

Κωνσταντίνα Κατσαρού

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΩΝ MARKs – ERKs ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ HCV ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο. Γεωργοπούλου: Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ: Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ο. Γεωργοπούλου: Ερευνήτρια Β', Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Κ. Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. Μόσιαλος: Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) ταυτοποιήθηκε το 1989 και υπάρχουν παγκοσμίως περίπου 170 εκατομμύρια φορείς του ιού. Ποσοστό που κυμαίνεται στο 80 με 85% καταλήγει σε χρόνια ηπατίτιδα και από αυτούς, το 20% αναπτύσσει

κίρρωση του ήπατος. Ετησίως, το 3-5% των κίρρωτικών ασθενών καταλήγει σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Η θεραπεία βασίζεται στην ταυτόχρονη χορήγηση πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-α και ριμπαβιρίνης, αλλά ποσοστό μεγαλύτερο από το 50% των ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη θεραπεία.

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

Στον ορό των ασθενών είναι κοινώς αποδεκτή η ύπαρξη καψιδίων όχι μόνο με φάκελο αλλά και χωρίς, των οποίων ο ρόλος παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστος. Η παρούσα εργασία επικεντρώθηκε στην κατασκευή ανασυνδυασμένων βακουλοϊών, μέσω των οποίων επιτευχθηκε απομόνωση γυμνών core καψιδίων με ή χωρίς την ιδιότητα φθορισμού. Ακολούθησε λεπτομερής μελέτη για τον χαρακτηρισμό των κατασκευασθέντων καψιδίων με την οποία αποδείχθηκε η λειτουργικότητά τους. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο τρόπος εισόδου τους σε κύτταρα, κυρίως ηπατικής προέλευσης, και αποδείχθηκε ότι τα καψίδια χρησιμοποιούν την ενδοκύτωση μέσω κλαθρίνης για να εισχωρήσουν στο κύτταρο-ξενιστή και να φτάσουν στα πρώιμα και όψιμα ενδοσώματα και τελικά στα λυσοσώματα. Επιπλέον αποδείχθηκε πως κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης πορείας εμπλέκονται το χαμηλό pH, οι καθεψίνες B και L, καθώς και διάφορες φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες, όπως η p38, οι ERK1/2 και διάφορων ειδών φωσφατάσες.

Στη συνέχεια, τα γυμνά core καψίδια που απομονώθηκαν επώαστηκαν εξωγενώς με διάφορα είδη κυττάρων και μελετήθηκε η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPKs και ειδικότερα τα μονοπάτια ERK1/2 και ERK5. Παρατηρήθηκε πως ενεργοποιούν και τα δύο μονοπάτια, φωσφορυλιώνοντας τις ανάλογες πρωτεΐνες, μετά από επώαση 30 λεπτών. Το φαινόμενο αυτό είναι ποσοτικά εξαρτώμενο, ενώ οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφάνισαν καμιά

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

Ακολούθησε μελέτη για τον κυτταρικό εντοπισμό των ERK1/2 και ERK5 φωσφοπρωτεϊνών, καθώς και της ιδιότητας ενεργοποίησης χαρακτηριστικών καθοδικών στόχων. Τα core καψίδια προκαλούν την πυρηνική μετατόπιση των ERK1/2 πρωτεϊνών, επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων πρώιμης απόκρισης *c-fos*, και *erg-1*. Επιπλέον, αποδείχθηκε πως η παρατεταμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγούσε στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης c-Fos. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε πυρηνική μετακίνηση ή παρατεταμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK5, και επομένως η παρατηρούμενη ενεργοποίηση του γονιδίου *mef-2* γνωστού καθοδικού στόχου του μονοπατιού, φαίνεται να επιτυγχάνεται με έμμεσο τρόπο.

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