομικρών. Τα υπολείμματα χυλομικρών λαμβάνονται μετέπειτα από το ήπαρ[33], [37].



Εικόνα 1.2-2 Οι τρεις οδοί του μεταβολισμού των λιπιδίων είναι η εξωγενής οδός (μπλε), η ενδογενής οδός (κόκκινη) και η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (μαύρο). Στην εξωγενή οδό, τα χυλομικρά από το έντερο απελευθερώνονται στο λεμφικό σύστημα και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια στον λιπώδη ιστό. Εδώ, μέσω της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης αποικοδομούνται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και υπολείμματα χυλομικρών που επιστρέφουν στην κυκλοφορία και στη συνέχεια εισέρχονται στο ήπαρ για να αποικοδομηθούν στη συνέχεια σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη. Στην ενδογενή οδό, οι VLDL εξάγονται από το ήπαρ στην κυκλοφορία και τον λιπώδη ιστό όπου αποικοδομούνται ξανά μέσω της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και IDL, τα οποία στη συνέχεια δεσμεύουν τον υποδοχέα IDL που μετατρέπει τις IDL σε LDL. Στη συνέχεια, οι LDL συνδέονται με τον υποδοχέα LDL παρέχοντας χοληστερόλη σε περιφερειακούς ιστούς και επιστρέφοντας στο ήπαρ. Στην οδό αντίστροφης χοληστερόλης, η περίσσεια χοληστερόλης επιστρέφεται μέσω HDL στο ήπαρ για να απεκκριθεί στη χολή (Πηγή: A. Remmerie and C. L. Scott, "Macrophages and lipid metabolism," Cell. Immunol., vol. 330, pp. 27–42, Aug. 2018).

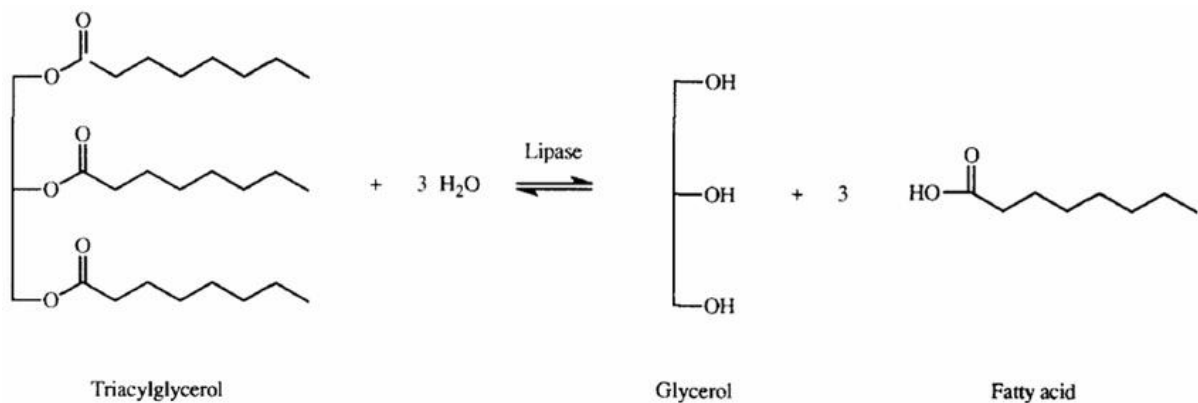
Η οδός ενδογενούς λιπιδικού μεταβολισμού (endogenous pathway) ξεκινά στο ήπαρ με το σχηματισμό των VLDL. Τα τριγλυκερίδια που φέρονται σε VLDL μεταβολίζονται στους μύς και τον λιπώδη ιστό από λιποπρωτεϊνικές λιπάσες, απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα και έτσι σχηματίζονται IDL. Οι IDL μεταβολίζονται περαιτέρω σε LDL, τα οποία λαμβάνονται μέσω του υποδοχέα LDL σε πολλούς περιφερειακούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, της κυρίαρχης θέσης πρόσληψής τους [32], [33].

Η αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης (RCT – Reverse Cholesterol Transport) ξεκινά με το σχηματισμό νέων σωματιδίων HDL από το ήπαρ και το έντερο. Αυτά τα μικρά σωματίδια HDL μπορούν στη συνέχεια να αποκτήσουν χοληστερόλη και φωσφολιπίδια που εκκρέουν από τα κύτταρα, μια διαδικασία που κατευθύνεται από τον μεταφορέα ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ώριμης HDL. Οι ώριμες HDLs μπορούν να αποκτήσουν επιπρόσθετη

χοληστερόλη από κύτταρα μέσω του μεταφορέα ABCG1(ATP-binding cassette transporter G1), του υποδοχέα SR-B1 (scavenger receptor B1) ή παθητικής διάχυσης. Στη συνέχεια, η HDL μεταφέρει τη χοληστερόλη στο ήπαρ είτε απευθείας αλληλεπιδρώντας με τον ηπατικό υποδοχέα SR-B1 είτε έμμεσα μεταφέροντας τη χοληστερόλη σε VLDL ή LDL, μια διαδικασία που διευκολύνεται από το ένζυμο CETP (cholesterylester transfer protein). Η εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού σε HDL παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης[33], [36].

1.2.4 Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων που διασπούν τα τριγλυκερίδια σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη, υδρολύοντας τον εστερικό δεσμό και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά λιπιδίων. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι λιπασών όπως η ηπατική λιπάση που βρίσκεται στο ήπαρ, η ορμονοευαίσθητη λιπάση που βρίσκεται στα λιποκύτταρα, η λιποπρωτεϊνική λιπάση που βρίσκεται στην αγγειακή ενδοθηλιακή επιφάνεια και στα μακροφάγα κύτταρα του ανοσοποιητικού και η παγκρεατική λιπάση που βρίσκεται στο λεπτό έντερο· καθεμία από αυτές εξυπηρετεί μεμονωμένες λειτουργίες. Στη συνέχεια αναφέρονται ειδικότερες πληροφορίες για την λιποπρωτεϊνική και την ηπατική λιπάση[38].



Εικόνα 1.2-3 Ενζυματική αντίδραση λιπάσης, όπου καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε μόρια γλυκερόλης και λιπαρά οξέα (Πηγή: A. Messaoudi, H. Belguith, I. Gram, and J. Ben Hamida, "Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis," *African J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 48, pp. 8243–8247, 2010).

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) είναι ένα εξωκυτταρικό ένζυμο και βρίσκεται στην αγγειακή ενδοθηλιακή επιφάνεια, αγκυστωμένη στα τριχοειδή τοιχώματα. Βρίσκεται κυρίως στον λιπώδη ιστό, στους μύς και στον καρδιακό ιστό αλλά δεν υπάρχει στο ήπαρ, καθώς το ήπαρ έχει ηπατική λιπάση. Επίσης, υπάρχει και η μακροφαγική λιποπρωτεϊνική λιπάση, η οποία εκφράζεται κατά τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα και έχει ιδιαίτερα αθηρωματική δράση[39]. Αυτό

το ένζυμο υδρολύει τα τριγλυκερίδια που μεταφέρονται σε χυλομικρά και VLDL σε λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να προσληφθούν από κύτταρα. Ο καταβολισμός των τριγλυκεριδίων έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των χυλομικρών σε υπολείμματα χυλομικρών και της VLDL σε IDL. Η apo C-II λειτουργεί ως συμπαράγοντα της LPL[39], [40].

Η ηπατική λιπάση (hepatic lipase, HL ή HTGL ή LIPC) εντοπίζεται στην επιφάνεια των ηπατικών κυττάρων. Η HL προκαλεί την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων σε IDL και LDL οδηγώντας σε μικρότερα σωματίδια (η IDL μετατρέπεται σε LDL, η LDL μετατρέπεται από τη μεγάλη LDL σε μικρή LDL). Μεσολαβεί επίσης στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων σε HDL με αποτέλεσμα μικρότερα σωματίδια HDL[34], [38].

1.2.5 Λιποσταγονίδια

Τα λιποσταγονίδια ή σταγονίδια λιπιδίων (lipid droplets, LDs) είναι οργανίδια που σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), τα οποία αποθηκεύουν και ρυθμίζουν λιπαρά οξέα και ουδέτερα λιπίδια [41]. Η παρουσία των λιποσταγονιδίων μετατρέπει ουσιαστικά το κύτταρο σε ένα γαλάκτωμα, όπου εκείνα αποτελούν τη φάση των αδιάλυτων σταγονιδίων ελαίου διασκορπισμένων σε υδατικό κυτταρόπλασμα[42]. Σε σύγκριση με άλλα κυτταρικά οργανίδια με μεμβράνες διπλής στιβάδας, η δομή των LDs είναι μάλλον μοναδική, εφόσον περιέχει έναν υδρόφοβο πυρήνα και ένα μόνο στρώμα αμφιφιλικών φωσφολιπιδίων. Ο ουδέτερος λιπιδικός πυρήνας περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια και χοληστερυλεστέρες. Αν και η σύνθεση της φωσφολιπιδικής μονοστιβάδας ποικίλλει σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, η φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (phosphatidylethanolamine, PE) είναι τα δύο κύρια φωσφολιπίδια. Η μορφολογία και η κατανάλωση των LD μεταβάλλονται δραστικά από τη σύνθεση της φωσφολιπιδικής μονοστιβάδας. Πάνω στην επιφάνεια αυτής της μονοστιβάδας εντοπίζονται διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων λιπολυτικών ενζύμων όπως ορμονοευαίσθητων λιπασών, λιπάσης τριγλυκεριδίων λιπώδους ιστού και πρωτεΐνες της PAT (protein acetyl transferase) οικογένειας (περιλιπίνη-perilipin, αντιποφιλίνη-adipophilin και TIP47). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν σε σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων σε διαφορετικούς οργανισμούς, οι LDs είναι εξαιρετικά ετερογενείς και εμφανίζουν ποικιλία όσον αφορά τον αριθμό και το μέγεθος τους το οποίο κυμαίνεται από 100 nm έως 100 μm σε διάμετρο. Ακόμα και εντός του ίδιου κυττάρου, οι LDs επεκτείνονται ή συρρικνώνονται ως απόκριση σε κυτταρικά σήματα[41].

1.3 HCV και Λιπιδικός Μεταβολισμός

1.3.1 Λιπιδικός μεταβολισμός και HCV-επαγόμενη στεάτωση

Η ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων καλλιέργειας κυττάρων στα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόλυνση από τον HCV και στη συνέχεια παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων, επέτρεψε την μελέτη και την ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιού και ξενιστή[43],[44]. Ο μοριακός και κυτταρικός χαρακτηρισμός της λοίμωξης HCV ανέδειξε γρήγορα τη στενή αλληλεπίδραση μεταξύ του HCV και του μεταβολισμού των λιπιδίων. Ειδικότερα η εξάρτηση του HCV για την αντιγραφή, την συναρμολόγηση και την έκκριση του από τα λιπιδικά μεταβολικά μονοπάτια του κυττάρου ξενιστή απαιτεί την τροποποίηση τους από τον HCV προκειμένου να δημιουργηθεί ένα ενδοκυτταρικό περιβάλλον πλούσιο σε λιπίδια, ευνοϊκό για τον πολλαπλασιασμό του ιού[45]. Ο HCV είναι μοναδικός ως προς την ικανότητά του να χρησιμοποιεί έξυπνα το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών του ξενιστή για να ολοκληρώσει τα διαφορετικά βήματα του κύκλου ζωής του, βοηθώντας παράλληλα στην διαφυγή του από το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο HCV επηρεάζει το μεταβολισμό των λιπιδίων του ξενιστή σε τρία βασικά επίπεδα: αύξηση της λιπογένεσης, μείωση αποδόμησης (καταβολισμού) λιπιδίων και μείωση εξαγωγή τους από το κύτταρο. Αυτές οι επιζήμιες μεταβολές στον μεταβολισμό των λιπιδίων που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από HCV αποτελούν την παθολογική βάση για ορισμένες από τις ασθένειες που σχετίζονται με τον HCV, ιδίως τη στεάτωση και τα μεταβολικά σύνδρομα, συμπεριλαμβανομένης της αντίστασης στην ινσουλίνη, της παχυσαρκίας και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος[46], [47].

Η στεάτωση του ήπατος (λιπώδες ήπαρ), δηλαδή η συσσώρευση ηπατοκυτταρικών λιποσταγονιδίων, είναι ο κυρίαρχος ιστολογικός φαινότυπος λοίμωξης HCV που εμφανίζεται στο 73% των ασθενών που έχουν μολυνθεί με γονότυπο 3 και στο 50% των ασθενών που έχουν μολυνθεί με άλλους γονότυπους. Η στεάτωση φαίνεται να είναι άμεση συνέπεια της έκφρασης των ιικών πρωτεϊνών στη μόλυνση του γονότυπου 3, ενώ σε λοιμώξεις από άλλους γονότυπους του HCV προϋπάρχον μεταβολικό σύνδρομο και οι εκφάνσεις του, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και η παχυσαρκία υποβοηθούν την ανάπτυξη ηπατικής στεάτωσης. Ωστόσο, η σχετιζόμενη με τον HCV ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων του ξενιστή δεν φαίνεται να είναι εξαρτώμενη από τον ιικό γονότυπο[45].

1.3.2 Λιποπρωτεΐνες και λιπιδική σύσταση των σωματιδίων HCV

Ο βιοφυσικός χαρακτηρισμός των LVPs έδειξε ότι παρουσιάζουν εκπληκτικά χαμηλή πυκνότητα και κατανέμονται σε ένα ευρύ φάσμα πυκνότητας μεταξύ $1,03 \text{ g / cm}^3$ και $1,20 \text{ g / cm}^3$. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα κλάσματα χαμηλότερης πυκνότητας ήταν τα πιο μολυσματικά. Ως συνέπεια της συσχέτισης των λιποπρωτεϊνών με το σωματίδιο HCV, εντοπίστηκαν σε ιικά σωματίδια HCV απολιποπρωτεΐνες όπως οι apoB, apoE, apoA-I και apoC-I [46], [48].

Τα σωματίδια HCV διαθέτουν μια μοναδική σύνθεση λιπιδίων που είναι πολύ διαφορετική από όλους τους άλλους ιούς και από τα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα στα οποία πολλαπλασιάζεται ο HCV. Τα λιπίδια που σχετίζονται με σωματίδια HCV είναι παρόμοια με εκείνα που βρίσκονται στις LDL και VLDL με τους χοληστερυλεστέρες να αντιπροσωπεύουν σχεδόν τα μισά από τα συνολικά λιπίδια του HCV. Η σύνθεση λιπιδίων των ιικών σωματιδίων είναι σημαντική για τη διατήρηση της μορφολογίας και της μολυσματικότητας του ιού [46], [48].

1.3.3 Κύκλος ζωής HCV και λιπιδικός μεταβολισμός

Στη συνέχεια αναφέρονται οι τρόποι με τους οποίους ο HCV χρησιμοποιεί και επηρεάζει τον λιπιδικό μεταβολισμό του κυττάρου-ξενιστή στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του (Εικόνα 1.3-1).

Είσοδος

Η συσχέτιση του HCV με τις λιποπρωτεΐνες έχει αντίκτυπο στον μηχανισμό εισόδου του. Η είσοδος του ιού HCV στα κύτταρα-ξενιστές είναι γνωστό ότι είναι πολύ αργή και έχει αποδειχθεί ότι η κινητική εισόδου του HCV εξαρτάται από την πυκνότητά του και συνεπώς από τον βαθμό συσχέτισης του ιικού σωματιδίου με τα λιπίδια. Όπως συμβαίνει με τις λιποπρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια, τα ιικά σωματίδια που κυκλοφορούν στο αίμα έχουν πρόσβαση στα ηπατοκύτταρα αφού έχουν φτάσει σ' αυτά μέσω του θυριδωτού ενδοθηλίου και συνδέονται με διάφορους υποδοχείς και παράγοντες του λιπιδικού μεταβολισμού [47]. Ειδικότερα τα σωματίδια του HCV αλληλοεπιδρούν με λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς όπως ο υποδοχέας LDLr, που κανονικά συμμετέχει στην εξαρτώμενη από κλαθρίνη ενδοκύτωση της πλούσιας σε χοληστερόλη LDL, εμπλέκεται στα πρώτα βήματα της εισόδου στο HCV. Ένας άλλος λιποπρωτεϊνικός υποδοχέας που συμμετέχει σε διάφορα στάδια εισόδου του HCV είναι ο scavenger receptor BI (SR-BI). Ο SR-BI συνδέεται με διάφορους προσδέτες (ligands) οι οποίοι είναι στοιχεία του λιπιδικού μεταβολισμού όπως υπολείμματα HDL, LDL, VLDL και συμμετέχει στην εκλεκτική πρόσληψη χοληστερυλεστέρων από HDL

και στην αμφίδρομη μεταφορά ελεύθερης χοληστερόλης. Ο μεταφορέας χοληστερόλης NPC1L1 (Niemann Pick C1-like) αποτελεί ακόμα μία απόδειξη του σημαντικού ρόλου του μεταβολισμού των λιπιδίων στην είσοδο του HCV, ειδικότερα έχει αναφερθεί ότι αποτελεί παράγοντα εισόδου για τον HCV, ωστόσο, μάλλον παίζει έμμεσο ρόλο στην είσοδο του ιού μέσω της ρύθμισης της περιεκτικότητας των κυττάρων σε χοληστερόλη[46], [48]. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι αρκετές απολιποπρωτεΐνες επηρεάζουν την είσοδο του HCV. Η απολιποπρωτεΐνη apoE παίζει κρίσιμο ρόλο στην είσοδο του HCV συμμετέχοντας στην αρχική προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή και η απολιποπρωτεΐνη apoC1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι ενισχύει την μολυσματικότητα του ιού μέσω αλληλεπίδρασης της με γλυκοπρωτεΐνες του HCV ενώ πιθανώς συμμετέχει και στο εξαρτώμενο από pH στάδιο σύντηξης του ιικού σωματιδίου[49].

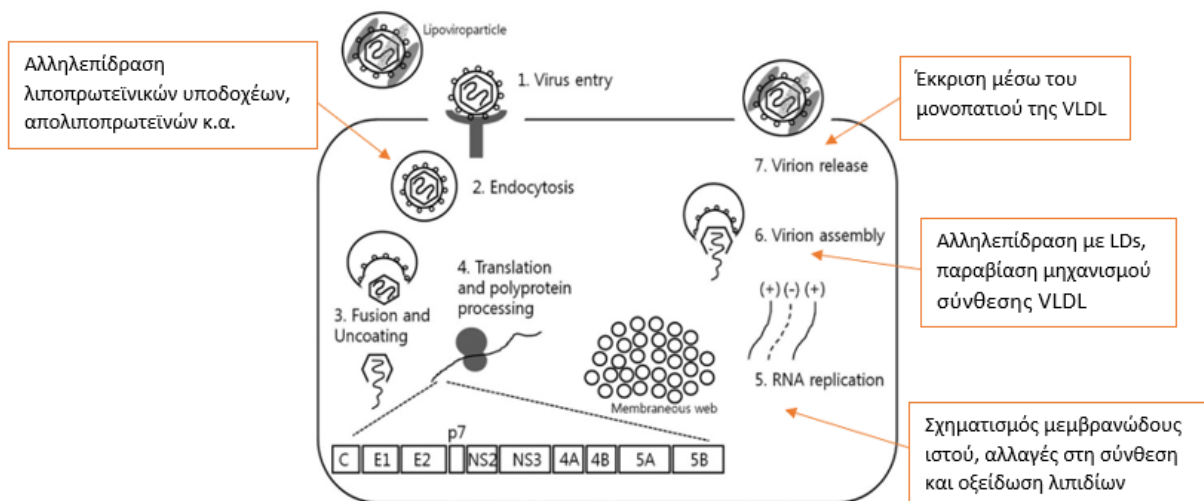
Αντιγραφή

Η αντιγραφή του RNA του HCV επηρεάζεται έντονα από τα ενδοκυτταρικά επίπεδα λιπιδίων, γι' αυτό το λόγο προκαλούνται πολλές αλλαγές σε μονοπάτια σύνθεσης και μεταβολισμού λιπιδίων καθώς και μεταβολές στην κατανομή τους εντός του κυττάρου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί αντιγραφή πραγματοποιείται στο μεμβρανώδη ιστό. Το μεμβρανώδες αυτό δίκτυο που σχηματίζεται αποτελείται από συσσωρευμένα κυστίδια μονής, διπλής ή πολλαπλής μεμβράνης λιπιδίων και προκύπτει από συντονισμένη δράση διαφόρων πρωτεϊνών αντιγραφής του HCV με εξέχοντα ρόλο των μη-δομικών πρωτεϊνών NS5A και NS4B. Αν και προέρχεται από το ER, ο μεμβρανώδης ιστός εμφανίζει πολύ διαφορετική λιπιδική σύσταση (αυξημένη ποσότητα χοληστερόλης και σφιγγολιπιδίων) σε σχέση με αυτόν και συνεπώς διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Επομένως, η αναδιαμόρφωση της μεμβράνης του ER στον περίπλοκο μεμβρανώδη ιστό από τον HCV συνεπάγεται ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων των κυττάρων ξενιστών[46], [47]. Έτσι, ένα υποσύνολο γονιδίων που εμπλέκονται στη λιπιδική ομοιοστάση απορρυθμίζονται από την μόλυνση από HCV σε μεταγραφικό και / ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Αυτό περιλαμβάνει ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό λιπαρών οξέων, τη σύνθεση και τη μεταφορά χοληστερόλης και τη βιοσύνθεση γλυκοσφιγγολιπιδίων και άλλα. Ειδικότερα η κινάση PI4KIIIa (phosphatidylinositol-4 kinase III alpha) έχει βρεθεί έως ένας από τους σημαντικότερους συμπαράγοντες της αντιγραφής του HCV. Η PI4KIIIa είναι λιπιδική κινάση, εντοπίζεται στο ER και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή της φωσφατιδυλοσινοτόλης σε PI4P. Σημαντικό ρόλο στις αλλαγές των μονοπατιών σύνθεσης λιπιδίων, απαραίτητων για την διαμόρφωση του μεμβρανώδους ιστού, παίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins) οι οποίοι ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για βιοσύνθεση χοληστερόλης και παρατηρείται αύξηση τους κατά την μόλυνση από HCV. Σε συμφωνία με αυτό, η έκφραση της συνθάσης λιπαρών οξέων (fatty acids synthase, FASN) και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση και τη

μεταφορά λιπαρών οξέων ρυθμίζεται προς τα πάνω σε μολυσμένα κύτταρα. Τέλος διαφοροποιήσεις εμφανίζονται και στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων (β-οξείδωση), με επικρατούσα τη θεωρία πως οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε μειωμένα επίπεδα οξείδωσης και άρα συσσώρευση τους ενδοκυτταρικά, συντελώντας στη δημιουργία ενός πλούσιου σε λιπίδια περιβάλλοντος, απαραίτητο για την αντιγραφή και συναρμολόγηση του ιικού σωματιδίου του HCV[45], [48].

Συναρμολόγηση & Έκκριση Ιικού Σωματιδίου

Μέχρι τώρα, τα λιποσταγονίδια (LDs) και ο χώρος δίπλα σε αυτά θεωρείται η θέση συναρμολόγησης των σωματιδίων HCV, καθώς όλοι οι ιογενείς παράγοντες που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή εντοπίζονται κοντά σε αυτά τα οργανίδια. Οι μη δομικές πρωτεΐνες HCV NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B συνδέονται στο σύμπλεγμα αντιγραφής, το οποίο μεταφέρεται από τον μεμβρανώδη ιστό στην περιοχή των LDs, μια διαδικασία που εξαρτάται από την τοποθέτηση της πρωτεΐνης core στην επιφάνεια των LDs[41], [46]. Η μετατόπιση της ιικής καψιδιακής πρωτεΐνης core στην επιφάνεια του LD είναι καθοριστική προκειμένου ο HCV να καταλάβει το μονοπάτι σύνθεσης VLDL για τη δική του συναρμολόγηση. Μ' αυτό το τρόπο αναδεικνύονται τα LDs ως βασικός παράγοντας συναρμολόγησης των λιποϊκών σωματιδίων HCV . Αυτό εντοπίζεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα λιπίδια που χρησιμοποιούνται για παραγωγή VLDL προέρχονται από κυτταροπλασματικά LDs και ο HCV παραβιάζει τον μηχανισμό βιογένεσης VLDL για τη συναρμολόγηση του και έτσι η ροή των λιπιδίων που κανονικά συμμετέχει στη σύνθεση της VLDL συμμετέχει επίσης στη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση του σωματιδίου HCV. Επιπλέον, η σημαντικότητα των LDs στον κύκλο ζωής του HCV ενισχύεται από το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια χρόνιας λοίμωξης από HCV, τα LDs στους ηπατικούς ιστούς αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος, προκαλώντας ηπατική στεάτωση, όπου η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης core του HCV και των LDs είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη της[42], [50]. Τέλος τα πρόσφατα συναρμολογημένα ιικά σωματίδια αφού έχουν συγχωνευτεί με τα νεογέννητα σωματίδια VLDL για τη δημιουργία λιποϊκών σωματιδίων, υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση στο Golgi και απελευθερώνονται από τα ηπατοκύτταρα μέσω του μονοπατιού έκκρισης των VLDLs[47].



Εικόνα 1.3-1 Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του HCV και των αλληλεπιδράσεων του με τον λιπιδικό μεταβολισμό. Αρχικά κατά την είσοδο του HCV εντός του κυττάρου ξενιστή καθοριστικό ρόλο έχουν διάφοροι λιποπρωτεϊνικοί υποδοχείς (π.χ LDLr, SR-BI) καθώς και οι απολιποπρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στο ισωμάτιο. Στη συνέχεια για την αντιγραφή του HCV RNA σχηματίζεται ένα μεμβρανώδες ιστός από την αναδιάταξη των μεμβρανών του ER, ενώ παράλληλα παρατηρούνται αλλαγές σε μηχανισμούς σύνθεσης λιπιδίων καθώς και καταβολισμού τους με απώτερο στόχο την δημιουργία ενός περιβάλλοντος πλούσιου σε λιπίδια. Όσον αφορά την συναρμολόγηση του ισωματίου, σημαντικό ρόλο έχουν τα λιποσταγονίδια (LDs) τα οποία συμμετέχουν και στο μηχανισμό σύνθεσης των VLDLs, τον οποίο ο ιός παραβιάζει προς όφελος του. Τέλος, το HCV ισωμάτιο απελευθερώνεται από το κύτταρο έσω του μονοπατιού έκκρισης της VLDL (προσαρμοσμένο από C. W. Kim and K. M. Chang, "Hepatitis C virus: virology and life cycle," Clinical and molecular hepatology, vol. 19, no. 1. pp. 17–25, 2013).

1.4 Ρυθμιστές Λιπιδικού Μεταβολισμού- ANGPTL-3, ANGPTL-4

Οι ομοιάζουσες με αγγειοποιητίνες πρωτεΐνες (angiotensin-like proteins, ANGPTLs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών δομικά παρόμοιων με τις αγγειοποιητίνες. Μέχρι σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί οκτώ ANGPTLs, συγκεκριμένα από ANGPTL-1 έως ANGPTL-8. Όλες οι ANGPTL πρωτεΐνες περιέχουν μια αμινοτελική περιοχή υπερελικωμένης έλικας, μια περιοχή σύνδεσης και μια καρβοξυτελική περιοχή τύπου ινωδογόνου. Η ANGPTL-8 είναι η εξαίρεση της οικογένειας, καθώς δεν έχει στο καρβοξυτελικό της άκρο περιοχή τύπου ινωδογόνου[51]. Οι ANGPTL πρωτεΐνες φαίνεται πως δεν συνδέονται στους ίδιους υποδοχείς με τις αγγειοποιητίνες, γεγονός που αποτελεί την κύρια διαφορά μεταξύ των αγγειοποιητινών και των ANGPTL πρωτεϊνών και δείχνει ότι ο μηχανισμός λειτουργίας των ANGPTL πρωτεϊνών είναι μάλλον διαφορετικός από αυτόν των αγγειοποιητινών. Ωστόσο, πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι ANGPTL πρωτεΐνες είναι ικανές να ρυθμίσουν δραστικά την αγγειογένεση[52]. Επίσης, έχουν περιγραφεί διάφορες λειτουργίες των ANGPTL πρωτεϊνών σε αναπτυξιακές, φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Ειδικότερα οι ANGPTL πρωτεΐνες

εμφανίζουν λειτουργικό ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στη φλεγμονή στην αιμοποίηση και στον καρκίνο[52].

Τα τελευταία χρόνια, έχει αποδειχθεί ότι τρεις ANGPTL πρωτεΐνες, η ANGPTL-3, η ANGPTL-4 και η ANGPTL-8 παίζουν ρόλο στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στη ρύθμιση του επιπέδου των λιπιδίων στο πλάσμα. Πιο συγκεκριμένα, οι ANGPTL-3, ANGPTL-4 και ANGPTL-8 μοιράζονται ένα κοινό χαρακτηριστικό, ρυθμίζουν αρνητικά, σε μεταβλητό βαθμό, τη δραστηριότητα της LPL, της ενδοθηλιακής λιπάσης αλλά και της HL [53].

1.4.1 ANGPTL-3

Η ANGPTL-3 είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, έχει μοριακό βάρος 54kDa και αποτελεί έναν βασικό ρυθμιστή του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών [53], [54]. Σε αντίθεση με τις ANGPTL-4 και ANGPTL8 η ANGPTL-3 παράγεται αποκλειστικά στο ήπαρ, οπότε μπορεί να θεωρηθεί ηπατοκίνη. Στο ήπαρ, η έκφραση της ρυθμίζεται από τον υποδοχέα LXR (oxysterol-activated liver X receptor)[55]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ANGPTL-3 ρυθμίζεται αρνητικά από την ορμόνη του θυρεοειδούς TSH [56]. Η λειτουργία της συνδέεται, τουλάχιστον εν μέρει, με την αναστολή της δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), ενώ αντίστοιχη αναστολή έχει παρατηρηθεί και για την ενδοθηλιακή λιπάση. Η ANGPTL-3 ενεργοποιείται ύστερα από διάσπαση της προκειμένου να απελευθερωθεί η αμινοτελική περιοχή της και σύμφωνα με μελέτες σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας της έχει η ANGPTL-8[52]. Ακόμα, παρατηρείται ότι εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα ύστερα από σίτιση. Ειδικότερα, όσον αφορά την ρύθμιση του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών, τα άτομα με έλλειψη της ANGPTL-3 εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στα κύρια κλάσματα λιποπρωτεϊνών του πλάσματος και μια σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων, ειδικά σε λιποπρωτεΐνες VLDL και HDL, ενώ οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της ANGPTL-3 έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν συγγενή συνδυασμένη υπολιπιδαιμία[53], [56]. Η πλήρης απουσία της ANGPTL-3 οδηγεί σε αυξημένη δραστικότητα της LPL και παράλληλα χαμηλά επίπεδα κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Το τελευταίο αποτέλεσμα οφείλεται πιθανώς σε μειωμένη κινητικότητα ελεύθερων λιπαρών οξέων από το αποθηκευμένο λίπος στον λιπώδη ιστό και μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη σύνθεση και έκκριση ηπατικής VLDL λόγω εξασθενημένης παροχής ελεύθερων λιπαρών οξέων από το ήπαρ. Ακόμα, η ANGPTL-3 μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, παίζοντας σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Τέλος έχει προταθεί ένας πιθανός ρόλος της ANGPTL-3 στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, καθώς τα επίπεδα της έχουν αποδειχθεί ότι συνδέονται στενά με το πάχος των αρτηριακών τοιχωμάτων[53], [56].

Όσον αφορά την συσχέτιση της ANGPTL-3 με τον HCV, σύμφωνα με μελέτη του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας [57], παρατηρήθηκε πως αυτή είναι μειωμένη σε ορούς HCV ασθενών *in vivo*, καθώς και σε ηπατοκύτταρα μολυσμένα με το εργαστηριακό στέλεχος JFH-1 του ιού *in vitro*. Η καψιδιακή πρωτεΐνη HCV core καταστέλλει την έκφραση της ANGPTL-3 μέσω της κινάσης Mirk/Dyrk 1B, η οποία φωσφορυλιώνοντας τον ηπατικό μεταγραφικό παράγοντα HNF-1α τον αναγκάζει να εξέλθει από τον κυτταρικό πυρήνα και να χάσει την ικανότητα πρόσδεσης του στην αντίστοιχη αναγνωριστική DNA ακολουθία του στον υποκινητή ANGPTL-3. Παράλληλα, η HCV core παρεμποδίζει την ενεργοποίηση των LXR/RXR, λιποεξαρτώμενων μεταγραφικών παραγόντων που όπως ειπώθηκε πιο πάνω ρυθμίζουν θετικά την παραγωγή της ANGPTL-3. Η ενδεχόμενη συνακόλουθη αύξηση κάθαρσης λιπιδίων του ορού και ηπατικής πρόσληψης διατηρεί τον υικό αναδιπλασιασμό και πιθανόν να συμβάλλει στην εμμένουσα λοίμωξη.

1.4.2 ANGPTL-4

Η ANGPTL-4 είναι και αυτή εκκρινόμενη, έχει μέγεθος περίπου 50kDa και αποτελεί μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη[58]. Σε αντίθεση με την ANGPTL-3, η ANGPTL-4 συντίθεται από πολλά κύτταρα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού, του ήπατος, των σκελετικών μυών, της καρδιάς, του εντέρου και των μακροφάγων. Στη συνέχεια εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος σε γλυκοζυλιωμένες, ολιγομερισμένες και διάφορες ισομορφές για τη ρύθμιση διαδικασιών, όπως η αγγειογένεση και η διαφοροποίηση κυττάρων καθώς και για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, στον λιπώδη και μυϊκό ιστό. Παρόμοια με την ANGPTL-3, η ANGPTL-4 λειτουργεί και εκείνη ως αναστολέας της LPL και έχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση των αλλαγών στη δραστηριότητα της υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της νηστείας, της σωματικής άσκησης και της έκθεσης στο κρύο[52]. Σε αντίθεση, όμως, με την ANGPTL-3, εκείνη εκφράζεται περισσότερο σε κατάσταση νηστείας. Η έκφραση της έχει βρεθεί πως ρυθμίζεται από αρκετούς διαφορετικούς παράγοντες, ανάλογα με τον ιστό που εκφράζεται, μεταξύ αυτών είναι, οι υποδοχείς PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), ο παράγοντας HIF1-α (hypoxia-inducible factor-1α) και οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών. Η ANGPTL-4 αναστέλλει αναντίστρεπτα τη δραστηριότητα της LPL μετατρέποντας ενεργά διμερή μόρια LPL σε ανενεργά μονομερή. Κατά συνέπεια, η υπερέκφραση της ANGPTL-4 οδηγεί σε υπερτριγλυκεριδαμία και μειωμένη πρόσληψη λιπαρών οξέων στους ιστούς, ενώ η απουσία της προκαλεί μείωση των επιπέδων των κυκλοφορούντων τριγλυκεριδίων[52], [59], [60]. Αξίζει να σημειωθεί πως σύμφωνα με μελέτες η ANGPTL-4 παρουσιάζει ισχυρότερη ανασταλτική δράση απ' ό,τι η ANGPTL-3, καθώς η πρώτη απενεργοποιεί την καταλυτική δράση της LPL, ενώ η δεύτερη απλώς

την καταστέλλει. Τέλος υπάρχουν ενδείξεις πως η ANGPTL-4 ρυθμίζει θετικά τη σύνθεση της ηπατικής χοληστερόλης, δευτερογενώς της αναστολής της LPL και HL-εξαρτώμενης πρόσληψης ηπατικής χοληστερόλης[61], [62].

Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί καμία αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης αυτής με τον ιό της Ηπατίτιδας C.

1.5 Επιγενετική Ρύθμιση του Λιπιδικού Μεταβολισμού

1.5.1 Επιγενετική

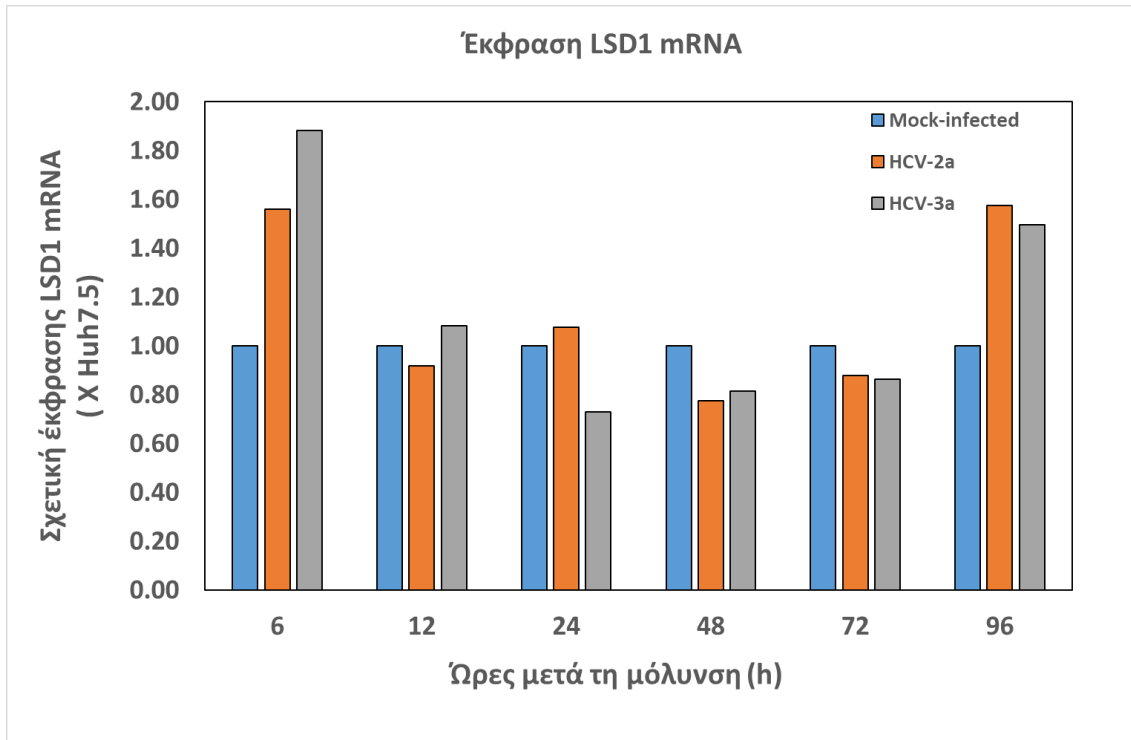
Η επιγενετική ρύθμιση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, τη διατήρηση της ταυτότητας ενός κυττάρου και στον τρόπο που αποκρίνεται το κύτταρο σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Ο όρος αυτός αναφέρεται στις αλλαγές που συμβαίνουν στα γονίδια, οι οποίες δεν οφείλονται στην αλλαγή της αλληλουχίας του DNA αλλά στον τρόπο με τον οποίο ελέγχεται η έκφραση των γονιδίων σε διάφορες συνθήκες και καταστάσεις[63]. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης συνήθως αναφέρονται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση και φωσφορυλίωση, των ιστονών αλλά και μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με το DNA στα νουκλεοσώματα και ρυθμίζουν την παραγωγή mRNA (μετάφραση), σε μεθυλίωση και υδροξυμεθυλίωση των CpG μοτίβων του DNA καθώς και στα μη κωδικοποιά μόρια RNA[64], [65]. Όσον αφορά την μεθυλίωση των ιστονών πρόκειται για την ομοιοπολική σύνδεση μιας μεθυλομάδας με ένα άτομο αζώτου σε κατάλοιπα λυσίνης ή αργινίνης των ουρών των ιστονών. Οι ιστόνες που είναι σε μεγαλύτερο βαθμό μεθυλιωμένες είναι η ιστόνη 3 (H3) και η ιστόνη 4 (H4). Οι λυσίνες είναι δυνατό να είναι μονο- και δι-μεθυλιωμένες, ενώ κάποια κατάλοιπα μπορούν να αποτελούν θέσεις και για μεθυλίωση και για ακετυλίωση. Μέχρι την ανακάλυψη της πρώτης απομεθυλάσης των ιστονών υπήρχε η αντίληψη ότι η μεθυλίωση ήταν μια διαδικασία μη αντιστρεπτή. Όμως, μετά την ανακάλυψη της απομεθυλάσης της λυσίνης 1 (LSD1, Lysine-Specific Demethylase 1), φάνηκε ότι επρόκειτο για μια αντιστρεπτή διαδικασία με τις δράσεις των μεθυλασών και των απομεθυλασών να βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους. Από την ανακάλυψη εκείνη μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός απομεθυλασών, μεταξύ αυτών και η LSD2[66]–[68].

1.5.2 Επιγενετικός ρυθμιστής LSD1

Η LSD-1 (lysine-specific demethylase 1), επίσης γνωστή ως KDM1A, είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 107 kDa[69]. Είναι η πρώτη ανακαλυφθείσα απομεθυλάση λυσίνης ιστονών και έχει την ικανότητα να απομεθυλιώνει επιλεκτικά τη μόνο- ή δι-μεθυλιωμένη λυσίνη 4 και 9 της ιστόνης H3 (H3K4 και H3K9, αντίστοιχα), προκαλώντας έτσι είτε καταστολή είτε ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον. Δομικά αποτελείται από τρεις κύριες επικράτειες (domains): την αμινοτελική επικράτεια SWIRM, την καρβοξυτελική επικράτεια AOL (Amine Oxidase-like) στην οποία βασίζεται η καταλυτική της δράση και την κεντρική προεξέχουσα επικράτεια TOWER. Οι επικράτειες SWIRM και AOL αλληλεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους σχηματίζοντας μια συνολικά σφαιρική δομή[69]. Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι η LSD1 συνήθως δεν λειτουργεί μόνης της αλλά σε σύμπλοκα πολλαπλών πρωτεϊνών (π.χ CtBP1, CoREST και HDAC1/2)[70]. Όσον αφορά την λειτουργία της, η LSD1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε καρκινικούς ιστούς[71]. Ακόμα, φαίνεται πως έχει έμμεσο ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση ορισμένων γονιδίων που συμμετέχουν στην λιπογένεση και στην διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, μετατρέποντας της σε ένα πιθανό στόχο για την θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την απορρύθμιση του λιπιδικού μεταβολισμού. Ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο η LSD1 ρυθμίζει την έκφραση αυτών των γονιδίων αφορά την αλληλεπίδραση του με την δυακετυλάση SIRT1 (sirtuin-1) και κατ' ακολουθία με τον μεταγραφικό παράγοντα SREBP. Μάλιστα, σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε πρωτογενή ηπατικά κύτταρα αρουραίου, η υπέρεκφραση της LSD1, οδήγησε στη μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την λιπογένεση (π.χ. FAS και stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)) καθώς και στην μείωση του επιπέδου τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η LSD1 έχει ρυθμιστικό ρόλο στην συσσώρευση λιπιδίων σε αυτά[70].

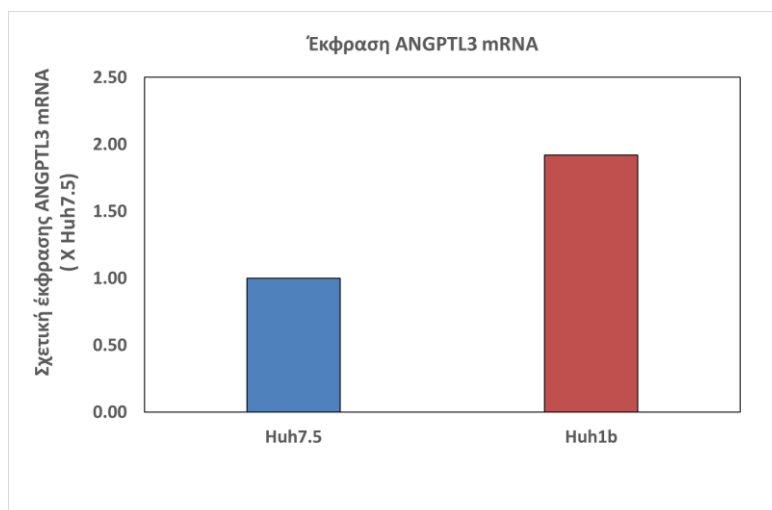
Στο πλαίσιο του ρυθμιστικού ρόλου της LSD1 στον λιπιδικό μεταβολισμό, αλλά και την άμεση αλληλεπίδραση του HCV με αυτόν, μελετήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. κάποια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της LSD1 και του HCV. Ειδικότερα έγινε μόλυνση της κυτταροσειράς Huh7.5 με τα δύο στελέχη του ιού HCV-2a, HCV-3a, και μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA LSD1 σε χρονικές στιγμές έως τις 96 ώρες μετά τη μόλυνση (αδημοσιευτη προσωπική επικοινωνία ΥΔ Γεωργίας Παπαδοπούλου). Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 1.5-1, στις 24-72 ώρες κατά την κορύφωση του ιικού αναδιπλασιασμού φαίνεται πως ο HCV ελαττώνει την έκφραση της LSD1. Αντιθέτως, κατά την είσοδο και έξοδο του ιού στα κύτταρα παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της LSD1. Αυτή η διαφορετική ρύθμιση της LSD1 πιθανά οφείλεται στις διαφορετικές ανάγκες του ιού κατά την ολοκλήρωση των σταδίων του κύκλου ζωής του, έτσι ώστε εκείνος να αποκτήσει τον επιγενετικό

έλεγχο πλειάδας γονιδίων που ρυθμίζει η LSD1 και να φτιάξει το βέλτιστο κυτταρικό περιβάλλον για την επιβίωση του.



Γράφημα 1.5-1 Σχετική LSD1 mRNA έκφραση σε Huh7.5 κύτταρα, στα χρονικά σημεία των 6,12, 24, 48,72 και 96 ωρών ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a και τον HCV-2a. Στον άξονα Y εμφανίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου ως πολλαπλάσιο του μη μολυσμένου μάρτυρα, Huh7.5.

Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης και λόγω της ύπαρξης συσχέτισης της ANGPTL-3 με τον HCV[57], διερευνήθηκε μια πιθανή ρυθμιστική λειτουργία της LSD1 στην έκφραση της ANGPTL-3. Οπότε, έγινε έλεγχος του επιπέδου έκφρασης του mRNA ANGPTL-3 σε κλώνο υπερέκφρασης της LSD1 (Hu1b). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρώιμης αυτής μελέτης που ακόμα δεν έχει δημοσιευθεί (προσωπική επικοινωνία της ΥΔ Β. Βαλιάκου) (Γράφημα 1.5-2), παρατηρείται αύξηση, σχεδόν διπλασιασμός, της έκφρασης της ANGPTL-3 στον κλώνο υπερέκφρασης της LSD1 Hu1b, συνεπώς φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών ρυθμιστικών πρωτεϊνών.



Γράφημα 1.5-2 Σχετική έκφραση ANGPTL-3 mRNA στον κλώνο υπερέκφρασης της LSD1, Huh1b. Ως Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πατρική κυτταροσειρά Huh7.5 η AGPTL-3 έκφραση της οποίας ορίστηκε αυθαίρετα ως μονάδα (1x).

1.5.3 Επιγενετικός ρυθμιστής LSD2

Η πρωτεΐνη LSD2 (αλλιώς γνωστή και ως AOF1, KDM1B, LSD1b) είναι η δεύτερη απομεθυλάση λυσίνης ιστονών που ταυτοποιήθηκε και αφαιρεί μεθυλομάδες από τη μονο- και δι- μεθυλιωμένη λυσίνη 4 και 9 της ιστόνης H3 (H3K4 και H3K9, αντίστοιχα). Είναι πυρηνική πρωτεΐνη, εμφανίζεται σε τρεις ισομορφές και έχει μοριακό βάρος ανάλογα με την ισομορφή της 92/66/19 kDa[72], [73]. Η LSD2 αποτελείται από τρεις επικράτειες. Μία επικράτεια αμινικής οξειδάσης στο καρβοξυτελικό άκρο της αλυσίδας (AOD), μια επικράτεια δακτύλων ψευδαργύρου τύπου CW στο αμινοτελικό της άκρο και ανάμεσά τους μια επικράτεια SWIRM, με τις δύο τελευταίες επικράτειες να είναι απαραίτητες για τη δράση της αμινικής οξειδάσης[51]. Προκειμένου να δράσει αλληλεπιδρά με ένα μακρύ τμήμα του αμινοτελικού άκρου της ουράς της ιστόνης H3[72]. Η LSD2 δεν έχει μελετηθεί ακόμα εκτενώς, οπότε δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για την λειτουργία της. Ωστόσο, σύμφωνα με μια μελέτη έχει και εκείνη ρυθμιστικό ρόλο στο λιπιδικό μεταβολισμό. Ειδικότερα η LSD2 καταστέλλει τα γονίδια που εμπλέκονται στην εισροή λιπιδίων και στο μεταβολισμό αυτών μέσω απομεθυλίωσης της ιστόνης H3K4 για να διατηρήσει την ενεργειακή ισορροπία στα ηπατικά κύτταρα. Η επιλεκτική αυτή δράση της κατευθύνεται εν μέρει από έναν μεταγραφικό παράγοντα απόκρισης στο στρες, τον c-Jun. Παρατηρήθηκε ότι απουσία της LSD2, αυξάνεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά και το μεταβολισμό των λιπιδίων, συσσωρεύονται τοξικοί λιπιδικοί μεταβολίτες εντός των ηπατοκυττάρων και εμφανίζεται αυξημένη ευαισθησία σε λιποτοξικό στρες. Βάσει των παραπάνω, θεωρείται ότι η LSD2 ρυθμίζει επιγενετικά τα γονίδια που προαναφέρθηκαν, προστατεύοντας τα ηπατοκύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από λιποτοξικό στρες[74].

Δεν υπάρχουν προς το παρόν μελέτες που να καταδεικνύουν κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού HCV και του επιγενετικού ρυθμιστή LSD2.

2 Σκοπός της μελέτης

Ο HCV αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας, παρουσιάζοντας μεγάλη γεωγραφική κατανομή, με την πλειοψηφία των μολυσμένων ατόμων να αναπτύσσουν χρόνια λοίμωξη. Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με χρόνια Ηπατίτιδα C (HCV) εμφανίζουν ηπατική φλεγμονή και στεάτωση, οι οποίες εξελίσσονται σε ηπατική ίνωση, κίρρωση και ακολούθως ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ). Παρά την ανάπτυξη νέων, αποτελεσματικότερων θεραπειών τα τελευταία χρόνια, η εκρίζωση του ιού, δεν αποκλείει την εμφάνιση καρκίνου, ή και την επανεμφάνιση αυτού σε ασθενείς που έχουν εμφανίσει ήδη ΗΚΚ και έχουν λάβει θεραπεία. Παράλληλα, οι μηχανισμοί πρόκλησης ηπατικής στεάτωσης παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Είναι γνωστό πως ο ιός αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό σε πολλά επίπεδα, καθώς χρησιμοποιεί κυτταρικά λιπίδια και λιποπρωτεΐνες σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του. Σημαντικό ρόλο σ' αυτή την αλληλεπίδραση μεταξύ ιού και ξενιστή φαίνεται να έχουν κυτταρικοί και επιγενετικοί ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού του ξενιστή, όπως τα βιομόρια ANGPTL-3 και LSD1, αντίστοιχα. Οι ρυθμιστές αυτοί μεταβάλλουν την ισορροπία λιπόλυσης/λιπογένεσης στο ήπαρ και στους περιφερειακούς ιστούς, επηρεάζοντας την έκβαση της ιικής μόλυνσης και συνακόλουθα της ηπατικής νόσου. Άλλα μέλη των παραπάνω οικογενειών με παρόμοιο ή και αντίθετο τρόπο δράσης, όπως οι συγγενείς πρωτεΐνες ANGPTL-4 και LSD2 είναι επίσης πιθανό να εμπλέκονται σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του λιπιδικού προφίλ ηπατικών κυτταροσειρών που υπερέκφραζουν τους παραπάνω ρυθμιστικούς παράγοντες παρουσία ή απουσία του HCV. Αρχικά, όσον αφορά τους κυτταρικούς ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού ANGPTL-3 και ANGPTL-4, επιδιώκεται η μέτρηση των επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας ενός βασικού μορίου – στόχου τους, όπως η ηπατική λιπάση (HL), προκειμένου να ελεγχθεί η ανασταλτική τους δράση σε αυτή. Παράλληλα, θα πραγματοποιηθεί προσδιορισμός των ενδογενών επιπέδων τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 και ANGPTL-4 με στόχο την παρατήρηση των προκληθέντων διαφοροποιήσεων στην ενδοκυτταρική συσσώρευση τριγλυκεριδίων και τον έλεγχο της λειτουργικότητας των παραπάνω κυτταροσειρών. Αντίστοιχος προσδιορισμός θα πραγματοποιηθεί και ύστερα από μόλυνση με τα ιικά στελέχη HCV-2a και HCV-3a, στοχεύοντας στη μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στη συσσώρευση τριγλυκεριδίων παρουσία του HCV. Τέλος, θα επιχειρηθεί η ποιοτική εκτίμηση του αριθμού των ενδοκυτταρικών ηπατικών λιποσταγονιδίων κατά την υπερέκφραση των μορίων ενδιαφέροντος και τα αποτελέσματα θα συγκριθούν με τα ποσοτικά αποτελέσματα από τις δοκιμασίες βιοχημικού

προσδιορισμού των επιπέδων των τριγλυκεριδίων. Μάλιστα, δεδομένης της σημαντικότητας των λιπασταγονιδίων για την ανάπτυξη του HCV θα γίνει εκτίμηση του αριθμού τους και παρουσία του ιού.

Όσον αφορά τον επιγενετικό ρυθμιστή LSD1, βάσει αδημοσίευτων αποτελεσμάτων του εργαστηρίου προέκυψε πως επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της ANGPTL-3, για το λόγο αυτό θα πραγματοποιηθεί ποιοτική εκτίμηση του αριθμού λιπασταγονιδίων στην κυτταροσειρά υπερέκφρασης της LSD1, παρουσία και απουσία του HCV-3a. Τελικά, λόγω της συγγένειας με την LSD1 και του ρυθμιστικού της ρόλου στον λιπιδικό μεταβολισμό θα διερευνηθεί για πρώτη φορά η ύπαρξη πιθανής αλληλεπίδρασης της LSD2 με τον HCV. Αρχικά, θα γίνει προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της LSD2 στην πατρική ηπατική κυτταροσειρά Huh7.5 ύστερα από μόλυνση με τον HCV 3a προκειμένου να παρατηρηθεί αν ο HCV επηρεάζει την έκφραση της. Σε επόμενο στάδιο θα προσδιοριστεί ο ικός αναδιπλασιασμός κατά την υπερέκφραση της LSD2, ώστε να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση της σε αυτόν.

Η χρήση δύο ικών γονοτύπων σε αυτές τις μελέτες αναμένεται να προσφέρει καινούριες πληροφορίες για συγκλίνοντες ή διαφορετικούς μηχανισμούς εγκαθίδρυσης ηπατικής στεάτωσης από έναν RNA ιό με μεγάλη γενετική ποικιλομορφία και ισχυρή ικανότητα μετάλλαξης. Οποσδήποτε, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν περισσότεροι ρυθμιστικοί κυτταρικοί μηχανισμοί που συσχετίζονται με την HCV-εξαρτώμενη ηπατική βλάβη, εφόσον είναι πιθανό ο ιός να αφήνει ένα αποτύπωμα ακόμα και μετά την εκρίζωση του με τις νέες θεραπείες, το οποίο προδιαθέτει για ανάπτυξη ΗΚΚ. Σημαντικός ακόμα λόγος για την μελέτη των παραπάνω είναι η ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών, προσιτών ακόμα και για τις αναπτυσσόμενες χώρες, οι οποίες συχνά αποκλείονται από τα σύγχρονα φάρμακα για την αντιμετώπιση του HCV και της επακόλουθης ηπατικής νόσου, λόγω του υψηλού τους κόστους.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Σημείωση 3.1.: Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση των κυτταρικών καλλιεργειών αλλά και για την αξιοπιστία των πειραματικών αποτελεσμάτων, θεωρείται η διατήρηση στειρών συνθηκών.

Σημείωση 3.2: Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό θάλαμο με σταθερή παροχή 5% (v/v) CO₂ και 95% υγρασία για όλο το χρόνο ζωής της κυτταροκαλλιέργειας.

3.1.1 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας ευκαρυωτικών κυττάρων

Κατά το σχεδιασμό ενός θρεπτικού υλικού μέσου, ο απώτερος στόχος είναι η προσομοίωση του φυσικού περιβάλλοντος ανάπτυξης των κυττάρων. Οι φαρμακευτικές εταιρίες έχουν παρασκευάσει ποικιλία θρεπτικών μέσων ανάλογα με το είδος των κυττάρων που καλλιεργούνται. Για την προστασία των καλλιεργειών από την ανάπτυξη βακτηρίων, προστίθενται στο θρεπτικό μέσο κατά κανόνα ένα αντιβιοτικό κατά των Gram θετικών βακτηρίων όπως είναι η πενικιλίνη, και ένα αντιβιοτικό κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων όπως είναι η στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100U/mL. Το μέσο εμπλουτίζεται απαραίτητως με ορό, ο οποίος έχει τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο στους 56°C για 30 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η απενεργοποίηση του συμπληρώματος. Το θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών ήταν το DMEM-High Glucose της ThermoFisher Scientific. Το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) θεωρείται ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βασικό θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών κυττάρων θηλαστικών. Κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν επιτυχώς σε DMEM περιλαμβάνουν πρωτογενείς ινοβλάστες, νευρώνες, κύτταρα γλοίας, κύτταρα λείου μυός, καθώς επίσης κυτταρικές σειρές όπως HeLa, HEK 293, Cos-7 και PC-12. Το DMEM αρχικά παρασκευάστηκε με χαμηλή γλυκόζη (1 g/L) και πυροσταφυλικό νάτριο, αλλά συχνά χρησιμοποιείται με υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης (4,5 g/L), με ή χωρίς πυροσταφυλικό νάτριο. Το DMEM περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα διττανθρακικού νατρίου (3,7 g/L) και ως εκ τούτου απαιτεί ένα περιβάλλον με 5-10% (v/v) CO₂ για τη διατήρηση του φυσιολογικού pH[75]. Το φυσιολογικό pH είναι απαραίτητο για την επιβίωση των καλλιεργούμενων κυττάρων και για αυτό προστίθεται συμπληρωματικά ο δείκτης

ερυθρό της φαινόλης, ο οποίος έχει πορτοκαλί - κόκκινο χρώμα σε pH 6,8 – 8,2. Σε όξινο pH < 6,6 κινδυνεύει, ενώ σε βασικό pH > 8,2 εμφανίζει ένα έντονο ροζ χρώμα.

Ορός

Το DMEM δεν περιέχει πρωτεΐνες, λιπίδια ή αυξητικούς παράγοντες. Συνεπώς, απαιτεί συμπλήρωση, συνήθως με 10% (v/v) ζωικό ή ανθρώπινο ορό, συνήθως ορό από έμβρυο μόσχου (Fetal Calf Serum; FCS ή Fetal Bovine Serum, FBS). Ο ορός περιέχει συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως αυξητικούς παράγοντες, ιχνοστοιχεία, ορμόνες και πρωτεΐνες,

Μη απαραίτητα αμινοξέα (Non-essential amino acids)

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

PBS

Πρόκειται για ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων που περιέχει K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NaCl$ και KCl . Χρησιμοποιείται συνήθως για εκπλύσεις και ως διαλύτης άλλων αντιδραστηρίων. Δεν υποστηρίζει την κυτταρική επιβίωση για μακροχρόνια διαστήματα, άνω των 10 λεπτών.

Τρυψίνη

Πρόκειται για ένα ένζυμο, το οποίο προέρχεται από το πάγκρεας χοίρου και καταλύει τη διάσπαση των πρωτεϊνικών αλυσίδων στο καρβοξυτελικό άκρο κατάλοιπων λυσίνης και αργινίνης. Χρησιμοποιείται συνήθως για τη ανακαλλιέργεια των κυτταρικών πληθυσμών μέσω αποκόλλησης τους από το πλαστικό υλικό των πλακών και φυαλών καλλιέργειας, και διάσπασης συσσωματωμάτων κυττάρων και ιστών θηλαστικών. Η τρυψίνη η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προέρχεται από την εταιρεία Gibco.

DMSO

ο DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) είναι ένας πολικός, απρωτικός οργανικός διαλύτης με πολλές εφαρμογές στην οργανική χημεία και τη μοριακή βιολογία. Ψύχεται εύκολα και τήκεται αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή ψυκτικού μέσου για τα κύτταρα και για τη φύλαξή τους σε κρυοφιαλίδια μέσα σε δοχεία αποθήκευσης υγρού αζώτου στους $-196^{\circ}C$, μετά από αραιώση 1:10 σε ορό (FCS).

Γλουταμίνη

Η γλουταμίνη είναι ένα απαραίτητο αμινοξύ που απαιτείται σχεδόν από όλα τα κύτταρα θηλαστικών που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πρωτεϊνών, ως πηγή ενέργειας, και στον μεταβολισμό νουκλεϊκών οξέων. Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 2 mM.

Αντιβιοτικά

Γενετισίνη: Κοινώς γνωστό ως G418 ή G-418, το αντιδραστήριο Geneticin είναι ένα αμινογλυκοσίδιο σχετικό με τη γενταμυκίνη και χρησιμοποιείται συνήθως ως εκλεκτικός παράγοντας επιλογής για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η εταιρεία προμήθειας του αντιβιοτικού της γενετισίνης είναι η Thermofisher Scientific και η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση διαγονιδιακών κυτταροσειρών είναι 400 µg/mL.

Υγρομυκίνη Β: Η υγρομυκίνη Β είναι ένα αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό που αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών παρεμβαίνοντας στη μετατόπιση του ριβοσώματος 80S και προάγοντας παρεκκλίνουσα μετάφραση. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση διαγονιδιακών κυτταροσειρών είναι ίση με 100 µg/mL.

3.1.2 Κυτταροσειρές

Οι κυτταροσειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική είναι οι εξής:

Huh7.5: Η Huh7.5 κυτταροσειρά είναι εξέλιξη της κυτταροσειράς Huh7. Η Huh7 είναι μια καλά διαφοροποιημένη σειρά κυτταρικού καρκινώματος η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα, και αρχικά ελήφθη από τον όγκο ήπατος Ιάπωνα, ηλικίας 57 ετών το 1982. Καθιερώθηκε από τους Nakabayshi και Sato [76]. Πρόκειται για μια κυτταρική σειρά αθανατοποιημένων κυττάρων τα οποία μοιάζουν μορφολογικά με επιθηλιακά κύτταρα. Είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια των φιαλών ή πλακών καλλιέργειας και τυπικά αναπτύσσονται ως δισδιάστατες μονοστοιβάδες. Η Huh7 κυτταροσειρά αποκτήθηκε από το Παγκόσμιο κέντρο Βιοποικιλότητας (American Tissue Culture Collection; ATCC) και διατηρείται στο κατάλληλο υλικό καλλιέργειας παρουσία 10% (v/v) FCS.

Οι παρακάτω σταθερές κυτταροσειρές έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π..

G4: Η κυτταροσειρά G4, προέρχεται από την κυτταροσειρά Huh7.5 και υπερεκφράζει το ανθρώπινο γονίδιο ANGPTL-3. Κατασκευάστηκε από την Υ.Δ. στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. Βάια Βαλιάκου.

G5: Η κυτταροσειρά G5, προέρχεται από την κυτταροσειρά Huh7.5 και υπερεκφράζει το ανθρώπινο γονίδιο ANGPTL-4. Κατασκευάστηκε από την Υ.Δ. στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. Βάια Βαλιάκου.

Hu1b: Η κυτταροσειρά Hu1b, προέρχεται από την κυτταροσειρά Huh7.5 και υπερεκφράζει το ανθρώπινο γονίδιο LSD1. Κατασκευάστηκε από την Υ.Δ. στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. Γεωργία Παπαδοπούλου.

Lh5: Η κυτταροσειρά Lh5, προέρχεται από την κυτταροσειρά Huh7.5 και υπερεκφράζει το ανθρώπινο γονίδιο LSD2. Κατασκευάστηκε από την προπτυχιακή φοιτήτρια στο εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π. Ελισάβετ Ιωαννίδου.

Οι κυτταροσειρές αυτές συντηρούνται, κατά την καλλιέργεια, σε θρεπτικό υλικό που αποτελείται από τα εξής:

1. DMEM High glucose (Gibco)
2. Ορός Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) (Gibco)
3. Διάλυμα 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco)
4. Διάλυμα 100x L-Glutamine (Gibco)
5. Διάλυμα 100x Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco)
6. Αντιβιοτικό επιλογής, στον παρακάτω Πίνακας 3.1-1 αναφέρεται το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε για κάθε κυτταροσειρά.

Πίνακας 3.1-1 Αντιβιοτικό για κάθε κυτταροσειρά

Κυτταροσειρά	Αντιβιοτικό
G4	Υγρομυκίνη Β (100 µg/mL)
G5	G418 (400 µg/mL)
Hu1b	G418 (400 µg/mL)
Lh5	G418 (400 µg/mL)

3.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Υλικά:

1. DMEM High glucose (Gibco)
2. Ορός Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
3. Διάλυμα 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco)
4. Διάλυμα 100x L-Glutamine (Gibco)
5. Διάλυμα 100x Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco)
6. Διάλυμα τρυψίνης-EDTA (0.25% w/v) (Gibco)
7. Υδατικό διάλυμα PBS
8. Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)
9. Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών F25 (25 cm²)
10. Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών F75 (75 cm²)

Πρωτόκολλο:

1. Αναρρόφηση του χρησιμοποιημένου θρεπτικού υλικού με γυάλινη πιπέτα Pasteur συνδεδεμένη στην αντλία κενού.
2. Έκπλυση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού με διάλυμα PBS εις διπλούν.
3. Προσθήκη ικανής ποσότητας διαλύματος θρυψίνης-EDTA (0,5 - 1 mL, ανάλογα με την επιφάνεια της φλάσκας καλλιέργειας) για την κάλυψη όλης της επιφάνειας της καλλιέργειας.
4. Επώαση στον επωαστικό θάλαμο για περίπου 7 λεπτά.
5. Αδρανοποίηση της τρυψίνης με 10 mL φρέσκο θρεπτικό υλικό το οποίο περιέχει τουλάχιστον ίση ποσότητα FBS με την ποσότητα της θρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε. Τοποθέτηση του εναιωρήματος σε πλαστικό σωλήνα τύπου Falcon 15 mL.
6. Φυγοκέντρηση σε 1000 rpm / 5 λεπτά / 22°C. Απόρριψη υπερκειμένου.
7. Επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε ικανή ποσότητα θρεπτικού υλικού με ανάδευση ώστε να επέλθει ικανός διαχωρισμός των κυττάρων και τοποθέτησή τους σε αναλογία 1:4 – 1:5, ανάλογα με την επιθυμούμενη πυκνότητα, σε φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών F25 ή F75 ή πλάκες φρεατίων.
8. Οι όγκοι πλήρωσης των καλλιιεργητικών δοχείων ήταν ως εξής (Πίνακας 3.1-2):

Πίνακας 3.1-2 Όγκοι πλήρωσης δοχείων καλλιέργειας κυττάρων

Δοχείο	Ποσότητα θρεπτικού υλικού
F75	15 mL
F25	5 mL
Πλάκα 6 φρεατίων	2 mL/φρεάτιο
Πλάκα 12 φρεατίων	1 mL/ φρεάτιο
Πλάκα 24 φρεατίων	500 μL/ φρεάτιο
Πλάκα 48 φρεατίων	250 μL/ φρεάτιο
Πλάκα 96 φρεατίων	150 μL/ φρεάτιο

3.1.4 Κρυοσυντήρηση κυττάρων

Υλικά:

1. Ψυκτικό διάλυμα (10% (v/v) DMSO σε FBS)
2. Αμπούλες κρυοσυντήρησης με βιδωτό καπάκι 1,5 mL

Πρωτόκολλο:

1. Κατά τη διαδικασία ανακαλλιέργειας, μετά τη φυγοκέντρηση του βήματος 6, επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με ικανή ποσότητα ψυκτικού διαλύματος ώστε να ισχύει 1×10^6 κύτταρα/mL εναιωρήματος.
2. Διαμοίραση του εναιωρήματος σε αμπούλες κρυοσυντήρησης (cryovials): 1mL/cryovial ώστε να υπάρχουν 1×10^6 κύτταρα/cryovial.
3. Μόνωση των cryovials με αρκετές στρώσεις απορροφητικού χαρτιού και τοποθέτησή τους σε κουτί πολυστυρενίου, στους -80°C για 24 h για επίτευξη σταδιακής μείωσης της θερμοκρασίας των κυττάρων.
4. Τοποθέτηση σε ειδικό κουτί αντοχής στο δοχείο υγρού αζώτου για επ' αόριστο διατήρηση.

3.1.5 Απόψυξη κυττάρων

Υλικά:

1. DMEM High glucose (Gibco)

2. Ορός Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
3. Διάλυμα 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco)
4. Διάλυμα 100x L-Glutamine (Gibco)
5. Διάλυμα 100x Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco)
6. Υδατικό διάλυμα PBS
7. Φλάσκες κυτταροκαλλιιεργειών F25
8. Πλαστικοί σωλήνες τύπου Falcon 15 mL
9. Γυάλινες πιπέτες Pasteur

Πρωτόκολλο:

1. Απομάκρυνση αμπούλας κρυσυντήρησης από το δοχείο υγρού αζώτου.
2. Ταχεία απόψυξη των κυττάρων με θέρμανση της αμπούλας στους 37 °C στο υδατόλουτρο.
3. Προσθήκη όλης της ποσότητας του εναιωρήματος της αμπούλας σε σωλήνα Falcon με 10 mL θρεπτικό υλικό και 20% (v/v) FBS.
4. Φυγοκέντρηση 1000 rpm / 5 min / 22 °C, ώστε να απομακρυνθεί το ψυκτικό διάλυμα.
5. Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 20% (v/v) FBS σε φλάσκα καλλιέργειας F25 για τουλάχιστον 16 h.
6. Έκπλυση με 1x PBS για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και αλλαγή θρεπτικού υλικού σε καινούριο με 10% (v/v) FBS.

3.2 Τεχνικές Μοριακής Ιολογίας

3.2.1 Μόλυνση ηπατοκυττάρων με τα εργαστηριακά στελέχη HCV-2a και HCV-3a

Στον παρόν πρωτόκολλο περιγράφεται η διαδικασία μόλυνσης των κυττάρων των χρησιμοποιούμενων κλώνων από τα εργαστηριακά στελέχη HCV JFH-1 (genotype 2a, HCV-2a) και HCV DBN3a (genotype 3a, HCV-3a). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ίδια και για τις δύο περιπτώσεις. Απαραίτητη είναι η αναφορά των απόλυτων συνθηκών στειρότητας και εργασίας με παθογόνα κατηγορίας BSL2+ (κανονισμοί CDC) που οφείλουν να κρατούνται τόσο για την προστασία των δειγμάτων από τυχόν επιμολύνσεις όσο και για την προστασία του ίδιου του ερευνητή. Οι παρασκευές και τιτλοδοτήσεις των ικών στοκ που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχουν πραγματοποιηθεί από την μεταδιδακτορική ερευνήτρια και συνεργάτιδα του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας Δρ Ειρήνη Καραμιχάλη.

Υλικά:

1. DMEM High glucose (Gibco)
2. Ορός Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)
3. Διάλυμα 100x Penicillin/Streptomycin (Gibco)
4. Διάλυμα 100x L-Glutamine (Gibco)
5. Διάλυμα 100x Non-Essential Amino Acids (NEAA) (Gibco)
6. Διάλυμα Trypsin-EDTA (0,25% w/v) (Gibco)
7. Υδατικό διάλυμα PBS
8. Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v)
9. Τιτλοδοτημένο στοκ από το μολυσματικό στέλεχος HCV 3a
10. Τιτλοδοτημένο στοκ από το μολυσματικό στέλεχος HCV 2a
11. Πλάκα 6-φρεατίων

Πρωτόκολλο:

1. Αλλαγή θρεπτικού υλικού της κυτταροκαλλιέργειας την προηγούμενη ημέρα από τη μόλυνση.
2. Παρασκευή θρεπτικού υλικού που περιέχει 1% (v/v) FBS και προσθήκη μέσα σε αυτό όγκου υλικού στοκ σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{όγκος υκού στοκ} = \frac{\text{αριθμός κυττάρων} * \text{φρεάτια} * \text{MOI}}{\text{τίτλος ιού}}$$

όπου,

M.O.I = multiplicity of infection, δηλαδή ο αριθμός ιικών σωματίων ανά κύτταρο.

Αριθμός κυττάρων = κύτταρα/φρεάτιο

Τίτλος ιού = για τον HCV-2a=6.32*10⁸ copies/mL

και για τον HCV-3a=3.8*10⁸ copies/mL

3. Διανομή του παραπάνω υλικού στα φρεάτια που βρίσκονται τα κύτταρα σε κατάλληλη ποσότητα και επώαση στον κλίβανο για 4 ώρες.
4. Αντικατάσταση του υλικού μόλυνσης με υλικό που περιέχει 10% (v/v) FBS.
5. Επώαση στον κλίβανο για 6, 12, 24, 48 h και 96 h, ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος. Για τη συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω επεξεργασία ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.
6. 2x εκπλύσεις με PBS.
7. Προσθήκη 1 mL PBS και απόξεση του πυθμένα των φρεατίων με σκοπό να αποκολληθούν τα κύτταρα.

- a) Απομάκρυνση του υλικού από την φλάσκα ή την πλάκα φρεατίων καλλιέργειας των κυττάρων.
- b) Πλύση με 1 mL PBS και απομάκρυνσή του.
- c) Δεύτερη πλύση με 1mL PBS και απομάκρυνσή του.
- d) Προσθήκη Nucleozol ανάλογα του μεγέθους της καλλιέργειας:
 - F75 → 500 μ L
 - F25 → 150 μ L
 - 6-φρεάτια → 120 μ L
 - <6-φρεάτια → 100 μ L
- e) Ανατάραξη και ξύσιμο της φλάσκας με την πιπέτα.
- f) Μεταφορά του περιεχομένου σε σωληνάκι τύπου Eppendorf.

2. Κατακρήμνιση προσμίξεων :

- a) Προσθήκη 200 μ L ddH₂O για κάθε 500 μ L NucleoZOL
- b) Ανακάτεμα στο vortex (κυκλοαναδευτήρα τύπου Vortex) για 15 δευτερόλεπτα
- c) Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά
- d) Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 16.000g σε θερμοκρασία δωματίου

3. Κατακρήμνιση ολικού RNA

- a) Μεταφορά από το υπερκείμενο ίσης ποσότητας με το Nucleozol που προστέθηκε στην αρχή, σε νέο σωληνάκι.
- b) Προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης 100%
- c) Προσθήκη γλυκογόνου σε αναλογία 1:40
- d) Επώαση στους -20°C για 16 ώρες.

2η ημέρα :

- 1. Άμεση φυγοκέντρηση χωρίς απόψυξη για 15 λεπτά στα 12.000g στους 4°C και απόρριψη υπερκείμενου.
- 2. Εκπλύση με προσθήκη 500 μ L αιθανόλης 75% (v/v) στο ίζημα του ολικού RNA.

3. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 8.000g στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου.
4. Δεύτερη πλύση με αιθανόλη 75% (v/v) και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες, απόρριψη υπερκείμενου.
5. Ξήρανση του ιζήματος RNA στο ξηραντήρα τύπου SpeedVac (SVC100, Savant) για 5 λεπτά.
6. Επαναδιάλυση του ιζήματος με 15 μ L RNase ddH₂O.
7. Αποθήκευση στους -80°C.

3.3.2 Αντίδραση αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription - RT)

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription) είναι η διαδικασία μετατροπής του μονόκλωνου RNA σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) προκειμένου αυτό να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση διάδοχων PCR και πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται μεταγραφή του ολικού RNA σε cDNA ώστε να μπορέσει το τελευταίο να ενισχυθεί στην πορεία με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) M-MLV (Moloney-Murine leukemia virus) παράγεται ως ένα κλωνοποιημένο ένζυμο που προέρχεται από σύμπτυξη του γονιδίου *trpE* του *Escherichia coli* με την κεντρική περιοχή του γονιδίου *pol* του M-MLV. Το ένζυμο αυτό είναι μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA ή DNA παρουσία εκκινητή, ώστε να συνθέσει ένα συμπληρωματικό κλώνο DNA [77]. Η μέθοδος που χρησιμοποιεί το ένζυμο βρίσκει πολλές εφαρμογές, μεταξύ αυτών και την *in vitro* σύνθεση cDNA κλώνων από συγκεκριμένες RNA αλληλουχίες. Τα παράγωγα cDNA χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της δομής, οργάνωσης και έκφρασης προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών γονιδίων.

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται εκκινητές οι οποίοι είναι μη ειδικοί. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται αποτελείται από δύο επιμέρους στάδια : αρχικά γίνεται η παρασκευή ενός μείγματος που περιλαμβάνει το δείγμα-μήτρα RNA σε συγκεκριμένη ποσότητα (template), τους τυχαίους εξαμερείς εκκινητές (p(DN)₆) (random hexamers) και συμπλήρωση του όγκου με νερό μέχρι τα 12,5 μ L. Στη συνέχεια, γίνεται παρασκευή του μείγματος (master mix) με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (M-MLV), των dNTPs και ενός ανασυνδυασμένου αναστολέα RNασών (RNAsin inhibitor) που εμποδίζει τη δράση των ενδογενών κυτταρικών ενζύμων που υδρολύουν το RNA. Για τον υπολογισμό της ποσότητας όγκου της μήτρας RNA που θα χρησιμοποιηθεί, γίνεται μέτρηση 1 μ L από το δείγμα RNA στο φασφατοφωτόμετρο

Nanodrop 2000 και στη συνέχεια γίνεται υπολογισμός ώστε ο όγκος που θα χρησιμοποιηθεί να αντιστοιχεί σε 1,0 µg RNA ανά δείγμα.

1° Στάδιο

Υλικά :

1. RNase free H₂O: συμπλήρωση μέχρι τελικού όγκου 12,5 µL
2. Μη ειδικοί εκκινητές (random hexamers) : 1 µL (2 pmol/µL)
3. Μήτρα RNA (template) : x µL που αντιστοιχούν σε 1,0 µg RNA
4. Θερμικός κυκλοποιητής

Πρωτόκολλο:

1. Προσθήκη των υλικών με την εξής σειρά : ddH₂O, μη ειδικοί εκκινητές και RNA των δειγμάτων που απομονώθηκαν.
2. Θέρμανση στους 70°C στον θερμικό κυκλοποιητή (T-professional Biometra) για 5 λεπτά με σκοπό την αποδιάταξη του RNA και την υβριδοποίηση των τυχαίων εκκινητών.
3. Παύση της αντίδρασης.
4. Τοποθέτηση στον πάγο για 5 min ώστε να διευκολυνθεί το ξεδίπλωμα της δευτεροταγούς δομής του RNA και η αρχική υβριδοποίηση με τους εκκινητές.

2° Στάδιο

Υλικά:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα 5x M-MLV (260 mM Tris-HCl pH 8,3 στους 25°C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT).
2. Αναστολέας RNAsών (RNAsin Inhibitor, Promega) 0,5µL.
3. dNTPs (dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM) 1 µL.
4. Ένζυμο M-MLV Reverse Transcriptase της Promega 1 µL.

Πρωτόκολλο:

1. Παρασκευή του δεύτερου διαλύματος (master mix) τοποθετώντας τα υλικά με τη σειρά που αναφέρονται παραπάνω.
2. Ελαφριά ανάδευση.
3. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο θερμικό κυκλοποιητή (T-professional Biometra).
4. Αραίωση του παραχθέντος cDNA 1:5 με την προσθήκη 80μL ddH₂O και φύλαξη του διαλύματος στους -80 °C

Οι συνθήκες που πρέπει να επικρατούν στον κυκλοποιητή φαίνονται στον Πίνακα 3.3-1 .

Πίνακας 3.3-1 Στάδια κύκλων RT-PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αποδιάταξη αλυσίδας RNA και υβριδισμός εκκινητών	70°C	5 λεπτά
Σύνθεση και επιμήκυνση αλυσίδας	37°C	1 ώρα
Απενεργοποίηση ενζύμου	92 °C	2 λεπτά
Διατήρηση	4 °C	∞

3.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction - qPCR).

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) χρησιμοποιείται προκειμένου να ανιχνευθεί, χαρακτηριστεί και ποσοτικοποιηθεί ένα μόριο νουκλεϊκού οξέος. Η αρχή αυτής της μεθόδου βασίζεται στη σήμανση του cDNA (το οποίο έχει προκύψει με αντίστροφη μεταγραφή από RNA) με φθορίζουσα ουσία, η ποσότητα της οποίας αντιστοιχεί στην ποσότητα του DNA που ενισχύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και μπορεί να παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος αυτή εισήχθη το 1993 από τον Higuchi et al [78], όταν παρατήρησε πως θα μπορούσε να παρακολουθήσει την πορεία της αντίδρασης με την προσθήκη φθορίζουσας ουσίας που προσδέεται στο DNA.

Δύο είναι οι συνήθεις τρόποι ανίχνευσης των προϊόντων σε μία real-time PCR. Ο πρώτος περιλαμβάνει φθορίζουσες χρωστικές οι οποίες παρεμβάλλονται σε οποιαδήποτε δίκλινα μόρια DNA μη ειδικά. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, οι οποίοι φέρουν ένα φθορίζον μόριο που επιτρέπει την ανίχνευση μόνο μετά από υβριδισμό του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική του αλληλουχία. Η διαδικασία είναι όπως αυτή της απλής PCR, με την προσθήκη ενός φθοροφόρου στο μίγμα της PCR, καθώς και με τη χρήση ενός θερμοκυκλοποιητή που να διαθέτει αισθητήρες για τη μέτρηση του φθορισμού μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η real time PCR βρίσκει πολλές εφαρμογές, τόσο στο χώρο της διάγνωσης όσο και στο χώρο της έρευνας, χρησιμοποιείται δε και στη βιομηχανία, καθώς και στην περιβαλλοντική βιολογία. Στην έρευνα μια πολύ βασική εφαρμογή της είναι η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης.

Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μπορεί να μετρηθεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι η απόλυτη ποσοτικοποίηση κατά την οποία δίνεται ο ακριβής αριθμός των DNA μορίων, μέσω σύγκρισης των δειγμάτων με μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Εάν δεν είναι γνωστή η ακριβής συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων της καμπύλης μπορεί να πραγματοποιηθεί σχετική ποσοτικοποίηση, όπου τα άγνωστα δείγματα συγκρίνονται μεταξύ τους ως προς τη σχετική έκφραση ενός γονιδιακού προϊόντος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η σχετική ποσοτικοποίηση, η οποία βασίζεται σε εσωτερικά γονίδια αναφοράς. Τα γονίδια αυτά χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των μη ειδικών μεταβολών στην έκφραση, όπως οι διαφορές στην ποσότητα και την ποιότητα του mRNA που απομονώθηκε και κατ' επέκταση του cDNA που προέκυψε από αυτό μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Η σχετική ποσοτικοποίηση είναι ευκολότερη από την απόλυτη ποσοτικοποίηση, καθώς δεν απαιτείται καμπύλη βαθμονόμησης και η ποσότητα του mRNA του προς μελέτη γονιδίου συγκρίνεται ως προς την ποσότητα του mRNA του γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται κανονικοποίηση (normalization) και το γονίδιο αναφοράς ονομάζεται γονίδιο κανονικοποίησης (normalizing gene). Συνήθως για το ρόλο αυτό επιλέγονται γονίδια οικιακής οικονομίας (housekeeping genes), τα οποία είναι γονίδια που χρησιμοποιούνται σε ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου και χαρακτηρίζονται από σταθερή και απανταχού κυτταρική έκφραση. Τέτοια γονίδια είναι αυτά του κυτταρικού σκελετού, όπως η τουμπουλίνη, καθώς και γονίδια που σχετίζονται με την μετάφραση των κυτταρικών γονιδίων, όπως τα ριβοσωμικά γονίδια. Σύμφωνα με τα παραπάνω, το γονίδιο που επιλέξαμε ως γονίδιο αναφοράς είναι το 18S rRNA (18S ριβοσωμικό RNA).

Το κύριο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήσαμε για τις αντιδράσεις qPCR είναι το KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit, το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων, εκτός από το cDNA μήτρα και τα μόρια-εκκινήτες. Τα συστατικά αυτά είναι το χλωριούχο μαγνήσιο σε κατάλληλη συγκέντρωση, που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου

πολυμεράση, η χρωστική SYBR Green I σε κατάλληλη για την αντίδραση συγκέντρωση και η πολυμεράση KAPA SYBR FAST DNA Polymerase.

Η πολυμεράση που είναι ενσωματωμένη στο KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit είναι ειδικά σχεδιασμένη για αντιδράσεις Real-Time PCR οι οποίες χρησιμοποιούν τη χρωστική SYBR Green I. Η πολυμεράση αυτή δε διαθέτει ενζυμική δραστικότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και για την ενεργοποίησή της απαιτείται ένα αρχικό βήμα κατά το οποίο το ενεργό κέντρο της πολυμεράσης απελευθερώνεται από μια ειδική ομάδα προστασίας με την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας πριν από το βήμα της αποδιάταξης του DNA (Hot Start πολυμεράση). Έτσι παρεμποδίζεται ο σχηματισμός παραπροϊόντων ή διμερών εκκινητών (primer dimmers) που μπορεί να σχηματιστούν πριν από το στάδιο της αποδιάταξης. Η χρωστική SYBR Green I είναι μια χρωστική κυανίνης, μοριακής μάζας 509,73 g/mol, η οποία δεσμεύεται στο δίκλωνο DNA και σε μικρότερο βαθμό σε μονόκλωνο DNA και σε RNA. Το σύμπλοκο SYBR Green-DNA που προκύπτει απορροφά μπλε φως (497 nm) και εκπέμπει πράσινο (520 nm). Η SYBR-Green λόγω της ειδικής της δέσμευσης στο δίκλωνο DNA έχει ενσωματωθεί σε πολλές μεθόδους, μεταξύ αυτών στην ηλεκτροφόρηση, στη μικροσκοπία φθορισμού, στην κυτταρομετρία ροής, καθώς και στη real-time PCR [78].

A) Μελέτη της έκφρασης της LSD2 :

Υλικά:

1. Μόρια εκκινητές Cτελική=400nM, που παρατίθενται στον (Πίνακας 3.3-2) :

Πίνακας 3.3-2 Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της qPCR

Εκκινητής	Αλληλουχία
LSD-2 Forward(100μM)	5'-GTAGGCAGGCGAAGAAG-3'
LSD-2 Reverse (100μM)	5'-ATACCATCGGGAGGTGTAGC -3'

2. KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit
3. Υπερκαθαρό δις αποσταγμένο νερό ελεύθερο από RNασες (ddH₂O)
4. Θερμοκυκλοποιητής Corbett (Qiagen)

Πρωτόκολλο: Πραγματοποίηση αντίδρασης qPCR σε παγωμένο μεταλλικό στατώ ειδικό για σωληνάκια 100 μL ως εξής:

1. Παρασκευή μείγματος αντίδρασης Master Mix (στον Πίνακας 3.3-3 φαίνονται οι όγκοι για μία αντίδραση)
2. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς τεσσάρων σημείων (1x, 1/10x, 1/100x, 1/1000x).
3. Αραίωση δειγμάτων σε τελικό όγκο 50 μL

Πίνακας 3.3-3 Όγκοι που απαιτούνται για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης.

SYBR Green	Forward primer (100 μM)	Reverse primer (100 μM)	H ₂ O
10 μL	0.04 μL	0,04 μL	5.92 μL

1. Προσθήκη 4 μL δείγματος και 16 μL από το Master mix. Εκτός από το αρνητικό δείγμα ελέγχου (NTC – negative template control), όλα τα υπόλοιπα (καμπύλη και άγνωστα) έγιναν εις τριπλούν. Παραγωγή αντιδράσεων σε πρόγραμμα PCR ως εξής (Πίνακας 3.3-4):

Πίνακας 3.3-4 Περιγραφή των σταδίων και των συνθηκών στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδραση.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά	1
Αποδιάταξη	95 °C	15 δευτερόλεπτα	50
Υβριδισμός	61 °C	20 δευτερόλεπτα	
Σύνθεση και επιμήκυνση	72 °C	20 δευτερόλεπτα	
Διατήρηση	4 °C	∞	-

2. Καμπύλη τήξης: από 70 °C σε 95 °C (αύξηση 0,5 °C/ 5 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση αναμονή 90s)

B) Μελέτη της έκφρασης της NS3-3a :

Υλικά:

1. Μόρια εκκινητές Στελική=400nM, που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3-5):

Πίνακας 3.3-5: Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Εκκινητής	Αλληλουχία
NS3-3a Forward (100μM)	5'-GCAGCGGTAAGAGCACAAAG-3'
NS3-3a Reverse (100μM)	5'-TAGGCACGCGACATGAAAGA-3'

2. KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit
3. Υπερκαθαρό δις αποσταγμένο νερό ελεύθερο από RNασες (ddH₂O)
4. Θερμοκυκλοποιητής Corbett (Qiagen)

Πρωτόκολλο: Πραγματοποίηση αντίδρασης qPCR σε παγωμένο μεταλλικό στατώ ειδικό για σωληνάκια 100 μL ως εξής:

1. Παρασκευάστηκε το Master Mix (στον Πίνακα 13 φαίνονται οι όγκοι για μία αντίδραση)

Πίνακας 3.3-6: Όγκοι που απαιτούνται για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης.

SYBR Green	Forward primer (100μM)	Reverse primer (100μM)	H₂O
10 μL	0.04 μL	0,04 μL	5.92 μL

2. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς τεσσάρων σημείων (1x, 1/10, 1/100, 1/1000)
3. Αραίωση δειγμάτων σε τελικό όγκο 50 μL
4. Προσθήκη 4 μL δείγματος και 16 μL master mix. Εκτός από το αρνητικό control (NTC), όλα τα υπόλοιπα δείγματα έγιναν εις τριπλούν. Παρακάτω παρατίθενται οι συνθήκες της αντίδρασης (Πίνακας 3.3-7):

Πίνακας 3.3-7 Συνθήκες της αντίδρασης NS3-3a Real-Time PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	60
Υβριδισμός	58 °C	20 sec	
Σύνθεση και επιμήκυνση	72 °C	20 sec	
Διατήρηση	4 °C	-	-

5. Καμπύλη τήξης: από 70 °C σε 95 °C (αύξηση 0,5 °C /5 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση αναμονή 90 δευτερόλεπτα)

B) Μελέτη της έκφρασης του 18S rRNA :

Υλικά:

1. Μόρια εκκινητές Cτελική=400nM, που παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3-8):

Πίνακας 3.3-8 Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Εκκινητής	Αλληλουχία
q18S-Forward (100μM)	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'
q18S-Reverse (100μM)	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'

2. KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) Kit
3. Υπερκαθαρό δις αποσταγμένο νερό ελεύθερο από RNασες (ddH₂O)
4. Θερμοκυκλοποιητής Corbett (Qiagen)

Πρωτόκολλο: Πραγματοποίηση αντίδρασης qPCR σε παγωμένο μεταλλικό στατώ ειδικό για σωληνάκια 100 μL ως εξής:

1. Παρασκευάστηκε το Master Mix (στον Πίνακα 13 φαίνονται οι όγκοι για μία αντίδραση)

Πίνακας 3.3-9 Όγκοι που απαιτούνται για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης.

SYBR Green	Forward primer (100μM)	Reverse primer (100μM)	H ₂ O
10 μL	0.04 μL	0,04 μL	5,92μL

2. Προετοιμασία καμπύλης αναφοράς τεσσάρων σημείων (1x, 1/4, 1/16, 1/32)
3. Αραίωση 1/5 δειγμάτων σε τελικό όγκο 50 μL
4. Προσθήκη 4 μL δείγματος και 16 μL master mix. Εκτός από το αρνητικό control (NTC), όλα τα υπόλοιπα δείγματα έγιναν εις τριπλούν. Παρακάτω παρατίθενται οι συνθήκες της αντίδρασης (Πίνακας 3.3-10):

Πίνακας 3.3-10 Συνθήκες της αντίδρασης 18S Real-Time PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική Αποδιάταξη	95 °C	3 min	1
Αποδιάταξη	95 °C	15 sec	30
Υβριδισμός	55 °C	20 sec	
Σύνθεση και επιμήκυνση	72 °C	20 sec	
Διατήρηση	4 °C	-	-

5. Καμπύλη τήξης: από 70 °C σε 95 °C (αύξηση 0,5 °C/ 5 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση αναμονή 90 δευτερόλεπτα)

3.4 Τεχνικές Βιοχημείας

3.4.1 Μέτρηση Ενζυμικής Ενεργότητας Ηπατικής Λιπάσης

Για την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της ηπατικής λιπάσης χρησιμοποιήθηκε το Lipase Activity Assay Kit MAK046 της Sigma- Aldrich, τα υλικά και το πρωτόκολλο του οποίου παρατίθενται στη συνέχεια.

Η δραστηριότητα λιπάσης προσδιορίζεται μέσω συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες οδηγούν σε παραγωγή ενός χρωματοφόρου (570 nm) προϊόντος ανάλογου με την ενζυματική δραστηριότητα.

Υλικά:

1. Διάλυμα ανάλυσης λιπάσης (25ml)
2. Υπόστρωμα υπεροξειδάσης σε DMSO (0,2ml)
3. Μείγμα ενζύμων
4. Υπόστρωμα λιπάσης (0,4ml)
5. Πρότυπο γλυκερόλης 100mM (0,2ml)
6. Θετικός μάρτυρας λιπάσης
7. Πλάκα 96 φρεατίων

Εξοπλισμός:

1. Φασματοφωτόμετρο μικροπλακών ορατού φωτός BioRad 680 (φίλτρο των 570nm)
2. Μονοκάναλη πιπέτα
3. Πολυκάναλη πιπέτα

Πρωτόκολλο:

1. Αφήνεται το διάλυμα ανάλυσης λιπάσης να φτάσει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.
2. Θέρμανση του υποστρώματος υπεροξειδάσης στη θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποθήκευση σε χώρο προστατευμένο από υγρασία και φως.
3. Ανασύσταση του ενζυμικού μείγματος με προσθήκη 220μL διαλύματος ανάλυσης λιπάσης, και καλή ανάδευση χωρίς την χρήση vortex.
4. Επαναδιάλυση υποστρώματος λιπάσης με θέρμανση σε υδατόλουτρο 80-100°C για 1 λεπτό έως να θολώσει. Ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση vortex και επανάληψη της διαδικασίας έως ότου το διάλυμα γίνει διαυγές.

5. Ανασύσταση θετικού μάρτυρα λιπάσης με προσθήκη 100μL διαλύματος ανάλυσης λιπάσης, καλή ανάδευση του χωρίς την χρήση vortex και αποθήκευση σε χώρο προστατευμένο από το φως.
6. Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης: Διάλυση 10 μL του πρότυπου γλυκερόλης 100 mM με 990 μL διαλύματος ανάλυσης λιπάσης για τη δημιουργία πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 1 mM. Διαδοχικές αραιώσεις αυτού εντός της πλάκας 96 φρεατίων για την δημιουργία προτύπων συγκέντρωσης 0 (τυφλό), 2, 4, 6, 8, και 10 nmole/φρεάτιο. Προσθήκη διαλύματος ανάλυσης λιπάσης έως τελικού όγκου 50μL.
7. Προσθήκη των δειγμάτων προς μέτρηση στη πλάκα 96 φρεατίων έως τελικού όγκου 50μL. Στο παρόν πείραμα τα δείγματα αφορούν το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό κυταροκαλλιέργειας Huh7.5, ύστερα από την προσθήκη ηπαρίνης 10 units/ml και επώαση για 4ώρες για την απελευθέρωση του ενζύμου από την κυτταρική πλασματική μεμβράνη.
8. Προσθήκη 5μL του διαλύματος θετικού μάρτυρα λιπάσης και προσθήκη διαλύματος ανάλυσης λιπάσης έως τελικού όγκου 50μL σε κάθε φρεάτιο.
9. Δημιουργία των μειγμάτων αντίδρασης σύμφωνα με τον Πίνακα 3.4-1.

Πίνακας 3.4-1 Μείγματα αντιδραστηρίων για τη δοκιμασία μέτρησης της ηπατικής λιπάσης.

Αντιδραστήρια	Πρότυπα και δείγματα (μL)	Τυφλό κάθε δείγματος (μL)
Διάλυμα ανάλυσης λιπάσης	93	96
Υπόστρωμα υπεροξειδάσης	2	2
Μείγμα ενζύμων	2	2
Υπόστρωμα λιπάσης	3	-

10. Προσθήκη 100μL/φρεάτιο των κατάλληλων μειγμάτων αντιδραστηρίων. Καλή ανάδευση είτε με πιπέτα, είτε με οριζόντια κίνηση της πλάκας.
11. Επώαση στους 37 °C. Μετά από 2-3 λεπτά ($T_{initial}$), λήψη της πρώτης μέτρησης απορρόφησης των δειγμάτων ($A570$)_{initial}.
12. Συνέχιση επώασης στους 37 °C, λήψης νέας μέτρησης ανά τακτά χρονικά διαστήματα, έως ότου η απορρόφηση κάποιου δείγματος ξεπεράσει αυτή του πρότυπου με την υψηλότερη συγκέντρωση (10 nmole/φρεάτιο).
13. Ως τελική απορρόφηση ($A570$)_{final} λαμβάνεται η προτελευταία μέτρηση που έχει καταγραφεί πριν ξεπεραστεί η απορρόφηση του πρότυπου με την μεγαλύτερη συγκέντρωση. Η αντίστοιχη χρονική στιγμή ορίζεται ως T_{final} .

Ανάλυση αποτελεσμάτων:

1. Για τη διόρθωση του υποβάθρου, αφαιρείται η τελική μέτρηση $(A570)_{\text{final}}$ του πρότυπου γλυκερόλης 0 (τυφλό) από τις $(A570)_{\text{final}}$ των προτύπων και των δειγμάτων. Οι τιμές υποβάθρου μπορούν να είναι σημαντικές και πρέπει να αφαιρούνται από όλες τις μετρήσεις.
2. Κατασκευή πρότυπης καμπύλης γλυκερόλης.
3. Υπολογισμός της διαφοράς απορρόφησης από τη χρονική στιγμή T_{initial} έως την T_{final} .
4. Αφαίρεση από κάθε δείγμα την απορρόφηση του αντίστοιχου τυφλού.
5. Προσδιορισμός ποσότητας γλυκερόλης (B) από την καμπύλη αναφοράς
6. Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας από την εξίσωση:

$$\text{Ενζυμική ενεργότητα} = \frac{B * \text{Συντελεστής αραίωσης}}{\text{Χρόνος αντίδρασης} * V}$$

Όπου,

B = Ποσότητα (nmole) γλυκερόλης που παράγεται μεταξύ T_{initial} και T_{final} .

Χρόνος αντίδρασης = $T_{\text{final}} - T_{\text{initial}}$ (λεπτά)

V = όγκος δείγματος (mL/φρεάτιο)

Η ενζυμική ενεργότητα της ηπατικής λιπάσης μετριέται σε nmole/min/mL = milliunit/mL, όπου 1 unit, ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που θα παράξει 1.0 μmole γλυκερόλης από τριγλυκερίδια το λεπτό στους 37 °C.

3.4.2 Προσδιορισμός Ενδοκυττάριας Συγκέντρωσης Τριγλυκεριδίων

Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων χρησιμοποιήθηκε το Triglyceride Assay Kit Cat# TG-1-NC της Zen-Bio, τα υλικά και το πρωτόκολλο του οποίου παρατίθενται στη συνέχεια.

Υλικά:

1. Διάλυμα πλύσης (50ml)
2. Διάλυμα λύσης των κυττάρων (25ml)
3. Αντιδραστήριο A (25ml)
4. Αντιδραστήριο B (2.5ml)
5. Πρότυπο γλυκερόλης 1 mM (50ml)

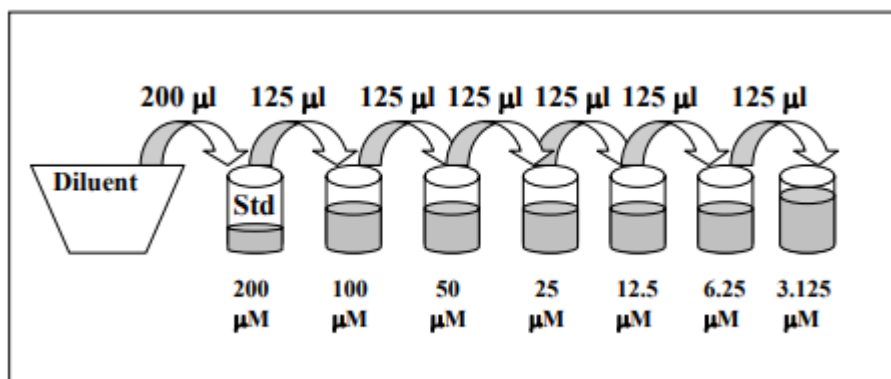
6. Πρότυπο αραιώσης (2ml)
7. Πλάκα 96 φρεατίων

Εξοπλισμός:

1. Φασματοφωτόμετρο μικροπλακών ορατού φωτός BioRad 680 (φίλτρο των 540nm)
2. Μονοκάναλη πιπέτα
3. Πολυκάναλη πιπέτα

Πρωτόκολλο:

1. Θέρμανση διαλυμάτων πλύσης και λύσης στους 37°C σε υδατόλουτρο.
2. Προετοιμασία του αντιδραστηρίου Β με προσθήκη σε αυτό 2.5ml δις απεσταγμένου νερού και ελαφριά ανάδευση. Δεν πρέπει να γίνει ανάδευση με vortex. Παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απουσία φωτός.
3. Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από την κυτταροκαλλιέργεια (τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκα 96 φρεατίων) και επακολούθως πλύση των κυττάρων με 15 μL/φρεάτιο διαλύματος πλύσης.
4. Αφαίρεση του διαλύματος πλύσης και προσθήκη 15μL/φρεάτιο διαλύματος λύσης .
5. Επώαση στους 37°C για 20 λεπτά.
6. Με το πέρας της επώασης, ελέγχεται οπτικά στο μικροσκόπιο η λύση των κυττάρων.
7. Προσθήκη 135μL/φρεάτιο διαλύματος πλύσης.
8. Προσθήκη 20 μL/φρεάτιο αντιδραστηρίου Β και ελαφριά ανακίνηση της πλάκας
9. Επώαση στους 37°C για 2 ώρες.
10. Μία ώρα πριν την δοκιμή:
 - a. Θέρμανση του αντιδραστηρίου Α σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και του πρότυπου αραιώσης στους 37°C.
 - b. Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης: Προσθήκη 200μL στο πρότυπο γλυκερόλης (1mM). Διαδοχικές αραιώσεις του προκύπτοντος διαλύματος γλυκερόλης (200 μM), όπως φαίνονται στην Εικόνα 3.4-1 Ως μηδενικό πρότυπο χρησιμοποιείται το πρότυπο διάλυμα αραιώσης.
 - c. Προετοιμασία αντιδραστηρίου Α με την προσθήκη 11.0μL δις απεσταγμένου νερού και ελαφριά ανάδευση. Δεν πρέπει να γίνει ανάδευση με vortex. Στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απουσία φωτός.



Εικόνα 3.4-1 Απεικόνιση διαδικασίας διαδοχικών αραιώσεων της πρότυπης καμπύλης αναφοράς

11. Σε μία νέα πλάκα 96 φρεατίων προστίθενται 80μL/φρεάτιο διαλύματος πλύσης
12. Πολύ καλή ανάδευση κυτταρολύματος και άμεση μεταφορά 20μL/φρεάτιο αυτού στη νέα πλάκα. Ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει είναι ίσος με 5.
13. Ετοιμασία καμπύλης αναφοράς, προσθήκη 100μL/φρεάτιο κάθε πρότυπου αραιώσης.
14. Προσθήκη 100μL/φρεάτιο στα δείγματα και στα πρότυπα. Ελαφριά ανάδευση τους με τη χρήση πιπέτας.
15. Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά.
16. Μέτρηση απορροφήσεων στα 540nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών BioRad.

Ανάλυση Αποτελεσμάτων :

Η ανάλυση βασίζεται στην εξίσωση:

1M τριγλυκεριδίων -> 1M γλυκερόλη + ελεύθερα λιπαρά οξέα

Το kit αυτό μετρά τη συγκέντρωση γλυκερόλης που απελευθερώνεται μετά την λύση των κυττάρων και την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων. Η συγκέντρωση τριγλυκεριδίων μπορεί συνεπώς να προσδιοριστεί από τις τιμές γλυκερόλης μέσω της εξίσωσης ελαχίστων τετραγώνων της πρότυπης καμπύλης που έχει κατασκευαστεί.

3.5 Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού

3.5.1 Χρώση BODIPY και Hoechst

Η BODIPY (493/503) είναι μια χρωστική, η οποία λόγω της μη-πολικής δομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χρώση ουδέτερων λιπιδίων και άλλων μη πολικών λιπιδίων. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιείται για την χρώση των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων.

Η Hoechst είναι μια χρωστική η οποία συμπλέκεται επιλεκτικά με τις DNA βάσεις Αδενίνη και Θυμίνη και η οποία διεγείρεται από υπεριώδες φως και εκπέμπει μπλε φθορισμό στα 460 έως 490 nm. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την χρώση του πυρήνα των κυττάρων.

Υλικά:

1. Χρωστική BODIPY
2. Χρωστική Hoechst
3. Φορμαλίνη 4% (v/v)
4. PBS
5. Ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης (Γλυκίνη 100mM, 0,1% (v/v)_Triton-X σε PBS)
6. Mowiol 4-88 (Sigma) mounting medium

Πρωτόκολλο:

1. Ηπατικά κύτταρα έχουν επιστρωθεί σε κατάλληλες καλυπτρίδες, διαμέτρου 10mm (VWR) εντός φρεατίων πλακών κυτταροκαλλιέργειας 24ρων φρεατίων από την προηγούμενη μέρα, προκειμένου να έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια τους.
2. Αφαιρείται προσεκτικά το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με διάλυμα PBS.
3. Το διάλυμα PBS δεν αφαιρείται τη δεύτερη φορά και μεταφέρεται η πλάκα κυτταροκαλλιέργειας σε χημικό απαγωγό αερίων προκειμένου να ακολουθήσει η μονιμοποίηση των κυττάρων με διάλυμα φορμαλίνης.
4. Το διάλυμα φορμαλίνης είναι 4% (v/v) αραιωμένο σε PBS. Προσθήκη 200 μL φορμαλίνης σε κάθε φρεάτιο της πλάκας. Αναμονή για 12 λεπτά και έκπλυση με PBS εις διπλούν.
5. Προστίθενται 200 μL/φρεάτιο ρυθμιστικό διάλυμα εξουδετέρωσης για 10 λεπτά.
6. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS.
7. Προσθήκη 200 μL/φρεάτιο της χρωστικής Hoechst (αραιώση 1:1000 σε διάλυμα PBS) για 10 λεπτά.

8. Πλύση των φρεατίων με διάλυμα PBS εις τριπλούν.
9. Προσθήκη 200 μ L/φρεάτιο της χρωστικής BODIPY (αραίωση 1:10.000 σε διάλυμα PBS) για 3 λεπτά.
10. Έκπλυση με διάλυμα PBS επί 5 φορές.
11. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα Mowiol mounting medium.
12. Σταθεροποίηση καλυπτρίδας με βερνίκι νυχιών.
13. Παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού και λήψη φωτογραφιών των συμμασμένων λιποσταγονιδίων. Για την μελέτη και λήψη εικόνων των χρώσεων των λιποσταγονιδίων χρησιμοποιήθηκε το συνεστιακό μικρόσκοπιο φθορισμού Leica SP8 TCS, του τμήματος Οπτικής Μικροσκοπίας του Ε.Ι.Π.

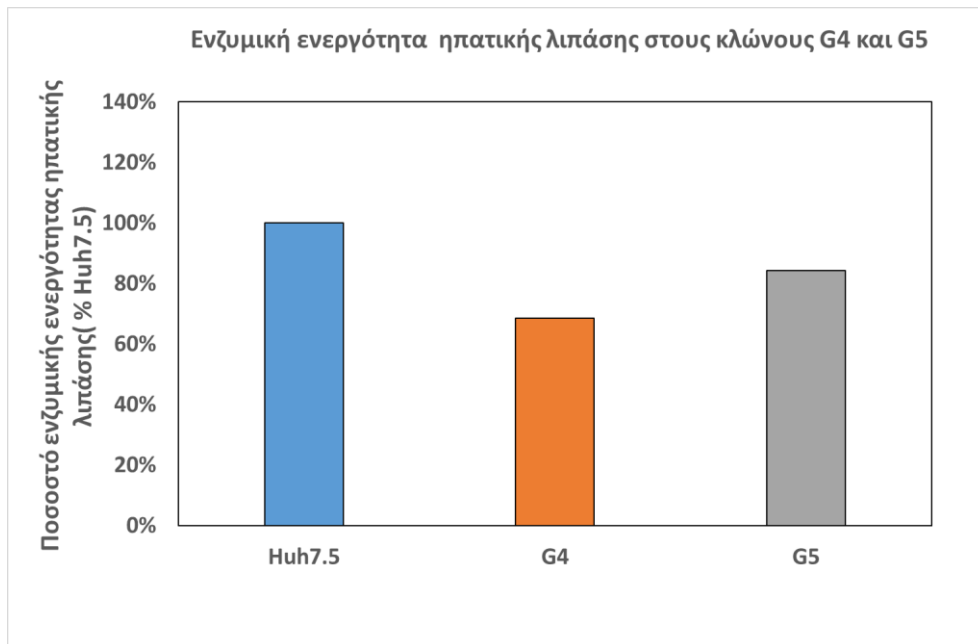
4 Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός επιπέδων ενζυμικής ενεργότητας ηπατικής λιπάσης (HL)

Όπως αναφέρθηκε στο Θεωρητικό Μέρος, οι ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού ANGPTL-3 και ANGPTL-4 αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL). Ταυτόχρονα έχει δειχθεί πως υπάρχει αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της εκκρινόμενης ANGPTL-3 και της HL στο ανθρώπινο πλάσμα [80] ενώ σε διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έχει διαγραφεί το γονίδιο της ANGPTL-3 από το γενετικό υλικό τους (ANGPTL-3 knockouts), η ενεργότητα της HL βρέθηκε αυξημένη [81]. Ωστόσο, ασαφής παραμένει η επίδραση της υπερέκφρασης των ANGPTLs στην ενεργότητα της HL. Επομένως, σκοπός του πειράματος αυτού είναι η ανάπτυξη μεθόδου, έτσι ώστε να γίνει έλεγχος της δράσης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στην ενζυμική ενεργότητα της ηπατικής λιπάσης (HL) σε καλλιέργεια ηπατοκυττάρων Huh7.5 (πατρική κυτταροσειρά μάρτυρας) και σε σταθερές κυτταροσειρές υπερέκφρασης των ANGPTL-3 (κλώνος G4) και ANGPTL-4 (κλώνος G5). Η καλλιέργεια έγινε σε πλάκα 6 φρεατίων με 500.000 κύτταρα/φρεάτιο.

Προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα της HL, προστέθηκε ηπαρίνη (10 units/ml) στο θρεπτικό υλικό της κυτταροκαλλιέργειας, έτσι ώστε να αποδεσμευτεί η HL από την εξωτερική επιφάνεια των ηπατοκυττάρων με την οποία είναι συνδεδεμένη μέσω μορίων πρωτεογλυκάνης [82]. Μετά από επώαση στους 37°C για 4 ώρες, λήφθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό στο οποίο πλέον είχε ελευθερωθεί η ενεργή HL και πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου kit (Lipase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι". Τελικά, η ενζυμική ενεργότητα προέκυψε φασματοφωτομετρικά βάσει των απορροφήσεων των δειγμάτων στο πέρασμα του χρόνου στα 570nm και με τη χρήση πρότυπης καμπύλης.

Πρώτα μελετήθηκε ο κλώνος υπερέκφρασης της ANGPTL-3, G4. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 4.1-1, η ενζυμική ενεργότητα της ηπατικής λιπάσης στον κλώνο G4 βρέθηκε μειωμένη κατά 32% συγκριτικά με την πατρική κυτταροσειρά Huh7.5. Αντίστοιχα, στον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-4, G5, παρατηρήθηκε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας της HL συγκριτικά με την κυτταροσειρά Huh7.5, αυτή τη φορά ίση με 20%. Σημειώνεται λοιπόν, πως ο κλώνος G5 εμφανίζει μικρότερη μείωση σε ενεργή HL σε σχέση με αυτή του G4.



Γράφημα 4.1-1 Ενζυμική ενεργότητα ηπατικής λιπάσης στους κλώνους G4 και G5. Στον άξονα Y η ενζυμική ενεργότητα παρουσιάζεται ως ποσοστό της αντίστοιχης ενζυμικής ενεργότητας του μάρτυρα Huh7.5, η οποία έχει πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας.

4.2 Προσδιορισμός επιπέδων ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων

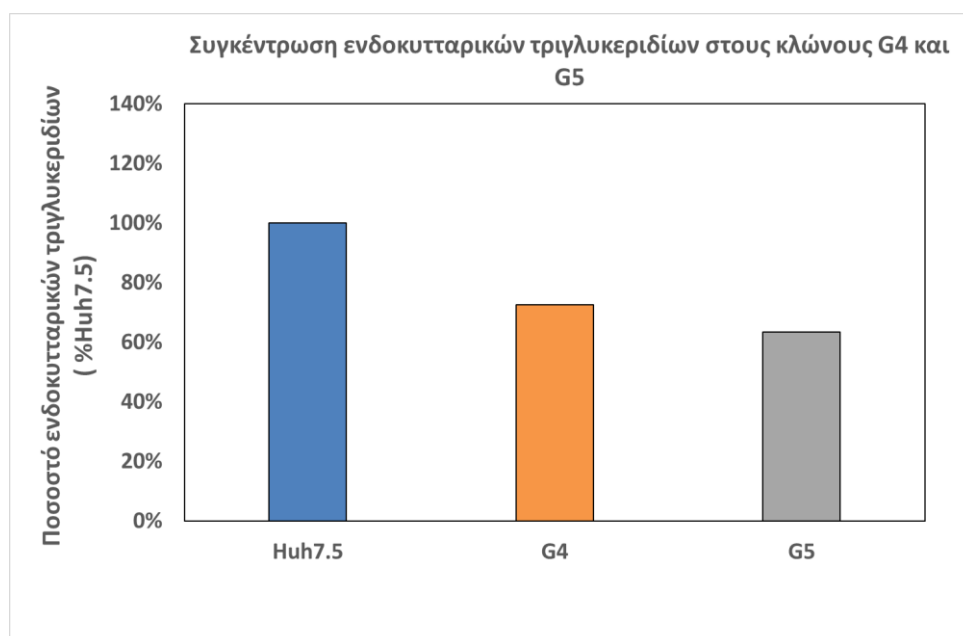
4.2.1 Προσδιορισμός ενδογενών επιπέδων ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4) και ANGPTL-4 (G5)

Τα τριγλυκερίδια είναι μια πολύ σημαντική τάξη λιπιδίων για τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό, καθώς εντοπίζονται σε σημαντικές ποσότητες σε διάφορα είδη λιποπρωτεϊνών και στα λιποσταγονίδια. Δεδομένης της ρυθμιστικής δράσης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στο μεταβολισμό των λιπιδίων μέσω μερικής της αναστολής της δράσης της ηπατικής λιπάσης, που δείχθηκε στην παράγραφο 4.1 προηγουμένως, στο παρόν πείραμα ελέγχθηκαν οι πιθανές διαφοροποιήσεις στη συσσώρευση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων του κυττάρου που προκαλούνται στο κλώνους υπερέκφρασης G4 και G5, με απώτερο στόχο τον έλεγχο της λειτουργικότητας αυτών των κλώνων.

Προκειμένου να γίνει η μέτρηση των ενδογενών επιπέδων ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων, καλλιεργήθηκαν σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 φρεατίων (12.000 κύτταρα/φρεάτιο), οι ηπατικές κυτταροσειρές Huh7.5, G4 και G5. Στη συνέχεια μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού έγινε η λύση των κυττάρων ακολουθούμενη από μία σειρά ενζυμικών αντιδράσεων με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου kit (Triglyceride Assay Kit, Zen-Bio), το πρωτόκολλο του

οποίου αναφέρεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” και βάσει του οποίου η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων προέκυψε φασματοφωμετρικά από τις απορροφήσεις των δειγμάτων στα 540nm και με την χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Μελετώντας αρχικά τον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-3, G4, βάσει των μετρήσεων απορρόφησης παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων συγκριτικά με την κυτταροσειρά μάρτυρα (Huh7.5). Ειδικότερα, όπως γίνεται αντιληπτό από το Γράφημα 4.2-1 σημειώθηκε μείωση ίση με 30%. Παρόμοια και στον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-4, G5, παρατηρήθηκε μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα ίση με 37%. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αναστολή της ενζυμικής δράσης της HL, από τις ANGPTL-3 και ANGPTL-4, η οποία οδήγησε σε ελαττωμένη υδρόλυση των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνικών υποστρωμάτων της HL και κατά συνέπεια μειωμένη πρόσληψη λιπιδίων από το ηπατοκύτταρο.



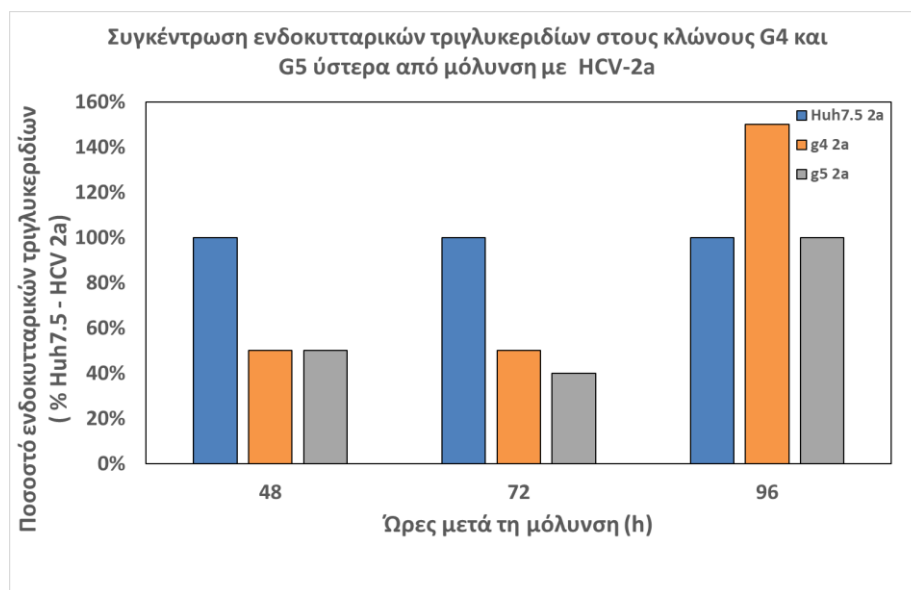
Γράφημα 4.2-1 Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στους κλώνους G4 και G5. Στον άξονα Y εμφανίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων ως ποσοστό της αντίστοιχης συγκέντρωσης του μάρτυρα, Huh7.5, η οποία έχει πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας.

4.2.2 Επίδραση της HCV μόλυνσης στα επίπεδα ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων των κυτταροσειρών υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4) και ANGPTL-4 (G5)

Σε συνέχεια των προηγούμενων αποτελεσμάτων επιχειρήθηκε η μελέτη της επίδρασης της μόλυνσης με τα εργαστηριακά στελέχη του ιού HCV, HCV JFH-1 (genotype 2a, HCV-2a) και HCV DBN3a (genotype

3a, HCV-3a) στη συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων των κλώνων G4 και G5, καθώς και της πατρικής κυτταροσειράς μάρτυρα Huh7.5.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του HCV JFH-1 στελέχους στα επίπεδα ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων. Οι κυτταροκαλλιέργειες σε πλάκα 96 φρεατίων (12.000 κύτταρα/φρεάτιο) των κλώνων G4, G5 και κυτταροσειράς μάρτυρα Huh7.5 μολύνθηκαν με ένα ιικό σωματίδιο ανά κύτταρο (MOI = 1) ακολουθώντας το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” και επώαστηκαν για 96 ώρες στους 37°C. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων έγινε σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία, προκειμένου να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της επίδρασης του ιού ανάλογα με το στάδιο του κύκλου ζωής του. Ειδικότερα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στις 48, 72 και 96 ώρες. Η μέτρηση έγινε με τη βοήθεια ενός εμπορικά διαθέσιμου kit (Triglyceride Assay Kit, Zen-Bio), ενώ η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων προκύπτει φασματοφωμετρικά από τις απορροφήσεις των δειγμάτων στα 540nm, και με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

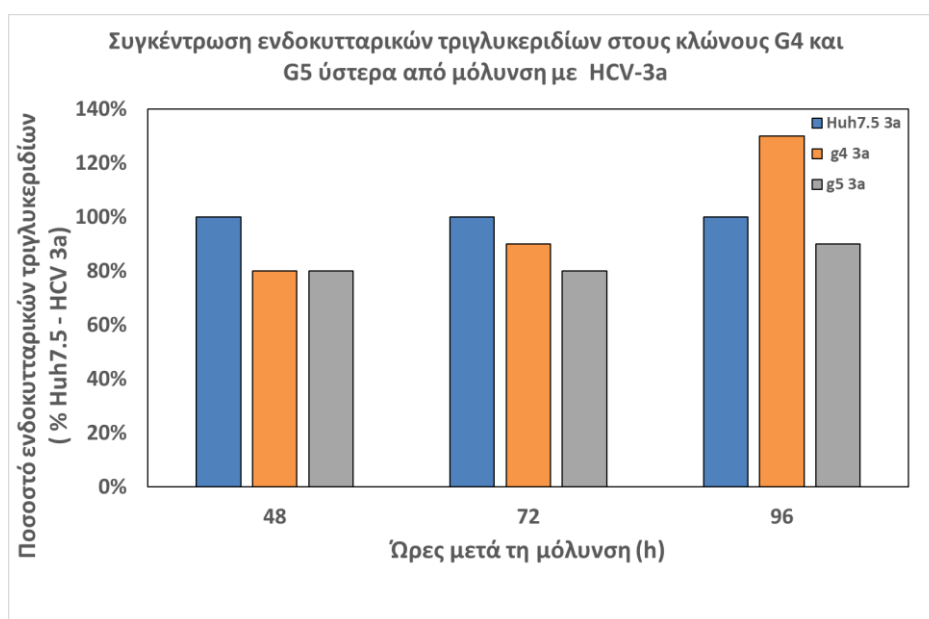


Γράφημα 4.2-2 Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στους κλώνους G4 και G5, για τις χρονικές στιγμές των 48, 72, 96 ωρών, ύστερα από μόλυνση με HCV-2a. Στον άξονα Y εμφανίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων ως ποσοστό της αντίστοιχης συγκέντρωσης του μολυσμένου μάρτυρα, Huh7.5-HCV 2a, η οποία έχει πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας.

Ξεκινώντας με τον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-3, G4, όπως φαίνεται στο Γράφημα 4.2-2, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στις 48 και 72 ώρες, ενώ στις 96 ώρες προέκυψε σημαντική αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα (Huh7.5 μολυσμένα με HCV JFH-1). Αναλυτικότερα, 48 έως 72 ώρες μετά τη μόλυνση, η συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων βρέθηκε μειωμένη κατά 50%, ενώ στις 96 ώρες μετά τη μόλυνση αυξήθηκε κατά 50%.

Αντίστοιχα, στον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-4, G5, οι αλλαγές της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων εμφάνισαν παρόμοιο μοτίβο με τον κλώνο G4. Ποσοστιαία, στις 48 ώρες η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων μειώθηκε κατά 50%, στις 72 ώρες κατά 60% και στις 96 ώρες μετά τη μόλυνση δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή σε σχέση με την κυτταροσειρά μάρτυρα.

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του στελέχους HCV-3a στα επίπεδα ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων. Το πρωτόκολλο της μόλυνσης, η χρονική διάρκεια και οι συνθήκες επώασης παρέμειναν οι ίδιες, όπως για την μόλυνση με HCV-2a. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά Huh7.5, η οποία μολύνθηκε και εκείνη με τον HCV-3a. Ακόμα, η μέτρηση του επιπέδου των τριγλυκεριδίων πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως.



Γράφημα 4.2-3 Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στους κλώνους G4 και G5, για τις χρονικές στιγμές των 48, 72, 96 ωρών, ύστερα από μόλυνση με HCV-3a. Στον άξονα Y εμφανίζεται η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων ως ποσοστό της αντίστοιχης συγκέντρωσης του μολυσμένου μάρτυρα, Huh7.5-HCV 3a, η οποία έχει πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας.

Η επίδραση του HCV-3a στελέχους στα επίπεδα ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων των κλώνων φαίνεται να προκαλεί παρόμοιες αλλαγές με αυτή του HCV-2a. Όσον αφορά τον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-3, G4, όπως γίνεται αντιληπτό στο Γράφημα 4.2-3, στις 48 και στις 72 ώρες από την μόλυνση η συγκέντρωσή των τριγλυκεριδίων βρέθηκε μειωμένη σε σύγκριση με τον μάρτυρα, ενώ στις 96 ώρες παρατηρήθηκε και αυτή τη φορά αύξηση. Ειδικότερα, στις 48 ώρες η συγκέντρωση μειώθηκε κατά 20%, στις 72 ώρες κατά 10% και στις 96 ώρες αυξήθηκε κατά 30%. Στον κλώνο υπερέκφρασης της ANGPTL-4, G5, παρατηρήθηκε μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα και στα τρία χρονικά σημεία. Στις 48 και στις 72 ώρες η συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων μειώθηκε κατά 20%, ενώ στις 96 ώρες κατά 10%.

Συνολικά διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στην μόλυνση με HCV-2a οδηγεί σε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με την μόλυνση με HCV-3a , για τις χρονικές στιγμές των 48 και 72 ωρών. Τέλος, και στις δύο μολύνσεις την χρονική στιγμή των 96 ωρών παρατηρείται στον κλώνο G4 σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων, αποτέλεσμα το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο.

4.3 Παρατήρηση και ποιοτική εκτίμηση αριθμού κυτταρικών λιποσταγονιδίων με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού

4.3.1 Παρατήρηση ενδογενών κυτταρικών λιποσταγονιδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και LSD1 (Hu1b)

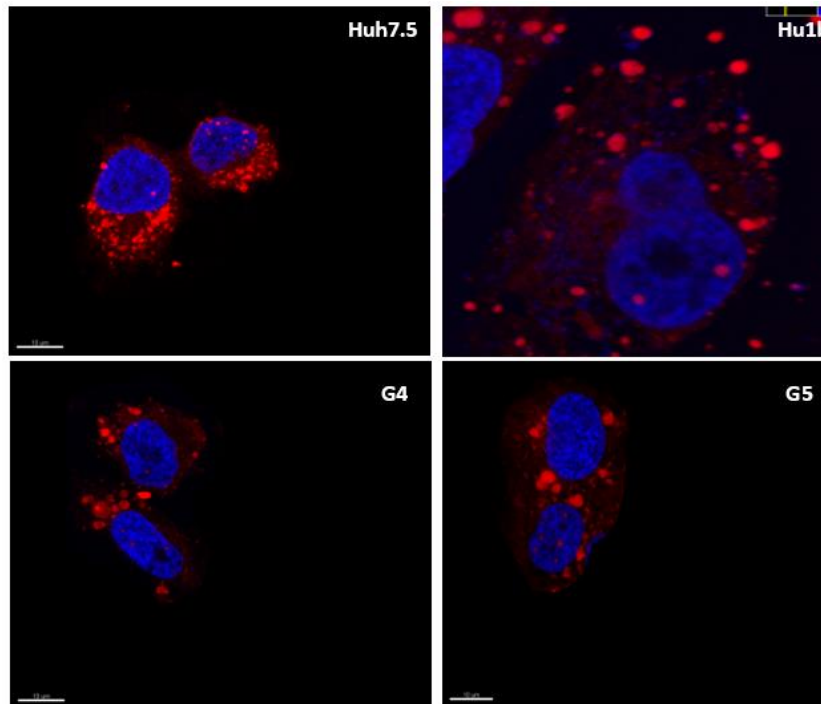
Τα λιποσταγονίδια, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελούν δυναμικά οργανίδια των κυττάρων λειτουργώντας ως αποθήκες λιπιδίων και έχοντας σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του λιπιδικού μεταβολισμού. Δεδομένης της ανασταλτικής δράσης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στη δράση της λιπάσης HL και της χαμηλότερης συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων κατά την υπερέκφραση αυτών των ρυθμιστικών γονιδίων, μελετήθηκε σε αυτό το πείραμα η πιθανότητα μειωμένης συσσώρευσης λιπιδίων με τη μορφή λιποσταγονιδίων εντός των κυττάρων στους κλώνους G4 και G5 αντίστοιχα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρωτεΐνη LSD1 είναι ένα επιγενετικός παράγοντας με σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον λιπιδικό μεταβολισμό μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με αυτόν. Επιπλέον, σύμφωνα με πρώιμες μελέτες του εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του Ε.Ι.Π., υπάρχει αλληλεπίδραση της LSD1 με τον HCV και με τον ρυθμό αναδιπλασιασμού του, ενώ δείχθηκε πως υπερέκφραση της LSD1, οδήγησε στον διπλασιασμό των επιπέδων mRNA της ANGPTL-3. Στο πλαίσιο, λοιπόν, αυτών των ενδείξεων, μελετήθηκε και η επίδραση της υπερέκφρασης της LSD1, από τον κλώνο Hu1b, στη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πατρική κυτταροσειρά Huh7.5.

Για την μελέτη των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων, στις κυτταροσειρές G4, G5, Hu1b και Huh7.5, πραγματοποιήθηκε χρώση 30.000 κυττάρων/φρεάτιο σε πλάκα 24 φρεατίων αυτών με την φθορίζουσα χρωστική BODIPY, η οποία προσδένεται σε ουδέτερα λιπίδια, ενώ για την χρώση του πυρήνα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική Hoechst, η οποία παρουσιάζει εκλεκτικότητα για τις πυριμιδινικές βάσεις A και T. Οι χρώσεις έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο

που περιγράφεται το κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι". Η λήψη των εικόνων έγινε με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού Leica SP8 TCS.

Τα αποτελέσματα από την χρώση των ενδογενών λιποσταγονιδίων των τριών κλώνων και της κυτταροσειράς μαρτυρα φαίνονται στην Εικόνα 4.3-1. Συγκεκριμένα, μια πρώτη ποιοτική εκτίμηση του αριθμού των λιποσταγονιδίων οδήγησε στο συμπέρασμα πως αυτά ήταν εμφανώς μειωμένα και στους τρεις κλώνους G4, G5 και Hu1b, σε σχέση με τον μάρτυρα.

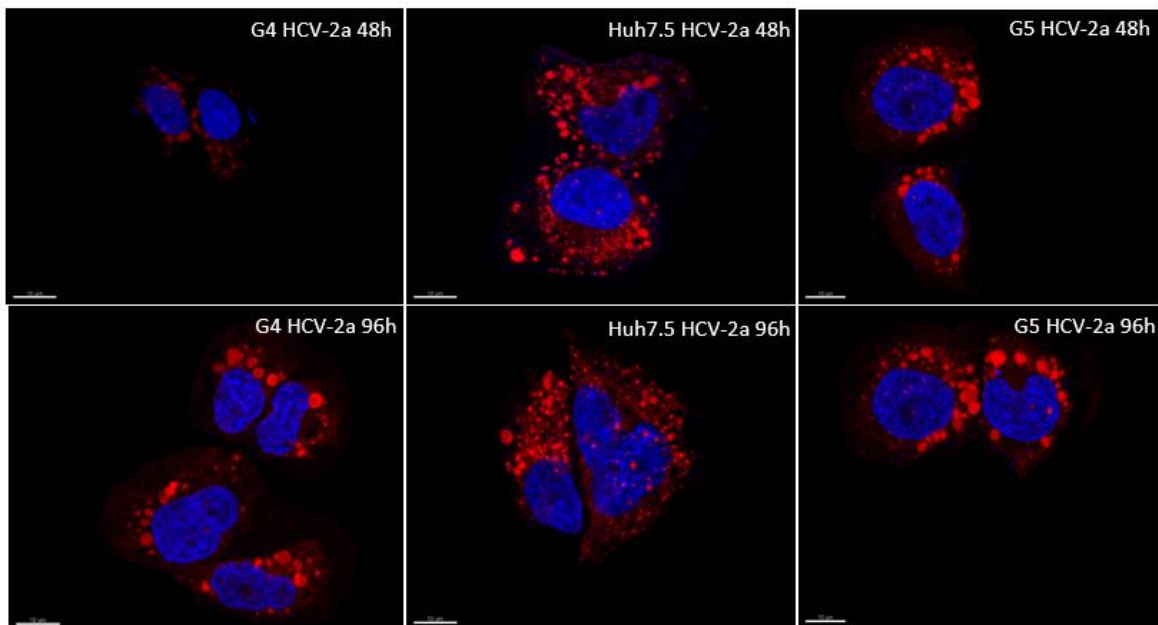


Εικόνα 4.3-1 . Χρώση ενδογενών ηπατικών λιποσταγονιδίων με BODIPY (κόκκινο) και πυρήνων μεHoechst (μπλε) στις κυτταρικές σειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5), LSD1 (Hu1b) και στην πατρική σειρά μάρτυρα Huh7.5. Για τις φωτογραφίες των Huh7.5, G4 και G5 χρησιμοποιήθηκε μεγέθυνση 10x, ενώ για την σειρά Hu1b η αντίστοιχη μεγέθυνση ήταν 20x.

4.3.2 Επίδραση της HCV μόλυνσης στα κυτταρικά λιποσταγονίδια των κυτταροσειρών υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και LSD1 (Hu1b)

Σε συνέχεια του προηγούμενου πειράματος και λόγω του σημαντικού ρόλου των λιποσταγονιδίων για τον αναδιπλασιασμό του HCV, τον ορθό σχηματισμό ιικών σωματιδίων και την επιτυχημένη έκκριση τους από το κύτταρο, στο παρόν πείραμα μελετήθηκαν οι αλλαγές στη συσσώρευση λιπιδίων ενδοκυτταρικά μέσω των αλλαγών στον αριθμό των λιποσταγονιδίων, ύστερα από μόλυνση με τους εργαστηριακούς κλώνους HCV-2a και HCV-3a. Συγκεκριμένα, σε αυτή την προκαταρκτική μελέτη, πραγματοποιήθηκαν μολύνσεις των κλώνων υπερέκφρασης της ANGPTL-3, G4, και της ANGPTL-4, G5,

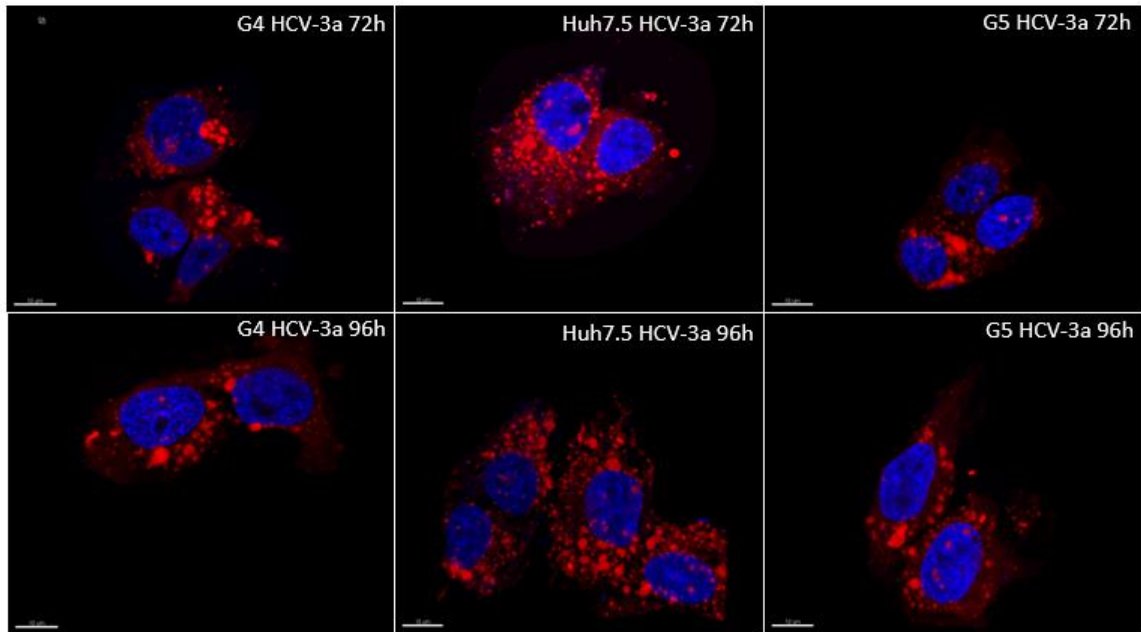
σε πλάκα 24 φρεατίων (30.000 κύτταρα/φρεάτιο) και με τους δύο ιούς, ωστόσο για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, τα οποία ήταν εξάρτηση της κορύφωσης του ιικού αναδιπλασιασμού σύμφωνα με την βιβλιογραφία και την προηγούμενη εμπειρία του Εργαστηρίου Μοριακής Ιολογίας του ΕΙΠ. Έτσι, για τον HCV-2a, του οποίου ο αναδιπλασιασμός κορυφώνεται στις 48 ώρες και η έκκριση έχει ολοκληρωθεί μέχρι τις 96 ώρες, η μονιμοποίηση και η χρώση των κυττάρων έγινε στις 48 και 96 ώρες μετά την μόλυνση. Αντίθετα, ο HCV-3a παρουσιάζει υψηλό αναδιπλασιασμό πιο αργά προς τις 72 και 96 ώρες και χωρίς σημαντική πτώση για αρκετές μέρες (προφορική επικοινωνία ΥΔ. Β. Βαλιάκου), επομένως οι ώρες που επιλέχθηκαν για μονιμοποίηση και χρώση των μολυσμένων κυττάρων ήταν οι 72 και 96 ώρες μετά την μόλυνση. Για τους ίδιους λόγους και λόγω χρονικών περιορισμών, οι 96 ώρες μετά τη μόλυνση με την μόλυνση με τον HCV-3a ελέγχθηκαν και στον κλώνο υπερέκφρασης της LSD1, Hu1b. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά Huh7.5 που μολύνθηκε με τον HCV-3a και τον HCV-2a αντίστοιχα.



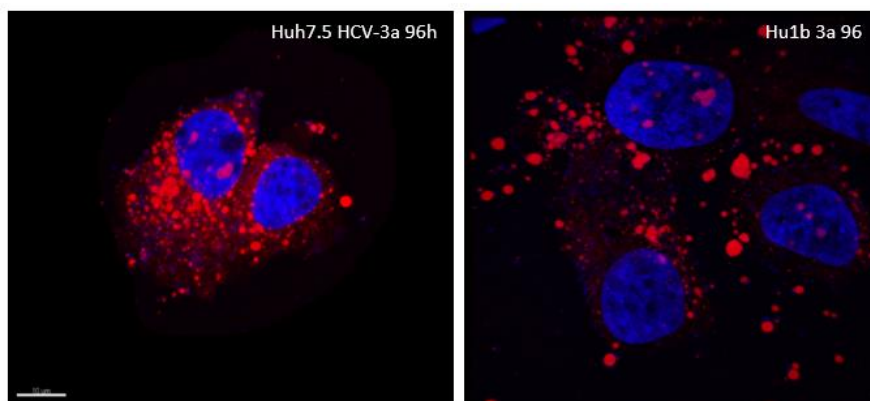
Εικόνα 4.3-2 Χρώση ενδογενών ηπατικών λιποσταγονιδίων με BODIPY (κόκκινο) και πυρήνων μεHoechst (μπλε) στις κυτταρικές σειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και στην πατρική σειρά μάρτυρα Huh7.5, στις 48 ώρες και 96 ώρες μετά την μόλυνση με τον HCV-2a. Για τις φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκε μεγέθυνση 10x.

Στις εικόνες που ελήφθησαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 4.3-3) και μετά από ποιοτική οπτική εκτίμηση έγινε αντιληπτό, πως ο αριθμός των λιποσταγονιδίων στους κλώνους G4 και G5, ύστερα από μόλυνση με τον HCV-2a παρέμεινε μικρότερος σε σχέση με την μολυσμένη κυτταροσειρά Huh7.5 και στις δύο χρονικές στιγμές. Παρομοίως, τα ενδοκυτταρικά λιποσταγονίδια διατηρήθηκαν μειωμένα και στην περίπτωση μόλυνσης των κλώνων G4 και G5 με τον HCV-3a (Εικόνα 4.3-3), και μάλιστα καθ' όλη τη διάρκεια της μόλυνσης σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα.

Τέλος, όσον αφορά τη διερευνητική μελέτη του αριθμού των λιποσταγονιδίων στον κλώνο Hu1b ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 4.3-4, παρατηρήθηκε μείωση των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων συγκριτικά με τη μολυσμένη πατρική σειρά και σε αυτή τη περίπτωση. Συνολικά, λοιπόν, παρατηρείται μείωση των λιποσταγονιδίων σε όλους τους κλώνους υπερέκφρασης.



Εικόνα 4.3-3 Χρώση ενδογενών ηπατικών λιποσταγονιδίων με BODIPY (κόκκινο) και πυρήνων μεHoechst (μπλε) στις κυτταρικές σειρές υπερέκφρασης ANGPTL-3 (G4), ANGPTL-4 (G5) και στην πατρική σειρά μάρτυρα Huh7.5, στις 72 ώρες και 96 ώρες μετά την μόλυνση με τον HCV-3a. Για τις φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκε μεγέθυνση 10x.



Εικόνα 4.3-4 Χρώση ενδογενών ηπατικών λιποσταγονιδίων με BODIPY (κόκκινο) και πυρήνων μεHoechst (μπλε) στην κυτταρική σειρά υπερέκφρασης LSD1 (Hu1b) και στην πατρική σειρά μάρτυρα Huh7.5, στις 96 ώρες μετά την μόλυνση με τον HCV-3a. Για τη φωτογραφία της κυτταροσειράς Huh7.5 χρησιμοποιήθηκε μεγέθυνση 10x και για την Hu1b 20x.

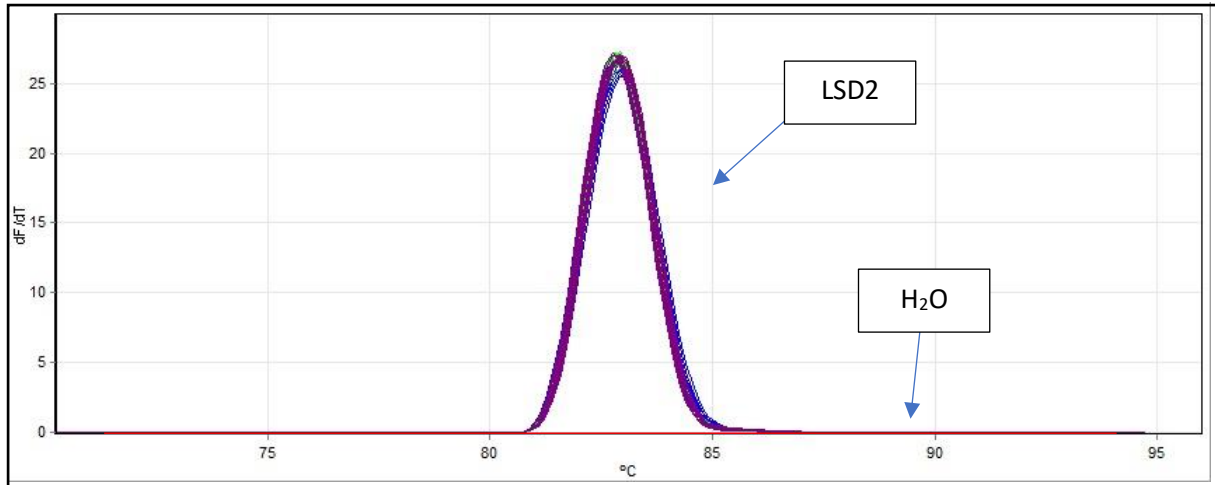
4.4 Επίδραση της HCV μόλυνσης στα ενδογενή επίπεδα mRNA του επιγενετικού παράγοντα LSD2 σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα

Η LSD2 είναι μια απομεθυλάση που παρουσιάζει δομική και λειτουργική συγγένεια με την LSD1 και έχει δειχθεί πως επηρεάζει επιγενετικά τον λιπιδικό μεταβολισμό, παρ' όλα αυτά ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για αυτήν. Σε αυτό το πλαίσιο, διερευνήθηκε εάν ο HCV επηρεάζει την γονιδιακή έκφραση και συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA του μορίου αυτού. Αρχικά, λοιπόν, 300.000 ηπατοκύτταρα Huh7.5/ φρεάτιο σε πλάκα 12 φρεατίων μολύνθηκαν για 12, 24, 48, 72 και 96 ώρες με το εργαστηριακό στέλεχος HCV-3a με MOI = 1. Τα κύτταρα που συλλέχθηκαν σε χρονικό διάστημα καταψύχθηκαν άμεσα και μετά το πέρας της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού (κυτταρικού και ιικού RNA) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Nucleozol (Macherey-Nagel). Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nanodrop για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA που απομονώθηκε, καθώς και την εκτίμηση της ποιότητάς του με μέτρηση των λόγων απορροφήσεως A260/280 και A260/230. Ακολούθησε μετατροπή του RNA σε cDNA με αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιώντας 1μg RNA για όλα τα δείγματα και το ένζυμο MMLV (Promega).

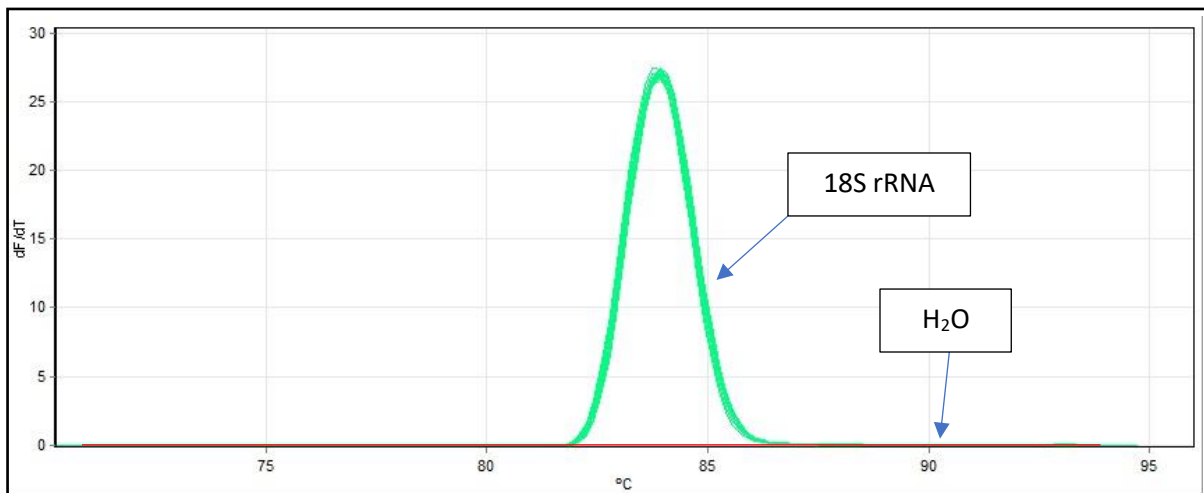
Στο επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση qPCR τριών βημάτων (αποδιάταξη μήτρας cDNA – υβριδισμός εκκινητών – επιμήκυνση νέων αλυσίδων) για τα γονίδια LSD2 και 18S rRNA. Η ειδικότητα των παραγόμενων προϊόντων ελέγχθηκε με την καμπύλη τήξης (Εικόνα 4.4-1 και Εικόνα 4.4-2). Οι μοναδικές κορυφές που ανιχνεύθηκαν καταδεικνύουν την απόλυτη ειδικότητα των παραγόμενων προϊόντων των qPCR αντιδράσεων.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, έγινε πολλαπλασιασμός με το δείκτη αραιώσεως των δειγμάτων όπου είχαν πραγματοποιηθεί αραιώσεις. Μετά από αυτή τη διαδικασία, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε δείγμα διαιρέθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές του 18S rRNA και έγινε η σύγκριση των τελικών λόγων. Αρχικά προσδιορίστηκαν τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης mRNA της LSD2 σε μη μολυσμένη κυτταροσείρα Huh7.5 κατά τη διάρκεια πολυήμερης καλλιέργειας (έως 96 ώρες). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μη μολυσμένο (mock-infected) δείγμα Huh7.5 κύτταρων της χρονικής στιγμής των 12 ωρών του οποίου η τιμή τέθηκε αυθαίρετα ως μονάδα, ώστε να καταγραφούν αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου LSD2 οι οποίες σχετίζονταν με αλλαγές στο καλλιεργητικό υλικό, στο pH, στον κυτταρικό κύκλο κ.α (Πίνακας 4.4-1 Τιμές απόλυτης και σχετικής έκφρασης ενδογενών επιπέδων mRNA LSD2 στα δείγματα των μη μολυσμένων κυττάρων Huh7.5 ανά χρονική στιγμή. Οι αναγραφόμενες τιμές αποτελούν μέσους όρους των τριπλών αντιδράσεων. Πίνακας 4.4-11). Έπειτα, υπολογίστηκε η μεταβολή στην έκφραση της LSD2 κατά την μόλυνση με τον HCV-3a. Ως μάρτυρας

χρησιμοποιήθηκε το εκάστοτε μη μολυσμένο (mock-infected) δείγμα Huh7.5 κύτταρων του οποίου η τιμή τέθηκε αυθαίρετα ως μονάδα (Πίνακας 4.4-22).



Εικόνα 4.4-1 : Η καμπύλη τήξης των προϊόντων της qPCR για την LSD2. Παρατηρείται η μοναδική ειδική κορυφή στους 82,5°C. Η ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα ανάλυσης Rotor Gene 6000, το λογισμικό που συνοδεύει το θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Corbett (Qiagen).



Εικόνα 4.4-2 Η καμπύλη τήξης των προϊόντων της qPCR για το 18S rRNA. Παρατηρείται η μοναδική ειδική κορυφή στους 84°C. Η ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα ανάλυσης Rotor Gene 6000, το λογισμικό που συνοδεύει το θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Corbett (Qiagen).

Παράλληλα προσδιορίστηκαν τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης mRNA της LSD2 σε μη μολυσμένη κυτταροσειρά Huh7.5 κατά τη διάρκεια πολυήμερης καλλιέργειας (96 ώρες) (Πίνακας 4.4-1). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το μη μολυσμένο (mock-infected) δείγμα Huh7.5 κύτταρων της χρονικής στιγμής των 12 ωρών του οποίου η τιμή τέθηκε αυθαίρετα ως μονάδα.

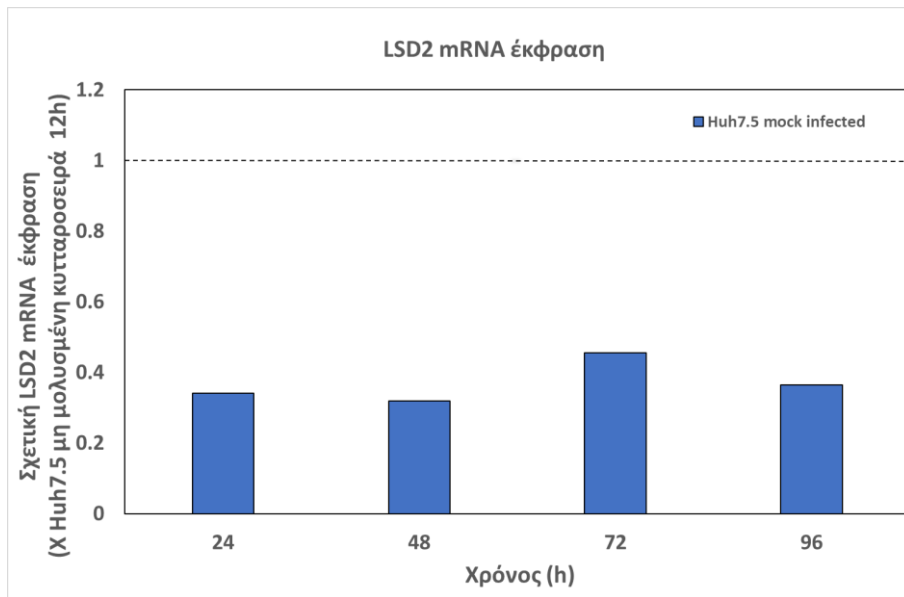
Πίνακας 4.4-1 Τιμές απόλυτης και σχετικής έκφρασης ενδογενών επιπέδων mRNA LSD2 στα δείγματα των μη μολυσμένων κυττάρων Huh7.5 ανά χρονική στιγμή. Οι αναγραφόμενες τιμές αποτελούν μέσους όρους των τριπλών αντιδράσεων.

Δείγματα Huh7.5 mock- infected	LSD2	18S rRNA	Σχετική έκφραση (LSD2/18S rRNA)	Μεταβολή έκφρασης (x Huh7.5 mock-infected 12h)
12h	0,14	0,32	0,44	-
24h	0,15	1,00	0,15	35%
48h	0,18	1,30	0,14	32%
72h	0,26	1,30	0,20	45%
96h	0,19	1,18	0,16	35%

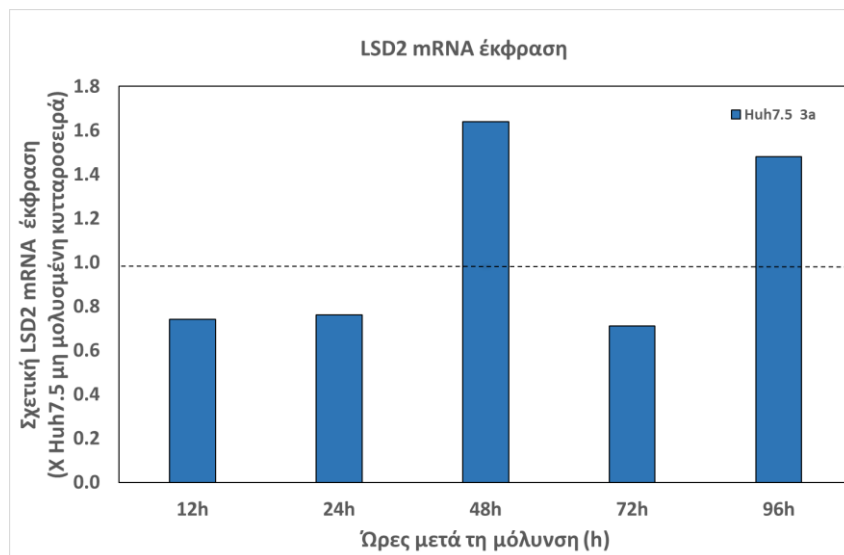
Πίνακας 4.4-2 Τιμές απόλυτης και σχετικής έκφρασης επιπέδων mRNA LSD2 στα δείγματα των κυττάρων Huh7.5 ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a ανά χρονική στιγμή. Οι αναγραφόμενες τιμές αποτελούν μέσους όρους των τριπλών αντιδράσεων.

Δείγματα Huh7.5 HCV-3a	LSD2	18S rRNA	Σχετική έκφραση (LSD2/18S rRNA)	Σχετική έκφραση μάρτυρα (LSD2/18S rRNA)	Μεταβολή έκφρασης (x fold change)
12h	0,20	0,61	0,33	0,44	74%
24h	0,26	2,25	0,12	0,15	76%
48h	0,30	1,31	0,23	0,14	164%
72h	0,18	1,24	0,14	0,20	71%
96h	0,28	1,19	0,23	0,16	148%

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την προκαταρκτική μελέτη, αναφορικά με τα ενδογενή επίπεδα mRNA της LSD2 σε μη μολυσμένη κυτταροσειρά Huh7.5, (Γράφημα 4.4-1), προκύπτει ότι η mRNA έκφραση της LSD2 παραμένει σταθερά μειωμένη κατά 55% - 70% σε σχέση με τις 12 ώρες από την αρχή της καλλιέργειας. Αντίθετα, παρατηρήθηκε διαφορετική ρύθμιση των επιπέδων mRNA της LSD2 παρουσία του HCV-3a, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Αναλυτικότερα στις χρονικές στιγμές των 12, 24 και 72 ωρών υπήρξε μείωση κατά 26%, 24% και 29% αντίστοιχα, αντίθετα στις 48 και 96 ώρες παρατηρήθηκε αύξηση κατά 64% και 48% αντίστοιχα (Γράφημα 4.4-2).



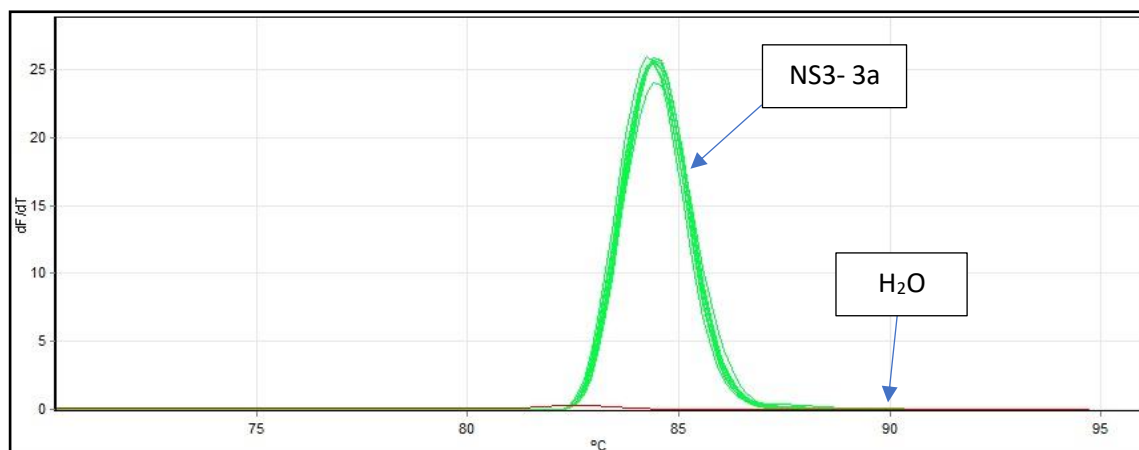
Γράφημα 4.4-1 Σχετική LSD2 mRNA έκφραση σε μη μολυσμένα Huh7.5 κύτταρα, στα χρονικά σημεία των 24, 48, 72 και 96 ωρών. Ο προσδιορισμός έγινε με RT-qPCR και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το 18S rRNA. Στον άξονα Y εμφανίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου ως πολλαπλάσιο της τιμής του μη μολυσμένου μάρτυρα, Huh7.5 στις 12 ώρες. Η διακεκομμένη γραμμή ορίζει την αντίστοιχη τιμή έκφρασης της LSD2 στη μη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια την χρονική στιγμή των 12 ωρών, η οποία έχει πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας.



Γράφημα 4.4-2 Σχετική LSD2 mRNA έκφραση σε Huh7.5 κύτταρα, στα χρονικά σημεία των 12, 24, 48, 72 και 96 ωρών ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a. Ο προσδιορισμός έγινε με RT-qPCR και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το 18S rRNA. Στον άξονα Y εμφανίζεται η σχετική έκφραση του γονιδίου ως πολλαπλάσιο του μη μολυσμένου μάρτυρα, Huh7.5. Η διακεκομμένη γραμμή ορίζει τις αντίστοιχες ενδογενείς τιμές έκφρασης της LSD2 στη μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια, οι οποίες έχουν πάρει αυθαίρετα την τιμή της μονάδας για κάθε χρονική στιγμή.

4.5 Προσδιορισμός ιικού ρυθμού αναδιπλασιασμού κατά την υπερέκφραση του επιγενετικού παράγοντα LSD2 σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα

Από το προηγούμενο πείραμα διαφάνηκε μια τάση αρνητικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης της LSD2 από την ιό HCV, τουλάχιστον κατά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν αυτή η ρύθμιση οφείλεται σε μια αντίστοιχη αρνητική έκβαση της ιικής μόλυνσης κατά την αυξημένη έκφραση του επιγενετικού αυτού παράγοντα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική μελέτη όσον αφορά την επίδραση της υπερέκφρασης της LSD2 στον πολλαπλασιασμό του ιού. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος υπερέκφρασης της LSD2, Lh5, που έχει δημιουργηθεί στο εργαστήριο, καθώς και η κυτταροσειρά Huh7.5 ως μάρτυρας. 300.000 κύτταρα/φρεάτιο σε πλάκα 12 φρεατίων μολύνθηκαν με τον HCV-3a για 6, 12, 24, 48, 72 και 96 ώρες. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA της ιικής πρωτεΐνης NS3-3a, ως δείκτη ιικού αναδιπλασιασμού.



Εικόνα 4.5-1 : Η καμπύλη τήξης των προϊόντων της qPCR για την NS3-3a. Παρατηρείται η μοναδική ειδική κορυφή στους 84°C. Η ανάλυση έγινε στο πρόγραμμα ανάλυσης Rotor Gene 6000, το λογισμικό που συνοδεύει το θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου Corbett (Qiagen).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της ιικής πρωτεΐνης NS3 στις κυτταροσειρές Huh7.5 και Lh5 ύστερα από μόλυνση με HCV-3a έγινε με RT-qPCR και τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4,4 με τη μόνη διαφορά πως χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές για το γονίδιο HCV NS3-3a. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε δείγμα, εκτός του αρνητικού του νερού. Η ειδικότητα του παραγώμενου προϊόντος NS3-3a ελέγχθηκε με καμπύλη τήξης, η οποία φαίνεται στην Εικόνα 4.5-1.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό ανάλυσης Rotor Gene 6000 του θερμικού κυκλοποιητή Corbett. Για να είναι δυνατή η σύγκριση των δειγμάτων και για την αποφυγή τυχαίων σφαλμάτων, έγινε κανονικοποίηση με το γονίδιο αναφοράς 18S rRNA. Για την ανάλυση των

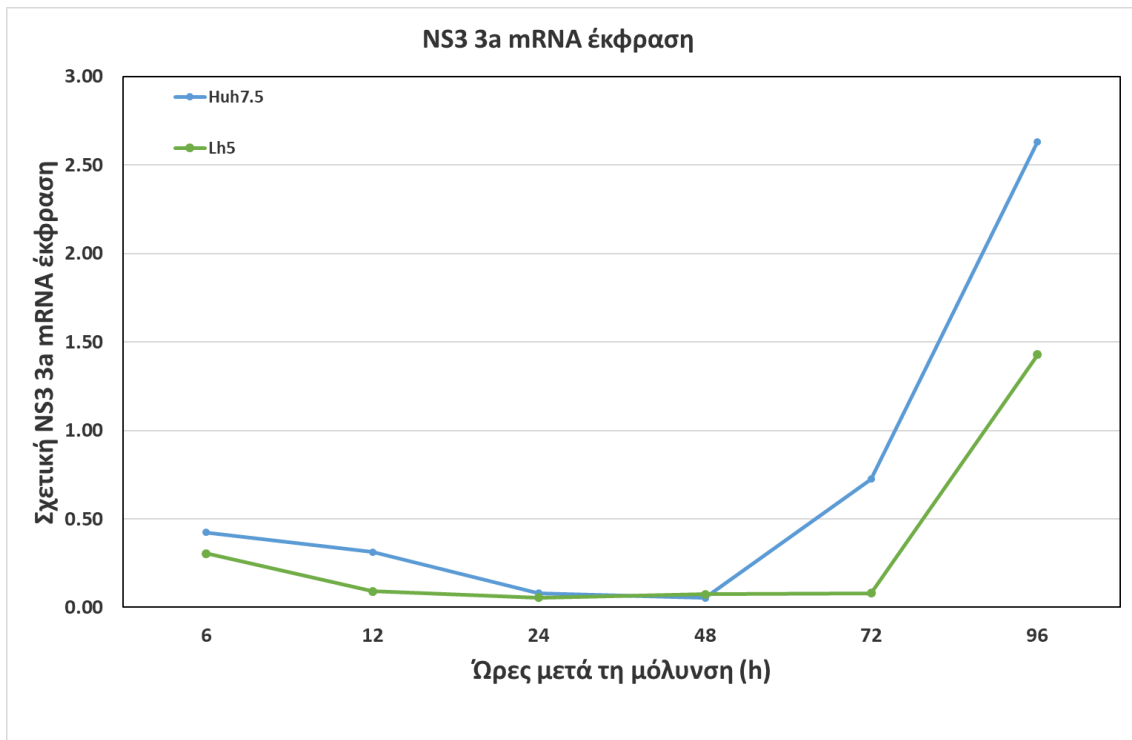
αποτελεσμάτων, έγινε πολλαπλασιασμός με το δείκτη αραιώσης των δειγμάτων όπου είχαν πραγματοποιηθεί αραιώσεις. Μετά από αυτή τη διαδικασία, τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε δείγμα διαιρέθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές του 18S rRNA και έγινε η σύγκριση των τελικών λόγων (Πίνακας 4.5-22). Από το πείραμα αυτό, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 4.5-1 που ακολουθεί, παρατηρείται σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης mRNA της NS3-3a στον κλώνο Lh5 σε σχέση με τον μάρτυρα (Huh7.5) σχεδόν σε όλες τις χρονικές στιγμές, που κυμαίνεται από 30-90% (Πίνακας 4.5-22), με εξαίρεση στις 48 ώρες στις οποίες δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο κυτταροσειρές.

Πίνακας 4.5-1 Τιμές απόλυτης και σχετικής έκφρασης επιπέδων mRNA της NS3-3a στην κυτταροσειρά Huh7.5 ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a. Οι αναγραφόμενες τιμές αποτελούν μέσους όρους των τριπλών αντιδράσεων.

Δείγματα Huh7.5 HCV-3a	NS3-3a	18S	Σχετική έκφραση NS3-3a/18S
6	0,55	1,30	0,42
12	0,19	0,61	0,31
24	0,18	2,25	0,08
48	0,07	1,31	0,05
72	0,90	1,24	0,72
96	3,14	1,19	2,63

Πίνακας 4.5-2 Τιμές απόλυτης και σχετικής έκφρασης επιπέδων mRNA της NS3-3a στην κυτταροσειρά Lh5 ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a. Οι αναγραφόμενες τιμές αποτελούν μέσους όρους των τριπλών αντιδράσεων.

Δείγματα Lh5 HCV-3a	NS3-3a	18S	Σχετική έκφραση NS3-3a/18S	Μεταβολή έκφρασης (x fold change)
6	0,52	1,70	0,30	72%
12	0,08	0,84	0,09	29%
24	0,09	1,60	0,06	68%
48	0,23	3,14	0,07	137%
72	0,24	2,96	0,08	11%
96	2,33	1,63	1,43	54%



Γράφημα 4.5-1 Εξέλιξη του ιικού αναδιπλασιασμού ως μέτρου της σχετικής έκφρασης του ιικού γονιδίου NS3-3a mRNA στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης του επιγενετικού παράγοντα LSD2 (Lh5) και μάρτυρα (Huh7.5), στις χρονικές στιγμές των 6, 12, 24, 48, 72 και 96 ωρών ύστερα από την μόλυνση με HCV-3a.

5 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να μελετήσουμε το λιπιδικό προφίλ ανθρώπινων ηπατοκυττάρων κατά την υπερέκφραση των κυτταρικών ρυθμιστών ANGPTL-3 και ANGPTL-4 καθώς και των επιγενετικών ρυθμιστών LSD1 και LSD2 του ηπατικού λιπιδικού μεταβολισμού, μετρώντας συγκεκριμένες παραμέτρους. Έπειτα εξετάσαμε πως μεταβάλλονται αυτές οι παράμετροι όταν μολύναμε αυτές τις κυτταροσειρές με τον HCV και παρακολουθήσαμε την μόλυνση για ένα ικανό χρονικό διάστημα.

Ο ιός της Ηπατίτιδας C (HCV) αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας, παρουσιάζοντας μεγάλη γεωγραφική κατανομή με περίπου 71 εκατομμύρια μολυσμένα άτομα ανά τον κόσμο. Η πλειοψηφία των HCV ασθενών αναπτύσσουν χρόνια λοίμωξη και από αυτούς ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών με χρόνια Ηπατίτιδα C (HCV) εμφανίζουν ηπατική φλεγμονή και στεάτωση που προάγουν την ηπατική ίνωση, την κίρρωση και ακολούθως ΗΚΚ. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολύ αποτελεσματικά φάρμακα άμεσης αντι-ικκής δράσης που εκριζώνουν πλήρως τον ιό, παρ' όλα αυτά δεν αποκλείεται η εμφάνιση καρκίνου ή και η επανεμφάνιση του ιού σε ασθενείς που έχουν ήδη αναπτύξει ΗΚΚ και έχουν λάβει θεραπεία[17], [83].

Σημαντικό ρόλο στην HCV παθογένεση φαίνεται να έχουν οι μηχανισμοί πρόκλησης συσσώρευσης λιπιδίων εντός των ηπατοκυττάρων, δηλαδή της στεάτωσης, οι οποίοι ωστόσο, παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Ως γνωστόν, ο HCV αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό λιπιδικό μεταβολισμό σε πολλά επίπεδα, από την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή, έως την απελευθέρωση του από αυτό, χρησιμοποιεί κυτταρικά λιπίδια και λιποπρωτεΐνες σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του[43]. Κυτταρικοί και επιγενετικοί ρυθμιστές του λιπιδικού μεταβολισμού όπως οι ANGPTL-3 [57] και ANGPTL-4 (Angiotensin-like proteins) και οι LSD1 και LSD2 (lysine-specific demethylases)(πρώιμα αποτελέσματα εργαστηρίου), αντίστοιχα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο σε αυτήν την αλληλεπίδραση.

Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να μελετηθεί η συσχέτιση των παραπάνω ρυθμιστικών παραγόντων με τον HCV και την επίδραση τους παρουσία ή απουσία του ιού στο λιπιδικό προφίλ των ηπατοκυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν σταθερές κυτταροσειρές που υπερεκφράζουν τους συγκεκριμένους ρυθμιστές. Η επιλογή αυτή έγινε βάσει της παρατηρούμενης μείωσης της ANGPTL-3 από τον HCV[57] και της υπόθεσης πως η υπερέκφραση της ANGPTL-3 θα επηρέαζε αρνητικά στην επιβίωση του HCV. Αντίστοιχα, αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε αυτή την τακτική στη ANGPTL-4 όσο και στις LSD1 και LSD2 δεδομένου πως η ANGPTL-3 φαίνεται να ρυθμίζεται από την LSD1 (το

αποτέλεσμα αυτό είναι αδημοσίευτη προσωπική επικοινωνία από την υποψήφια διδάκτορα Β. Βαλιάκου).

Επιβεβαίωση ανασταλτικής λειτουργίας της υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στην ενεργότητα της HL

Αρχικά έγινε προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της HL στις σταθερές κυτταροσειρές υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) και της ANGPTL-4 (G5), λόγω της γνωστής δράσης τους στην αναστολή της ενζυματικής ενεργότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης[52]. Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της HL, έγινε με τη βοήθεια του Lipase Assay kit, όπου έγιναν αρκετές δοκιμές διαφορετικών συντελεστών αραίωσης των δειγμάτων καθώς λόγω της σχετικά χαμηλής ενεργότητας της HL, σε μεγάλες αραιώσεις δεν εντοπιζόταν σήμα. Τόσο στη κυτταροσειρά υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) όσο και της ANGPTL-4 (G5), προέκυψε μείωση της ενεργότητας της HL σε σύγκριση με την πατρική κυτταροσειρά μάρτυρα Huh7.5. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η ανασταλτική λειτουργία των κυτταροσειρών G4 και G5 στην ενεργότητα της HL.

Έλεγχος επίδρασης της υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στη συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων

Σε αυτό το πλαίσιο, προχωρήσαμε στον έλεγχο της επίδρασης της αναστολής της HL στο λιπιδικό προφίλ στα κύτταρα των κλώνων υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) όσο και της ANGPTL-4 (G5), προσδιορίζοντας τα ενδογενή επίπεδα ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων. Ο προσδιορισμός τους έγινε με τη βοήθεια του Triglyceride Assay kit. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των τριγλυκεριδίων μειώνεται και στις δύο κυτταροσειρές. Άρα η μείωση της ενζυμικής ενεργότητας της HL, φαίνεται να οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) και της ANGPTL-4 (G5). Σύμφωνα με βιβλιογραφία, η μειωμένη ενζυμική ενεργότητα της ηπατική λιπάσης αυξάνει την συγκέντρωση των λιπιδίων και ιδιαίτερα των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία[84], αντίστοιχα δηλαδή με το αποτέλεσμα της δράσης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4[85]. Παρ' όλα αυτά, λόγω των περιορισμένων γνώσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες λειτουργίες των ANGPTLs, υπάρχει πιθανότητα αυτό το αποτέλεσμα να οφείλεται σε κάποια από τις άγνωστες δράσεις τους. Σημειώνεται ακόμα, πως η αύξηση των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία, δεν συνεπάγεται απαραίτητα και μείωση τους ενδοκυτταρικά, γι' αυτό το λόγο έγινε και ο έλεγχος τους.

Έλεγχος επίδρασης της υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στη συγκέντρωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων ύστερα από μόλυνση με τα ιικά στελέχη HCV-2a και HCV-3a

Κατόπιν, προχωρήσαμε στον προσδιορισμό των επιπέδων συγκέντρωσης ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) και της ANGPTL-4 (G5) ύστερα

από 48, 72 και 96 ώρες από τη μόλυνση με τα ιικά στελέχη HCV-2a και HCV-3a. Επιλέχθηκε η μόλυνση με δύο διαφορετικούς γονότυπους του HCV, καθώς κάθε γονότυπος εμφανίζει διαφοροποιήσεις σχετικά με τον τρόπο που αλληλεπιδρά με τον ξενιστή, ο HCV-3 για παράδειγμα εμφανίζει μεγαλύτερη στεατωτική δράση σε σχέση με τους άλλους. Αυτές οι διαφορές έχουν σαν αποτέλεσμα διαφορετικό βαθμό δυσκολίας ίασης μεταξύ των γονότυπων, με τον HCV-3 να εμφανίζει την μεγαλύτερη δυσκολία[86]. Η μελέτη, λοιπόν της μόλυνσης με δύο διαφορετικού ιικού γονότυπους θα μπορούσε να συνδράμει στο προσδιορισμό αυτών των διαφορετικών μηχανισμών και κατά συνέπεια στην εξήγηση της διαφορετικής ανταπόκρισης σε θεραπεία. Αξίζει, ακόμα, να σημειωθεί πως το εργαστηριακό σύστημα μόλυνσης του HCV-2a (JFH-1) είναι το πρώτο που ανακαλύφθηκε [87] και χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για όλες τις μελέτες αλληλεπίδρασης του λιπιδικού μεταβολισμού με τον HCV. Αντίθετα το σύστημα HCV-3 είναι σχετικά καινούριο [88] και λιγότερο χαρακτηρισμένο.

Σε όλες τις περιπτώσεις προέκυψε μείωση της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με την πατρική κυτταροσειρά μάρτυρα Huh7.5 (μόλυνση από HCV-2a και HCV-3a) στις χρονικές στιγμές των 48 και 72 ωρών, ενώ στις 96 ώρες υπήρξε αύξηση ή δεν εμφάνισε καμία μεταβολή. Ο HCV, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει την τάση να προκαλεί συσσώρευση λιπιδίων κατά την μόλυνση ενδοκυτταρικά καθώς του είναι απαραίτητα, συμπεραίνεται, ωστόσο από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι, οι κυτταροσειρές υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) και της ANGPTL-4 (G5), περιορίζουν αυτή τη τάση έως τις 72 ώρες, επιβεβαιώνοντας τη λειτουργικότητα τους και παρουσία του ιού. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι συνολικά η υπερέκφραση των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στην μόλυνση με HCV-2a οδηγεί σε σημαντικά μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσής των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με την μόλυνση με HCV-3a, για τις χρονικές στιγμές των 48 και 72 ωρών. Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός πως ο πολλαπλασιασμός του HCV-3a εξελίσσεται πιο αργά από τον HCV-2a. Ειδικότερα η κορύφωση του ιικού αναδιπλασιασμού εντοπίζεται στις 48 ώρες για τον HCV-2a [57], ενώ για τον HCV-3a ο ιικός αναδιπλασιασμός συνεχίζει να αυξάνεται και μετά τις 96 ώρες (το αποτέλεσμα αυτό είναι αδημοσίευτη προσωπική επικοινωνία από την υποψήφια διδάκτορα Β. Βαλιάκου). Εάν αυτή η υπόθεση ισχύει, τότε η πραγματοποίησή μακροχρόνιας μόλυνσης με τον HCV-3a, η οποία θα ξεπερνά τις 96 ώρες, θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρόμοια μείωση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων, όπως αυτή που παρατηρήθηκε με τον HCV-2a. Τέλος, αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο HCV-3a, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, είναι εκείνος που προκαλεί συχνότερα και εντονότερη στεάτωση των ηπατοκυττάρων[6].

Έλεγχος επίδρασης της υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4 στον αριθμό των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων

Ακολούθως, προχωρήσαμε στην ποιοτική εκτίμηση του αριθμού των λιποσταγονιδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης της ANGPTL-3 (G4) και της ANGPTL-4 (G5) με συνιευστική μικροσκοπία φθορισμού. Προκειμένου να γίνει αυτό, έγινε χρώση με τις κατάλληλες χρωστικές των λιπιδίων (BODIPY) και του πυρήνα (HOECHST). Για την επίτευξη λήψης ευκρινών εικόνων έγιναν επανειλημμένες προσπάθειες τόσο για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων του συνιευστικού μικροσκοπίου φθορισμού όσο και της χρώσης με την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης των χρωστικών. Σύμφωνα με τις λήψεις, προκύπτει μείωση του αριθμού των λιποσταγονιδίων και στις δύο κυτταροσειρές σε σύγκριση με την πατρική κυτταροσειρά μάρτυρα Huh7.5. Το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και ύστερα από μόλυνση των κυτταροσειρών από τα ιικά στελέχη HCV-2a και HCV-3a, λαμβάνοντας εικόνες στις 48 και 96 ώρες μετά την μόλυνση με τον HCV-2a και στις 72 και 96 ώρες μετά την μόλυνση με τον HCV-3a. Οι διαφορετικές χρονικές στιγμές λήψης των εικόνων οφείλεται στο διαφορετικό τρόπο εξέλιξης της μόλυνσης μεταξύ των δύο ιικών στελεχών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Από τις εικόνες των κυττάρων που προέκυψαν γίνεται αντιληπτό πως ο αριθμός των λιποσταγονιδίων στους κλώνους G4 και G5, ύστερα από μόλυνση με τον HCV-2a παρέμεινε μικρότερος σε σχέση με την μολυσμένη κυτταροσειρά Huh7.5 και στις δύο χρονικές στιγμές. Παρομοίως, τα ενδοκυτταρικά λιποσταγονίδια διατηρήθηκαν μειωμένα και στην περίπτωση μόλυνσης των κλώνων G4 και G5 με τον HCV-3a, και μάλιστα καθ' όλη τη διάρκεια της μόλυνσης σε σύγκριση με τον μολυσμένο μάρτυρα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται εμφανές πως ο περιορισμός του αριθμού των λιποσταγονιδίων σε συνθήκες υπερέκφρασης των ANGPTL-3 και ANGPTL-4, δεν μπορεί να διορθωθεί/υπερκεραστεί από τον ιό, παρ'όλη του την δυνατότητα να αυξήσει την ηπατική λιπογένεση [46]. Αυτό, μπορεί να αποτελέσει μία ένδειξη για τον τρόπο που ρυθμίζει ο HCV την έκφραση των παραπάνω γονιδίων. Δεδομένης της τάσης του HCV να μειώνει την έκφραση της ANGPTL-3 [57], μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι σκοπός αυτής της μείωσης είναι ο εμπλουτισμός του λιπιδικού περιβάλλοντος και κατά συνέπεια η αύξηση του αριθμού των λιποσταγονιδίων, καθώς ως γνωστόν είναι απαραίτητα κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του HCV. Σημειώνεται πως περαιτέρω ανάλυση αυτών των εικόνων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, το οποίο υπολογίζει τον αριθμό των λιποσταγονιδίων, προκειμένου να προκύψουν ποσοτικοποιημένα συμπεράσματα.

Έλεγχος επίδρασης της υπερέκφρασης της LSD1 στον αριθμό των ενδοκυτταρικών λιποσταγονιδίων

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο επιγενετικός παράγοντας LSD1. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει παρατηρηθεί πως η LSD1 επηρεάζει την έκφραση της ANGPTL-3 (το αποτέλεσμα αυτό είναι αδημοσίευτη προσωπική επικοινωνία από την υποψήφια διδάκτορα Β. Βαλιάκου το έχει κάνει η Βανέσσα), κατά συνέπεια αυτής της συσχέτισης έγινε η υπόθεση ενός κυτταρικού μηχανισμού

επιγενετικής ρύθμισης της ANGPTL-3 από την LSD1. Για το λόγο αυτό έγινε μια προκαταρκτική ποιοτική εκτίμηση του αριθμού των λιποσταγονιδίων σε κυτταροσειρά που υπέρεκφράζει την LSD1 (Hu1b) με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού όπως προηγουμένως. Αντίστοιχη εκτίμηση έγινε και 96 ώρες μετά από τη μόλυνση του κλώνου Hu1b με τον HCV-3a. Τόσο στην πρώτη όσο και στη δεύτερη περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση των λιποσταγονιδίων σε σύγκριση με την πατρική κυτταροσειρά μάρτυρα Huh7.5. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται να είναι σε αντιστοιχία με αυτά της κυτταροσειράς υπέρεκφρασης της ANGPTL-3 (G4), γεγονός το οποίο μπορεί να αποτελέσει μια πρώιμη ένδειξη ότι η ANGPTL-3-εξαρτώμενη δυσλειτουργία του λιπιδικού μεταβολισμού του ηπατοκυττάρου που παρατηρήσαμε έχει επιγενετική βάση. Στο παραπάνω αποτέλεσμα φαίνεται να συνηγορεί και η μελέτη του Abdullah A. [70], στην οποία κατά την υπέρεκφραση της LSD1 εντόπισαν μειωμένα τριγλυκερίδια. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τον ρόλο της LSD1 ως επιγενετικός παράγοντας που βοηθάει στην λιπογένεση, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, καθώς αντί της αναμενόμενης αύξησης των λιπιδίων λόγω της υπέρεκφρασης της LSD1, γεγονός που θα ευνοούσε τον ιό, παρατηρείται μείωση τους. Συνεπώς σε συνθήκη υπέρεκφρασης της LSD1 πιθανόν να ενεργοποιούνται διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι θα μπορούσαν να σχετίζονται με την ANGPTL-3 που ρυθμίζεται από την LSD1 και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Τέλος μελετήθηκε ο επιγενετικός παράγοντας LSD2. Η LSD2 ανήκει στην ίδια οικογένεια επιγενετικών ρυθμιστών με την LSD1 και παρουσιάζει και εκείνη ρυθμιστικό ρόλο στον λιπιδικό μεταβολισμό [74]. Στη περίπτωση της LSD2 θα περιμέναμε μια πιθανή αρνητική ρύθμιση της έκφρασης της από τον HCV η οποία θα μπορούσε να εξηγηθεί από τον ρόλο της LSD2 στην προστασία του κυττάρου από λιποτοξικό στρες, ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό και την μεταφορά των λιπιδίων. Δηλαδή ο HCV, προκειμένου να συσσωρευτούν λιπίδια ενδοκυτταρικά και να αναπτυχθεί ταχύτερα πιθανώς θα προσπαθούσε να μειώσει την έκφραση της LSD2. Προκειμένου, λοιπόν να μελετηθεί η συσχέτιση της έκφρασης της LSD2 με τον HCV έγινε αρχικά, προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της LSD2 στην πατρική κυτταροσειρά ύστερα από μόλυνση με τον HCV-3a. Ο προσδιορισμός έγινε τη μέθοδο της RT-qPCR. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν μια τάση μείωσης της έκφρασης του mRNA της LSD2 στις αρχικές ώρες της μόλυνσης (12 ώρες, 24 ώρες και 48 ώρες μετά την μόλυνση) σε σύγκριση με τη μη μολυσμένη με HCV-3a πατρική κυτταροσειρά μάρτυρα, Huh7.5. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει πως η μείωση της έκφρασης της LSD2 κατά τις αρχικές ώρες της μόλυνσης πιθανά να διευκολύνει τα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής του ιού, τα οποία όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή βασίζονται πολύ στα λιπίδια, έξω- και ενδοκυτταρικά [46]. Άρα η μείωση της LSD2 ίσως να διευκολύνει την εγκαθίδρυση της μόλυνσης. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό σε τι οφείλεται η αύξηση που παρατηρήθηκε προς τις τελευταίες ώρες και αυτό παραμένει υπό διερεύνηση. Παράλληλα προσδιορίστηκαν και τα ενδογενή επίπεδα του mRNA της LSD2, σε μη μολυσμένη

κυτταροσειρά Huh7.5 με μάρτυρα την χρονική στιγμή των 12 ωρών. Με έκπληξη παρατηρήθηκε ότι αυτά παρέμειναν σταθερά μειωμένα καθ' όλη τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από την μόλυνση με HCV-3a. Το αποτέλεσμα αυτό ίσως να εξηγείται από την ανάγκη του ηπατοκυττάρου να απορροφήσει όσο το δυνατόν περισσότερα λιπίδια από το καλλιεργητικό υλικό, δεδομένου πως πρόκειται για ένα πεπερασμένο *in vitro* σύστημα, το οποίο δεν μπορεί να αναπαραστήσει την συνεχόμενη παροχή λιπιδίων από την κυκλοφορία στον ανθρώπινο οργανισμό, κι επομένως την ανάγκη για ηπατική προστασία από αυξημένη λιποτοξικότητα μέσω LSD2.

Διερεύνηση πιθανής συσχέτισης της έκφρασης της LSD2 με τον HCV

Σε συνέχεια των παραπάνω προχωρήσαμε στον προσδιορισμό του ιικού ρυθμού αναδιπλασιασμού κατά την υπερέκφραση του επιγενετικού παράγοντα LSD2, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της στην έκβαση της ιικής μόλυνσης. Ο προσδιορισμός των επιπέδων mRNA της ιικής πρωτεΐνης NS3, δείκτη του ιικού αναδιπλασιασμού, στη κυτταροσειρά υπερέκφρασης της LSD2 (Lh5) ύστερα από μόλυνση με HCV-3a έγινε με RT-qPCR. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα επίπεδα mRNA της NS3-3a είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με την μολυσμένη με HCV-3a πατρική κυτταροσειρά Huh7.5. Συμπεραίνεται λοιπόν πως η υπερέκφραση της LSD2 μάλλον επηρεάζει την εξέλιξη της ιικής μόλυνσης αρνητικά, συνεπώς ενισχύεται η υπόθεση αλληλεπίδρασης της LSD2 με τον HCV.

Συμπερασματικά, παρατηρήσαμε πως η αυξημένη έκφραση των μελετώμενων κυτταρικών και επιγενετικών ρυθμιστικών μορίων επηρεάζει σημαντικά το λιπιδικό προφίλ των ηπατοκυττάρων και κατά συνέπεια την εξέλιξη της ιικής μόλυνσης σε αυτά και παράλληλα προέκυψαν σημαντικές ενδείξεις για τους πιθανούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς αυτών των μορίων. Τέτοιου είδους κυτταρικοί μηχανισμοί που συσχετίζονται με την HCV-εξαρτώμενη ηπατική βλάβη είναι σημαντικό να ταυτοποιηθούν και να χαρακτηριστούν εφόσον είναι πιθανό ο ιός να αφήνει ένα αποτύπωμα ακόμα και μετά την εκρίζωση του με τις νέες θεραπείες, σε ασθενείς οι οποίοι είτε είναι επιρρεπείς γενετικά είτε εμφανίζουν μεγάλη ηπατική βλάβη, το οποίο προδιαθέτει για ανάπτυξη ΗΚΚ. Συνεπώς, αν αυτοί οι μηχανισμοί γίνουν γνωστοί μπορούν να δημιουργηθούν φάρμακα που να χορηγούνται προφυλακτικά ή και θεραπευτικά σε αυτούς τους ασθενείς όπως ήδη γίνεται με άλλες ασθένειες με τους αναστολείς των ANGPTL-3 και LSD1, οι οποίοι ήδη δοκιμάζονται για την θεραπεία της αθηρογενούς δυσλιπιδαιμίας [89] και του καρκίνου [90] αντίστοιχα.

5.1 Μελλοντικοί Στόχοι

Δεδομένου πως η πειραματική μας μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσα σε ιδιαίτερα στενά χρονικά περιθώρια, αλλά και εξαιτίας των συμπερασμάτων που εξήχθησαν και ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα, κρίνεται απαραίτητο να τεθούν κάποιοι μελλοντικοί στόχοι για την περάτωση της εργασίας αυτής.

Θέτονται, επομένως, οι εξής στόχοι:

1. Αρχικά η πραγματοποίηση αντίστοιχων πειραμάτων μελέτης λιπιδικού προφίλ στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης των LSD1 (Hu1b) και LSD2 (Lh5) (προσδιορισμός της ενζυματικής ενεργότητας της ηπατικής λιπάσης και της συγκέντρωσης των ενδοκυταρικών τριγλυκεριδίων) προκειμένου να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με την επίδραση των επιγενετικών αυτών ρυθμιστών στην HCV μόλυνση καθώς και κατ' επέκταση την συσχέτιση τους με τους κυτταρικούς ρυθμιστές ANGPTL-3 και ANGPTL-4.
2. Επανάληψη του πειράματος προσδιορισμού του αριθμού του λιποσταγονιδίων, αυτή τη φορά με την χρήση υπολογιστικού εργαλείου Imaris, το οποίο θα προσδιορίζει με ακρίβεια τον αριθμό τους και όχι μόνο οπτικά με στόχο την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων αλλά και την μελέτη παραγόντων, όπως ο χρόνος από την στιγμή της μόλυνσης.
3. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων τάξεων των λιπιδίων στις κυτταροσειρές υπερέκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν με τη βοήθεια φασματοσκοπικών και χρωματογραφικών μεθόδων (GC-MS) , με στόχο την απόκτηση ολοκληρωμένης και αναλυτικής εικόνας του λιπιδικού προφίλ και τον μεταβολών του στις κυτταροσειρές και στις συνθήκες που μελετήθηκαν.

6 Βιβλιογραφία

- [1] Q. L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and M. Houghton, "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome," *Science (80-.)*, vol. 244, no. 4902, pp. 359–362, 1989, doi: 10.1126/science.2523562.
- [2] J. T. Blackard, M. T. Shata, N. J. Shire, and K. E. Sherman, "Acute hepatitis C virus infection: A chronic problem," *Hepatology*, vol. 47, no. 1. NIH Public Access, pp. 321–331, Jan-2008, doi: 10.1002/hep.21902.
- [3] "Hepatitis C." [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. [Accessed: 26-Jan-2021].
- [4] "Hepatitis C Information - FAQs, Statistics, Data, and Guidelines | CDC." [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/index.htm>. [Accessed: 26-Jan-2021].
- [5] P. Axley, Z. Ahmed, S. Ravi, and A. K. Singal, "Hepatitis C virus and hepatocellular carcinoma: A narrative review," *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, vol. 6, no. 1. Xia and He Publishing Inc., pp. 79–84, 2018, doi: 10.14218/JCTH.2017.00067.
- [6] M. P. Manns *et al.*, "Hepatitis C virus infection," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, no. 1, Dec. 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.6.
- [7] G. F. B. C. C. Tortora, *Microbiology, An introduction*, 12th ed. Pearson Education, 2016.
- [8] D. S. R. P. J. B. M. Greenwood, *Medical Microbiology*, 17th ed. 2007.
- [9] J. Dubuisson and F. L. Cosset, "Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update," *Journal of Hepatology*, vol. 61, no. 1. Elsevier B.V., pp. S3–S13, 01-Nov-2014, doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
- [10] "Ηπατίτιδα C - Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας." [Online]. Available: <https://eody.gov.gr/disease/ipatitida-c/>. [Accessed: 26-Jan-2021].
- [11] L. Puchades Renau and M. Berenguer, "Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies," *Hemodialysis International*, vol. 22. Blackwell Publishing Inc., pp. S8–S21, 01-Apr-2018, doi: 10.1111/hdi.12647.
- [12] S. M. Borgia *et al.*, "Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: Expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes," *J. Infect. Dis.*, vol. 218, no. 11,

- pp. 1722–1729, 2018, doi: 10.1093/infdis/jiy401.
- [13] “ICTV.” [Online]. Available: https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/634/table-1---confirmed-hcv-genotypes-subtypes-may-2019. [Accessed: 26-Jan-2021].
- [14] S. Pol, L. Parlati, and M. Jadoul, “Hepatitis C virus and the kidney,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 15, no. 2, pp. 73–86, 2019, doi: 10.1038/s41581-018-0081-8.
- [15] F. Nouroz, S. Shaheen, G. Mujtaba, and S. Noreen, “An overview on hepatitis C virus genotypes and its control,” *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 16, no. 4. Egyptian Society of Human Genetics, pp. 291–298, 01-Oct-2015, doi: 10.1016/j.ejmhg.2015.05.003.
- [16] N. Alazard-Dany, S. Denolly, B. Boson, and F. L. Cosset, “Overview of hcv life cycle with a special focus on current and possible future antiviral targets,” *Viruses*, vol. 11, no. 1. MDPI AG, 01-Jan-2019, doi: 10.3390/v11010030.
- [17] O. Falade-Nwulia, M. S. Sulkowski, A. Merkow, C. Latkin, and S. H. Mehta, “Understanding and addressing hepatitis C reinfection in the oral direct-acting antiviral era,” *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 25, no. 3. Blackwell Publishing Ltd, pp. 220–227, 01-Mar-2018, doi: 10.1111/jvh.12859.
- [18] D. Moradpour and F. Penin, “Hepatitis C virus proteins: From structure to function,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 369, pp. 113–142, 2013, doi: 10.1007/978-3-642-27340-7_5.
- [19] F. Penin, J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, and J. M. Pawlotsky, “Structural Biology of Hepatitis C Virus,” *Hepatology*, vol. 39, no. 1. Hepatology, pp. 5–19, Jan-2004, doi: 10.1002/hep.20032.
- [20] T. Kanda, O. Yokosuka, and M. Omata, “Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma,” *Biology (Basel)*, vol. 2, no. 1, pp. 304–316, Jan. 2013, doi: 10.3390/biology2010304.
- [21] L. B. Dustin, B. Bartolini, M. R. Capobianchi, and M. Pistello, “Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 10. Elsevier B.V., pp. 826–832, 01-Oct-2016, doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.025.
- [22] M. B. Zeisel, I. Fofana, S. Fafi-Kremer, and T. F. Baumert, “Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies,” *Journal of Hepatology*, vol. 54, no. 3. Elsevier, pp. 566–576, 01-Mar-2011, doi:

- 10.1016/j.jhep.2010.10.014.
- [23] “Lifecycle - HCV Biology - Hepatitis C Online.” [Online]. Available: <https://www.hepatitisc.uw.edu/biology/lifecycle>. [Accessed: 26-Jan-2021].
- [24] M. Gu and C. M. Rice, “Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required for replicase assembly and function,” *Current Opinion in Virology*, vol. 3, no. 2. Elsevier B.V., pp. 129–136, 01-Apr-2013, doi: 10.1016/j.coviro.2013.03.013.
- [25] C. W. Kim and K. M. Chang, “Hepatitis C virus: virology and life cycle.,” *Clinical and molecular hepatology*, vol. 19, no. 1. Korean Association for the Study of the Liver, pp. 17–25, 2013, doi: 10.3350/cmh.2013.19.1.17.
- [26] H. Belitz, W. Grosch, and P. Schrieberle, *Χημεία Τροφίμων*, 4th ed. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα, 2018.
- [27] I. Spiliopoulos and I. Σπηλιόπουλος, “Κεφάλαιο 21 Λιπίδια,” Jan. 2016.
- [28] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, and S. Subramaniam, “Lipid classification, structures and tools,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1811, no. 11, pp. 637–647, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.bbalip.2011.06.009.
- [29] J. McMurry, *Οργανική Χημεία*, 1st ed., vol. Λιπίδια. Ηράκλειο : Π.Ε.Κ., 2015.
- [30] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*, 7th ed. Ηράκλειο : Π.Ε.Κ., 2015.
- [31] S. Ahmed and O. Ahmed, *Biochemistry, Lipids*. StatPearls Publishing, 2019.
- [32] K. R. Feingold and C. Grunfeld, *Introduction to Lipids and Lipoproteins*. MDText.com, Inc., 2000.
- [33] M. Davidson, “Overview of Lipid Metabolism - Endocrine and Metabolic Disorders - Merck Manuals Professional Edition,” Dec-2019. [Online]. Available: <https://www.merckmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/lipid-disorders/overview-of-lipid-metabolism>. [Accessed: 04-Feb-2021].
- [34] C. Chatterjee and D. L. Sparks, “Hepatic lipase, high density lipoproteins, and hypertriglyceridemia,” *American Journal of Pathology*, vol. 178, no. 4. Elsevier Inc., pp. 1429–1433, 2011, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.050.
- [35] “Lipid Metabolism and Enzymes - Creative Diagnostics.” [Online]. Available: <https://www.creative-diagnostics.com/lipid-metabolism-and-enzymes.htm>. [Accessed: 04-

- Feb-2021].
- [36] A. Remmerie and C. L. Scott, "Macrophages and lipid metabolism," *Cell. Immunol.*, vol. 330, pp. 27–42, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.020.
- [37] H. A. Brown and L. J. Marnett, "Introduction to lipid biochemistry, metabolism, and signaling," *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10. American Chemical Society, pp. 5817–5820, 12-Oct-2011, doi: 10.1021/cr200363s.
- [38] Y. Pirahanchi and S. Sharma, *Biochemistry, Lipase*. StatPearls Publishing, 2019.
- [39] J. R. Mead, S. A. Irvine, and D. P. Ramji, "Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 80, no. 12. J Mol Med (Berl), pp. 753–769, 2002, doi: 10.1007/s00109-002-0384-9.
- [40] Y. Pirahanchi and S. Sharma, *Biochemistry, Lipoprotein Lipase*. StatPearls Publishing, 2019.
- [41] J. Zhang, Y. Lan, and S. Sanyal, "Modulation of lipid droplet metabolism-A potential target for therapeutic intervention in Flaviviridae Infections," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. NOV. Frontiers Media S.A., p. 2286, 28-Nov-2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.02286.
- [42] N. L. Gluchowski, M. Becuwe, T. C. Walther, and R. V. Farese, "Lipid droplets and liver disease: From basic biology to clinical implications," *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 14, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 343–355, 01-Jun-2017, doi: 10.1038/nrgastro.2017.32.
- [43] P. Targett-Adams, S. Boulant, M. W. Douglas, and J. McLauchlan, "Lipid metabolism and HCV infection," *Viruses*, vol. 2, no. 5. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 1195–1217, May-2010, doi: 10.3390/v2051195.
- [44] B. D. Lindenbach *et al.*, "Virology: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture," *Science (80-.)*, vol. 309, no. 5734, pp. 623–626, Jul. 2005, doi: 10.1126/science.1114016.
- [45] G. H. Syed, Y. Amako, and A. Siddiqui, "Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 21, no. 1. NIH Public Access, pp. 33–40, Jan-2010, doi: 10.1016/j.tem.2009.07.005.
- [46] C. I. Popescu, L. Riva, O. Vlaicu, R. Farhat, Y. Rouillé, and J. Dubuisson, "Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism," *Biology*, vol. 3, no. 4. MDPI AG, pp. 892–921, 15-Dec-2014, doi: 10.3390/biology3040892.
- [47] M. Lavie and J. Dubuisson, "Interplay between hepatitis C virus and lipid metabolism during

- virus entry and assembly," *Biochimie*, vol. 141. Elsevier B.V., pp. 62–69, 01-Oct-2017, doi: 10.1016/j.biochi.2017.06.009.
- [48] G. Vieyres and T. Pietschmann, "Tracking Hepatitis C Virus Interactions with the Hepatic Lipid Metabolism," in *The Liver*, Wiley, 2020, pp. 889–905.
- [49] G. Alvisi, V. Madan, and R. Bartenschlager, "Hepatitis c virus and host cell lipids: An intimate connection," *RNA Biol.*, vol. 8, no. 2, pp. 258–269, 2011, doi: 10.4161/rna.8.2.15011.
- [50] A. Filipe and J. McLauchlan, "Hepatitis C virus and lipid droplets: Finding a niche," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 21, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 34–42, 2015, doi: 10.1016/j.molmed.2014.11.003.
- [51] E. Biterova, M. Esmaeeli, H. I. Alanen, M. Saaranen, and L. W. Ruddock, "Structures of Angptl3 and Angptl4, modulators of triglyceride levels and coronary artery disease," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25237-7.
- [52] G. Santulli, "Angiopietin-like proteins: A comprehensive look," *Frontiers in Endocrinology*, vol. 5, no. JAN. Frontiers Media S.A., 2014, doi: 10.3389/fendo.2014.00004.
- [53] P. Tarugi, S. Bertolini, and S. Calandra, "Angiopietin-like protein 3 (ANGPTL3) deficiency and familial combined hypolipidemia," *Journal of Biomedical Research*, vol. 33, no. 2. Nanjing Medical University and Chungbuk National University Press, pp. 73–81, 2019, doi: 10.7555/JBR.32.20170114.
- [54] S. Cruz Biotechnology, "Angptl3 (G-5): sc-365887."
- [55] S. Kersten, "Angiopietin-like 3 in lipoprotein metabolism," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 13, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 731–739, 01-Dec-2017, doi: 10.1038/nrendo.2017.119.
- [56] A. Tikka and M. Jauhiainen, "The role of ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism," *Endocrine*, vol. 52, no. 2. Humana Press Inc., pp. 187–193, 01-May-2016, doi: 10.1007/s12020-015-0838-9.
- [57] P. Foka *et al.*, "Hepatitis C virus modulates lipid regulatory factor Angiopietin-like 3 gene expression by repressing HNF-1 α activity," *J. Hepatol.*, vol. 60, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.016.
- [58] S. Cruz Biotechnology, "Angptl4 (A-2): sc-373761."
- [59] S. K. Koliwad, N. E. Gray, and J.-C. Wang, "Angiopietin-like 4 (Angptl4)," *Adipocyte*, vol. 1, no.

- 3, pp. 182–187, Jul. 2012, doi: 10.4161/adip.20787.
- [60] L. Lichtenstein *et al.*, “Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 11, pp. 2420–2427, Nov. 2007, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151894.
- [61] A. Georgiadi *et al.*, “Overexpression of angiopoietin-like protein 4 protects against atherosclerosis development,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1529–1537, Jul. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301698.
- [62] C. Grootaert, T. Van De Wiele, W. Verstraete, M. Bracke, and B. Vanhoecke, “Angiopoietin-like protein 4: Health effects, modulating agents and structure-function relationships,” *Expert Review of Proteomics*, vol. 9, no. 2. *Expert Rev Proteomics*, pp. 181–199, Apr-2012, doi: 10.1586/epr.12.12.
- [63] R. Feil and M. F. Fraga, “Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 13, no. 2. *Nat Rev Genet*, pp. 97–109, Feb-2012, doi: 10.1038/nrg3142.
- [64] G. Natoli, “Maintaining cell identity through global control of genomic organization,” *Immunity*, vol. 33, no. 1. *Immunity*, pp. 12–24, Jul-2010, doi: 10.1016/j.immuni.2010.07.006.
- [65] V. W. Zhou, A. Goren, and B. E. Bernstein, “Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, no. 1. *Nature Publishing Group*, pp. 7–18, 30-Jan-2011, doi: 10.1038/nrg2905.
- [66] Y. Z. Kim, “Altered Histone Modifications in Gliomas,” *Brain Tumor Res. Treat.*, vol. 2, no. 1, p. 7, 2014, doi: 10.14791/btrt.2014.2.1.7.
- [67] R. Hamamoto, V. Saloura, and Y. Nakamura, “Critical roles of non-histone protein lysine methylation in human tumorigenesis,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 15, no. 2. *Nature Publishing Group*, pp. 110–124, 23-Jan-2015, doi: 10.1038/nrc3884.
- [68] H. Santos-Rosa *et al.*, “Histone H3 tail clipping regulates gene expression,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 17–22, Jan. 2009, doi: 10.1038/nsmb.1534.
- [69] S. Cruz Biotechnology, “LSD1 (B-9): sc-271720.”
- [70] A. Abdulla *et al.*, “Regulation of lipogenic gene expression by lysine-specific histone demethylase-1 (LSD1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 43, pp. 29937–29947, Oct. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.573659.

- [71] A. Hosseini and S. Minucci, "A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer," *Epigenomics*, vol. 9, no. 8. Future Medicine Ltd., pp. 1123–1142, 01-Aug-2017, doi: 10.2217/epi-2017-0022.
- [72] "(No Title)." [Online]. Available: <https://datasheets.scbt.com/sc-517222.pdf>. [Accessed: 10-Feb-2021].
- [73] S. Cai, J. Wang, W. Zeng, X. Cheng, L. Liu, and W. Li, "Lysine-specific histone demethylase 1B (LSD2/KDM1B) represses p53 expression to promote proliferation and inhibit apoptosis in colorectal cancer through LSD2-mediated H3K4me2 demethylation," *Aging (Albany, NY)*, vol. 12, no. 14, pp. 14990–15001, Jul. 2020, doi: 10.18632/aging.103558.
- [74] K. Nagaoka *et al.*, "Lysine-Specific Demethylase 2 Suppresses Lipid Influx and Metabolism in Hepatic Cells," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 7, pp. 1068–1080, Apr. 2015, doi: 10.1128/mcb.01404-14.
- [75] "DMEM, high glucose, no glutamine." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11960044#/11960044>. [Accessed: 15-Feb-2021].
- [76] P. Bagnarelli and M. Clementi, "Serum-free growth of human hepatoma cells. A review.," *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 34. pp. 85–94, 1987, doi: 10.1007/bfb0000674.
- [77] M. J. Roths, N. Tanese, and S. P. Goff, "THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Purification and Characterization of Murine Retroviral Reverse Transcriptase Expressed in *Escherichia coli*," 1985.
- [78] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, "Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions," *Bio/Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1026–1030, 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- [79] I. M. Mackay, K. E. Arden, and A. Nitsche, "Real-time PCR in virology," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 6. Oxford University Press, pp. 1292–1305, 15-Mar-2002, doi: 10.1093/nar/30.6.1292.
- [80] K. Nakajima *et al.*, "Association of angiotensin-like protein 3 with hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase activities in human plasma," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 47, no. 5, pp. 423–431, Sep. 2010, doi: 10.1258/acb.2010.009307.
- [81] K. Fujimoto, R. Koishi, T. Shimizugawa, and Y. Ando, "Angptl3-null mice show low plasma lipid

- concentrations by enhanced lipoprotein lipase activity," *Exp. Anim.*, vol. 55, no. 1, pp. 27–34, Mar. 2006, doi: 10.1538/expanim.55.27.
- [82] E. K. Young, C. Chatterjee, and D. L. Sparks, "HDL-ApoE content regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface proteoglycans," *Am. J. Pathol.*, vol. 175, no. 1, pp. 448–457, 2009, doi: 10.2353/ajpath.2009.080989.
- [83] D. Salmon, M. U. Mondelli, M. Maticic, and J. E. Arends, "The benefits of hepatitis C virus cure: Every rose has thorns," *Journal of Viral Hepatitis*, vol. 25, no. 4. Blackwell Publishing Ltd, pp. 320–328, 01-Apr-2018, doi: 10.1111/jvh.12823.
- [84] P. E. Fielding and C. J. Fielding, "Chapter 18 Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system," in *New Comprehensive Biochemistry*, vol. 31, no. C, Elsevier, 1996, pp. 495–516.
- [85] R. Zhang, "The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking," *Open Biology*, vol. 6, no. 4. Royal Society of London, 01-Apr-2016, doi: 10.1098/rsob.150272.
- [86] M. Keikha *et al.*, "HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment," *VirusDisease*, vol. 31, no. 3. Springer, pp. 235–240, 01-Sep-2020, doi: 10.1007/s13337-020-00592-0.
- [87] T. Wakita *et al.*, "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 7, pp. 791–796, Jul. 2005, doi: 10.1038/nm1268.
- [88] S. Ramirez, L. S. Mikkelsen, J. M. Gottwein, and J. Bukh, "Robust HCV Genotype 3a Infectious Cell Culture System Permits Identification of Escape Variants With Resistance to Sofosbuvir," *Gastroenterology*, vol. 151, no. 5, pp. 973-985.e2, Nov. 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2016.07.013.
- [89] M. Ruscica, F. Zimetti, M. P. Adorni, C. R. Sirtori, M. G. Lupo, and N. Ferri, "Pharmacological aspects of ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibitors: New therapeutic approaches for the treatment of atherogenic dyslipidemia," *Pharmacological Research*, vol. 153. Academic Press, 01-Mar-2020, doi: 10.1016/j.phrs.2020.104653.
- [90] G. J. Yang, P. M. Lei, S. Y. Wong, D. L. Ma, and C. H. Leung, "Pharmacological inhibition of LSD1 for cancer treatment," *Molecules*, vol. 23, no. 12. MDPI AG, 04-Dec-2018, doi: 10.3390/molecules23123194.