



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΖΩΗ ΔΕΚΑΡΕΣΤΟΥ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΕΖΗ2,
ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ (HCMV), ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗ
(U373MG)**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



Αθήνα, 2020



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**



Molecular Microbiology, Immunology Laboratory

ZOI DEKARESTOU

**THE ROLE OF EPIGENETIC FACTOR EZH2,
IN THE REGULATION OF LIFE CYCLE OF HUMAN CYTO-
MEGALOVIRUS (HCMV), IN INFECTED AND
NON-GLIOBLASTOMA CELLS (U373MG)**

GRADUATE THESIS



Athens, 2020

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας, Ανοσολογίας

ΖΩΗ ΔΕΚΑΡΕΣΤΟΥ

Προπτυχιακή Φοιτήτρια Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠΑΔΑ

A.M.: 62114078

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EZH2,
ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕ-
ΓΑΛΟΪΟΥ (HCMV), ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ
ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗ (U373MG)**

Υποβλήθηκε στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών – Τομέας Υγείας και Πρόνοιας

Όνομα εισηγητή: Απόστολος Μπελούκας, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας
και Ιολογίας

**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**

Molecular Microbiology, Immunology Laboratory

ZOI DEKARESTOU

Undergraduate Student of Biomedical Sciences, UOWA

Candidate number: 62114078

**THE ROLE OF EPIGENETIC FACTOR EZH2,
IN THE REGULATION OF LIFE CYCLE OF HUMAN
CYTOMEGALOVIRUS (HCMV), IN INFECTED AND NON-
GLIOBLASTOMA CELLS (U373MG)**

Submitted to the Department of Biomedical Sciences – Faculty of Health and Care Sciences

Supervisor: Apostolos Beloukas, Assistant Professor of Molecular Microbiology and Virology

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

➤ Απόστολος Μπελούκας

➤ Γεώργιος Σουρβίνος

➤ Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

© Ζωή Δεκάρεστου, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Υγείας και Πρόνοιας, 2021.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EZH2, ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ (HCMV), ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗ (U373MG) – Διπλωματική Εργασία.

© Zoi Dekarestou, Department of Biomedical Sciences, School of Health and Care Sciences, 2021.

All rights reserved.

THE ROLE OF EPIGENETIC FACTOR EZH2, IN THE REGULATION OF LIFE CYCLE OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV), IN INFECTED AND NON-GLIOBLASTOMA CELLS (U373MG) – Bachelor Thesis.

Δήλωση Πτυχιακής/Διπλωματικής Εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Ζωή Δεκαρέστου του Ιωάννη, με αριθμό μητρώου 62114078 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Βιοϊατρικών Επιστημών του Τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα

Δεκαρέστου Ζωή



Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, ήταν καθοριστική για μένα, καθώς έπαιξε σημαντικό ρόλο στα πρώτα μου βήματα στο πεδίο της έρευνας. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, όσους με βοήθησαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Απόστολο Μπελούκα, ο οποίος εκτός από εισηγητής ανάθεσης της πτυχιακής μου εργασίας ήταν και ο άνθρωπος που μεσολάβησε ώστε να γίνω αποδεκτή στο Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας, του Πανεπιστημίου της Κρήτης. Επίσης, χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Γεώργιο Σουρβίνο, Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας του Πανεπιστημίου της Κρήτης, ο οποίος με στήριξε, δίνοντάς μου την ευκαιρία να εξερευνήσω εκ βαθέων, τον τομέα της Ιολογίας.

Στο σημείο αυτό δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τη μεταδιδακτορικό Μελίνα Τσέλιου, η οποία ήταν δίπλα μου, δίνοντάς μου πολύτιμες οδηγίες και καθοδήγηση, καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τη Χρυσάνθη Κοκκινάκη, η οποία με βοήθησε οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκε τη βοήθειά της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου, που ήταν στήριγμα σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα όλο αυτό το διάστημα. Βέβαια, δε μπορώ να μην αναφερθώ και στην οικογένειά μου, που όχι μόνο μου έδωσε τη δυνατότητα να σπουδάσω αυτό που πραγματικά αγαπάω, αλλά και που με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Πέραν όμως από την πολύτιμη αυτή στήριξη, μου έδωσαν όλα τα εφόδια ώστε να γίνω ένας σωστός Άνθρωπος και αυτό είναι κάτι που δε μαθαίνεται, αλλά μεταδίδεται.

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV) ανήκει στην οικογένεια των β – ερπητοϊών, έχοντας ως γενετικό υλικό, δίκλωνο DNA και είναι ένας ευρέως διαδεδομένος ιός, σε παγκόσμια κλίμακα. Επιπλέον, θεωρείται ως ένας σημαντικός παθογόνος μικροοργανισμός καθώς υπάρχει κίνδυνος πρόκλησης σοβαρών νοσημάτων σε ανοσοκατεσταλμένους, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αλλά και σε άτομα με ανεπαρκές ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, μέσω της ογκοτρόπου δράσης του, μπορεί να καθορίσει το φαινότυπο συγκεκριμένων τύπων όγκου, όπως του γλοιοβλαστώματος, ο οποίος θεωρείται ως ένας από τους πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου του ανθρώπινου Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.

Σκοπός: Η συγκεκριμένη μελέτη έχει ως σκοπό την ανάδειξη του ρόλου του επιγενετικού παράγοντα EZH2, καθώς και της RhoA GTPάσης, στην πρόοδο μόλυνσης του HCMV σε συγκεκριμένη κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος (U373MG).

Μέθοδος: Η κύρια μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι η μέθοδος Ανοσοαποτύπωσης ή Western Blot. Η μέθοδος αυτή μας βοήθησε στο να μεταφέρουμε τις πρωτεΐνες από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες PVDF, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Στην συνέχεια, ακολούθησε ανοσολογική αποτύπωση με ειδικά αντισώματα.

Αποτελέσματα: Ακολουθώντας την παραπάνω μέθοδο, προέκυψαν αποτελέσματα, τα οποία παρατηρήθηκαν με τη χρήση κυττάρων γλοιοβλαστώματος (U373MG). Πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της έκφρασης της RhoA μεταξύ των μη μολυσμένων και μολυσμένων κυττάρων 18 και 72 ώρες μετά τη μόλυνση με τον HCMV. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και σε μολυσμένα κύτταρα, για 18 ώρες που όμως δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφορά στο επίπεδο έκφρασης του EZH2. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν μικρότερα χρονικά σημεία μόλυνσης με τον ιό. Ειδικότερα, στην πρώιμη μόλυνση, 30 λεπτά δηλαδή, καθώς και στις 3, 24, 48 ώρες υπάρχει παρόμοιο επίπεδο μόλυνσης σε μολυσμένα και μη κύτταρα του γλοιοβλαστώματος. Βέβαια, σε μεγαλύτερο χρονικό επίπεδο (72 ώρες) υπάρχει μια τάση

για μείωση έκφρασης του EZH2. Κλείνοντας, μελετήθηκαν και κύτταρα ινοβλαστών, στις 24 ώρες μόλυνσης, για να τα συγκρίνουμε με τα αποτελέσματα των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος και παρατηρήθηκε μια τάση προς αύξηση του EZH2 στα μολυσμένα κύτταρα, από τον HCMV.

Συμπεράσματα: Από τα πειράματα που διενεργήθηκαν, προκύπτει ότι πιθανόν να υπάρχει μια σχέση ανάμεσα στη RhoA και τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό, σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, η οποία όπως αποδείχθηκε, επιδρά σε διαφορετικά χρονικά σημεία της μόλυνσης. Επίσης, βάσει των μελετών που πραγματοποιήθηκαν, ο HCMV πιθανότατα να σχετίζεται με την έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2, μολύνοντας κύτταρα γλοιοβλαστώματος με τον HCMV. Λαμβάνοντας υπόψιν την ογκοτρόπο δράση του HCMV, στην πρόοδο της νόσου του γλοιοβλαστώματος, χρειάζονται παραπάνω μελέτες με σκοπό την περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των μορίων αυτών με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό και κατά πόσο η δράση τους σχετίζεται με την εξέλιξη της μόλυνσης από τον ιό.

Abstract

Introduction: Human Cytomegalovirus – HCMV belongs to the β – herpesviruses family and is a double – stranded DNA virus and is a widespread virus, worldwide. In addition, it is considered as an important pathogenic microorganism and there is a risk of causing serious diseases in immunocompromised during pregnancy and in people with insufficient immune system. Also, because of its oncogenic pathway, it can determine the phenotype of specific tumors, such as glioblastoma, which is considered one of the most aggressive types of cancer of human Central Nervous System.

Purpose: The main goal of this study is to highlight the role of epigenetic factor EZH2 and as well as RhoA GTPase, in the progression of Human Cytomegalovirus in a specific glioblastoma cell line (U373MG).

Method: The main methodology used is Immunoblotting or Western Blot. With this method, we can transfer proteins through polyacrylamide gel to PVDF membranes, applying an electric field. Afterwards, we used specially labeled antibodies to success an immune response analysis.

Results: Following the above process, some results obtained using glioblastoma cells, U373MG. More specifically, it was observed a tendency to decrease of RhoA between non – infected and infected glioblastoma cells, 18 and 72 hours after HCMV infection. Then, the regulatory expression of epigenetic factor EZH2 was studied in non – infected and infected cells, about 18 hours, but no significant difference was observed in the level of expression of EZH2. Because of that, we used shorter time points of infection with the virus. In particular, in early infection, i.e. 30 minutes, as well as 3, 24, 48 hours there is a similar level of infection in non – infected and infected glioblastoma cells. At a higher time point (72 hours) there is a tendency to reduce EZH2 expression. Eventually, fibroblast cells were studied at 24 hours of infection to compare them with the results of glioblastoma cells and there is a tendency to increase EZH2 in infected cells was observed.

Discussion: The experiments have shown that there may be a link between RhoA and Human Cytomegalovirus in glioblastoma cells, which has been shown to affect different time points of infection. In addition, based on the studies performed, HCMV is most likely to be related to the expression of the epigenetic factor EZH2, infecting glioblastoma cells with HCMV. Considering the oncogenic activity of HCMV, in the progression of glioblastoma disease, more studies are needed in order to further study the mechanisms of interaction of these molecules with HCMV and whether their action is related with the development of infection.

Περιεχόμενα

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής.....	vi
Δήλωση περί λογοκλοπής.....	viii
Δήλωση Πτυχιακής/Διπλωματικής Εργασίας.....	x
Ευχαριστίες.....	xii
Περίληψη.....	xiv
Abstract	xvi
1. Ερπητοϊοί.....	2
1.1. Γενικά	2
2. Ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός – Human Cytomegalovirus , HCMV.....	4
2.1. Γενικά	4
2.2. Δομή και γονιδίωμα.....	4
2.3. Κύκλος ζωής	6
2.3.1. Ο κύκλος ζωής κατά τη λυτική φάση	6
2.3.2. Ο κύκλος ζωής κατά τη λανθάνουσα φάση	9
2.4. Μετάδοση και Επιδημιολογία	9
2.5. Θεραπεία.....	10
2.6. Ο ρόλος του HCMV στον καρκίνο	11
3. Rho GTPases	13
3.1. Γενικά	13
3.2. RhoA GTPase	13
4. Γλοιοβλάστωμα	15
4.1. Γενικά	15
4.2. Ο ρόλος του HCMV στο γλοιοβλάστωμα.....	16
4.2.1. Ο κύκλος ζωής του HCMV στο γλοιοβλάστωμα.....	16
4.2.2. Θεραπεία του γλοιοβλαστώματος μέσω ιικής φαρμακευτικής αγωγής και ανοσοθεραπείας	16
5. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2).....	18
5.1. Γενικά	18
5.2. Οι βιολογικές λειτουργίες του EZH2	18
5.3. Ο ρόλος του EZH2 στον καρκίνο	20
6. Υλικά και μέθοδοι.....	22
6.1. Κύτταρα και ιός	22

6.2.	Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)	22
7.	Αποτελέσματα	26
7.1.	Μελέτη της έκφρασης της άμεσα πρώιμης ιικής πρωτεΐνης IE1 σε κύτταρα ινοβλαστών .	26
7.2.	Μελέτη της έκφρασης της RhoA GTPάσης σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG.....	26
7.3.	Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG.	27
7.4.	Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 72 ώρες με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG	29
7.5.	Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα ινοβλαστών	30
8.	Συζήτηση	32
	Βιβλιογραφία.....	35

Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

1. Ερπητοϊοί

1.1. Γενικά

Οι ερπητοϊοί (Herpes viruses ή herpesviruses) είναι μέρος μιας μεγάλης οικογένειας DNA ιών, με πολλά γένη, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν τόσο σπονδυλωτά, όσο και ασπόνδυλα είδη. Έως και σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 200 είδη ερπητοϊών (Kukhanova et al., 2014). Βάσει της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), η οικογένεια των *Herpesviridae* (ερπητοϊοί) ανήκει στην τάξη *Herpesvirales* και διακρίνεται σε 3 υπο – οικογένειες. Την υπο – οικογένεια των α- ερπητοϊών, *Alphaherpesvirinae*, στην οποία περιλαμβάνονται τα γένη *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus*, *Varicellovirus*. Την υπο – οικογένεια των β – ερπητοϊών, *Betaherpesvirinae*, στην οποία περιλαμβάνονται τα γένη *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus*, *Roseolovirus*. Την υπο – οικογένεια των γ – ερπητοϊών, *Gammaherpesvirinae*, στην οποία περιλαμβάνονται τα γένη *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus*, *Rhadinovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, n.d.). Για να ταξινομηθεί ένας ιός στην οικογένεια *Herpesviridae* θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η δομή του ισωματίου του. Το ισωμάτιο του ερπητοϊού αποτελείται από ένα γραμμικό, δίκλωνο μόριο DNA, το οποίο είναι πακεταρισμένο σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο, τον πυρήνα (core), ένα πρωτεϊνικό περίβλημα (tegument) και το φάκελο (envelope) (Kukhanova et al., 2014).

Αναφέροντας αυτά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, ο κάθε ιός που μολύνει διαφορετικό ξενιστή ταξινομείται με βάση τις βιολογικές τους ιδιότητες και τη γονιδιακή ακολουθία (Wang et al., 2018). Όταν εισέλθει ο ιός στον οργανισμό, το συγκεκριμένο άτομο φέρει τον ιό για το υπόλοιπο της ζωής του. Αυτό συμβαίνει χάρη στις ιδιότητες που έχει η συγκεκριμένη οικογένεια ιών. Πιο συγκεκριμένα, εισέρχεται αποτελεσματικά σε κύτταρα ξενιστές, παραμένει στον οργανισμό σε λανθάνουσα φάση για μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορεί να επανενεργοποιηθεί αποτελεσματικά μετά από διέγερση, η οποία θα προκαλέσει πολλαπλασιασμό του ιού κι έτσι τη διάδοσή του τόσο εντός του ξενιστή όσο και

μεταξύ άλλων ατόμων (**Wang et al., 2018**). Τα ερεθίσματα τα οποία μπορούν να «αφυπνίσουν» την ιογενή δραστηριότητα του ιού μπορεί να είναι η ζέστη, το κρύο, ο πυρετός, το άγχος και πάνω απ' όλα οι αλλαγές στην κατάσταση της άμυνας του ξενιστή (**Crimi et al., 2019**).

Μόνο 9 από αυτά έχουν ταυτοποιηθεί και μπορούν να μολύνουν τους ανθρώπους: απλός ερπητοϊός 1 και 2 (Herpes Simplex types 1 and 2 (HSV – 1, HSV – 2), HHV – 1, HHV – 2), ανεμοβλογιά – έρπης ζωστήρος (Varicella Zoster Virus (VZV), HHV – 3), ιός Epstein – Barr (Epstein – Barr virus (EBV), HHV – 4), ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus (HCMV), HHV – 5), ανθρώπινοι ερπητοϊοί 6 και 7 (Human herpesvirus 6 and 7, HHV – 6, HHV – 7) και ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Karosi (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV), HHV – 8)

Όσοι ερπητοϊοί ανήκουν στην υπο – οικογένεια *Alphaherpesvirinae* χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα ξενιστών που μπορούν να μολύνουν. Ο σύντομος παραγωγικός κύκλος, η ικανότητα γρήγορης εξάπλωσης μεταξύ των κυττάρων και η πρόκληση λύσης σε μολυσμένα κύτταρα καθώς και η εγκαθίδρυση της λανθάνουσας μόλυνσης στα αισθητήρια γάγγλια είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης οικογένειας. Οι ερπητοϊοί, οι οποίοι ανήκουν στην υπο – οικογένεια *Betaherpesvirinae* έχουν περιορισμένο φάσμα ξενιστών που έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν και ο αναπαραγωγικός τους κύκλος διαρκεί πολλή ώρα, έχοντας μειωμένη πρόοδο μόλυνσης σε κυτταροκαλλιέργειες. Μπορούν να διατηρηθούν σε λανθάνουσα φάση σε αδενικούς ιστούς, σε λεμφοκυτταρικά κύτταρα, στους νεφρούς και σε άλλους ιστούς. Η τρίτη υπο – οικογένεια των ερπητοϊών, *Gamtaherpesvirinae*, προκαλεί λανθάνουσα μόλυνση κυρίως σε λεμφοβλάστες. Κάποιοι προκαλούν λυτική μόλυνση σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες και έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν όγκους (**Rechenchoski et al., 2017**).

Κεφάλαιο 2

2. Ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός – Human Cytomegalovirus , HCMV

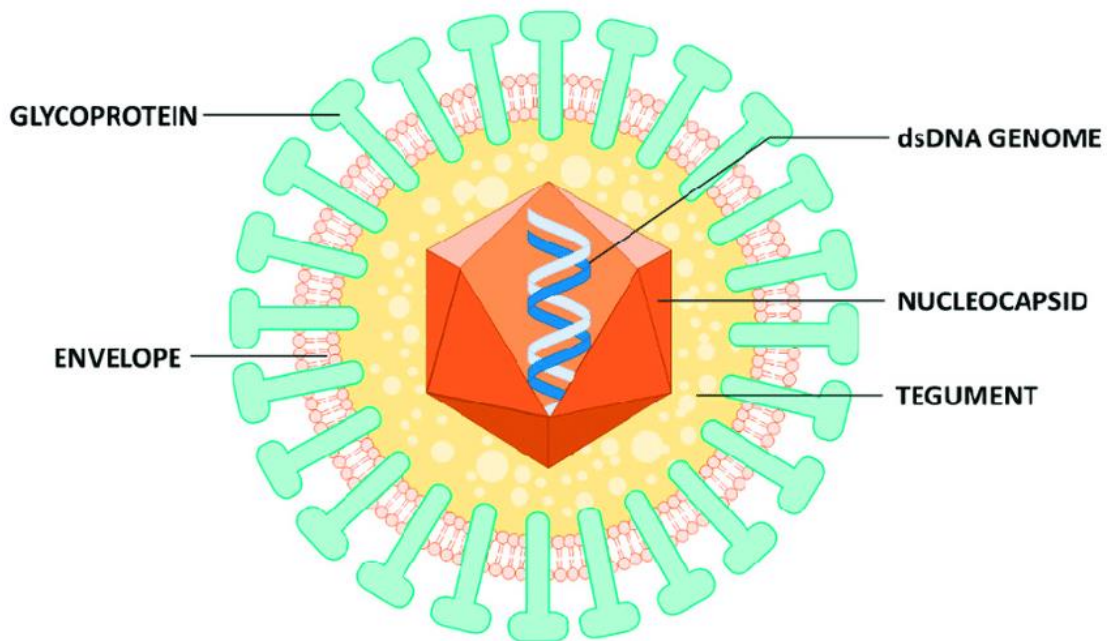
2.1. Γενικά

Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (ο ιός HCMV, Human Cytomegalovirus), συχνά αναφερόμενος ως ανθρώπινος ερπητοϊός 5 (Human Herpes Virus 5 – HHV – 5), ανήκει στην οικογένεια των Herpesviridae, υποοικογένεια Betaherpesviridae, στο γένος Cytomegalovirus. Η ονομασία του προήλθε από το γεγονός ότι προκαλεί διόγκωση των μολυσμένων κυττάρων (κυτταρομεγαλία) (Seitz, 2010). Η μόλυνση του HCMV πραγματοποιείται σε πολλά είδη κυττάρων όπως είναι οι ινοβλάστες, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα (Gerna et al., 2004). Η μόλυνση από τον HCMV μπορεί να χαρακτηριστεί ως μόνιμη – δηλαδή, εφ' όρου ζωής. Αυτό συμβαίνει διότι ο ιός εν μέρει, παραμένει σε λανθάνουσα φάση. Τα περισσότερα άτομα που μολύνονται από τον ιό είναι ασυμπτωματικά. Ωστόσο, όταν το ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζεται από άλλες λοιμώξεις ή θεραπείες (όπως είναι οι ασθενείς με AIDS ή ασθενείς που έχουν πραγματοποιήσει κάποια μεταμόσχευση) ή είναι ακόμα μη ώριμο (όπως είναι το έμβρυο στη μήτρα), μπορεί να προκληθεί σοβαρή νοσηρότητα, μέχρι και θνησιμότητα (Jackson et al., 2017). Επιπλέον, ο HCMV είναι ένας ιός που εντοπίζεται σε παγκόσμια κλίμακα, σε αναπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες, αλλά και σε απομονωμένες γεωγραφικά περιοχές. Επίσης, η συχνότητα μόλυνσης των ατόμων από HCMV αυξάνεται προοδευτικά με την ηλικία (Sijmons et al., 2014).

2.2. Δομή και γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του HCMV αποτελείται από μια γραμμική διπλή έλικα DNA και έχει το μεγαλύτερο γονιδίωμα από τους Β – ερπητοϊούς, με 230 kb. Έχει μεγάλο ποσοστό GC στο γονιδιωμα του. Το ιικό σωματίο του HCMV αποτελείται από ένα εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο, το οποίο έχει μέγεθος 100 nm και συγκροτείται από 162 καψομερίδια. Μεταξύ του καψιδίου και του ιικού φακέλου (envelope) υπάρχει μια πρωτεϊνική επίστρωση

(tegument), η οποία περικλείεται από μια λιπιαδική διπλοστοιβάδα που αποτελείται από ένα μείγμα πρωτεϊνών του ξενιστή και του ιού (Seitz, 2010) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Δομή του ιοσωματίου του HCMV. Τα ώριμα ιοσωμάτια του ιού επικαλύπτονται από ένα περίβλημα – φάκελο (Envelope), από το οποίο προεξέχουν ιικές γλυκοπρωτεΐνες (Glycoprotein). Το εικοσαεδρικό καψίδιο (Nucleocapsid), το οποίο περικλείει το δίκλωνο γονιδίωμα DNA (dsDNA Genome), περιβάλλεται από μια πρωτεϊνική επίστρωση (Tegument) (Gugliesi et al., 2020).

Όσον αφορά το γονιδίωμα του HCMV θα μπορούσε κανείς να το διαχωρίσει σε δύο περιοχές: τη μοναδική μακριά (unique long, UL) και την μοναδική μικρή (unique short, US) περιοχή, όπου η καθεμία πλαισιώνεται από επαναλαμβανόμενες τερματικές αλληλουχίες (TRL και TRS) και από εσωτερικές επαναλήψεις (IRL και IRS) (Boeckh & Geballe, 2011; Ma et al., 2012). Γενικά, έχει βρεθεί πως υπάρχουν 208 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORF), όπου 14 απ' αυτά αντιγράφονται εντός των επαναλαμβανόμενων περιοχών (Ma et al., 2012). Η έκφραση των γονιδίων του ιού πραγματοποιείται από μια απόλυτα συγκεκριμένη διαδοχική έκφραση τριών ομάδων γονιδίων: τα άμεσα – πρώιμα

γονίδια (immediate – early genes, IE), τα πρώιμα γονίδια (early genes, E) και τα όψιμα γονίδια (late genes, L) (Gugliesi et al., 2020).

2.3. Κύκλος ζωής

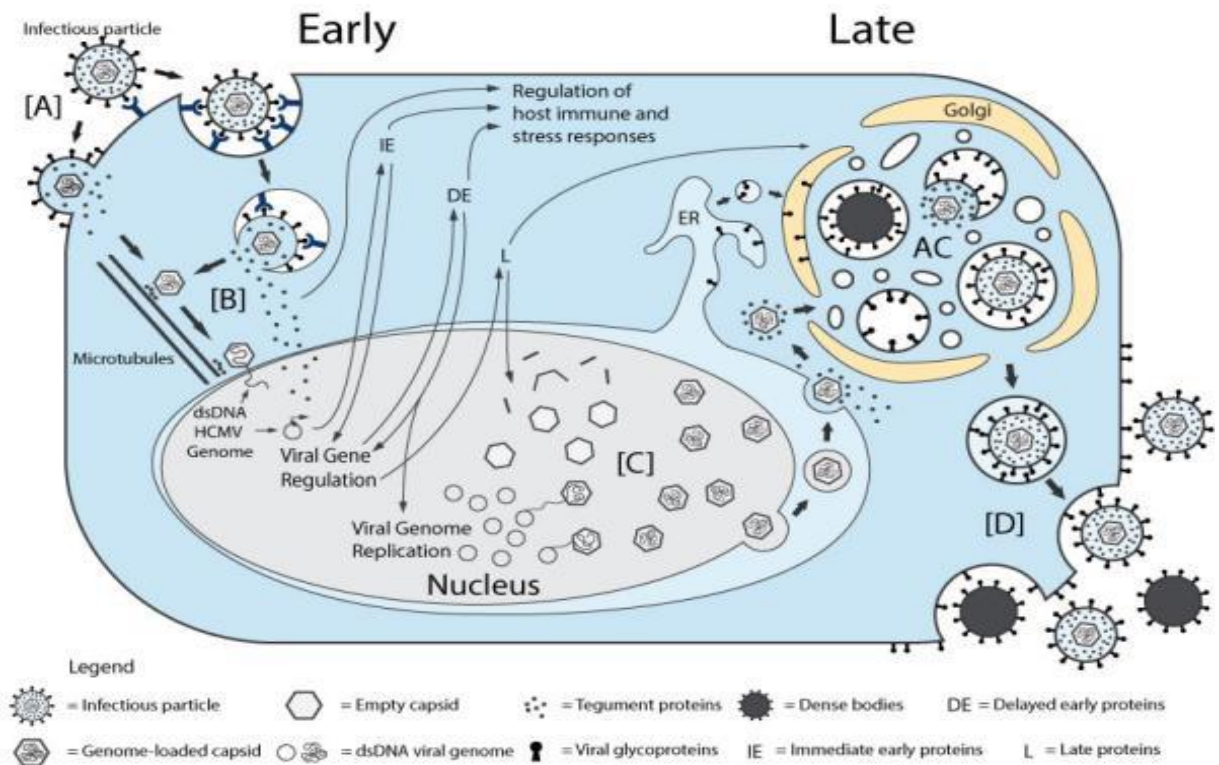
Ο κύκλος ζωής του ιού περιλαμβάνει επτά στάδια. Έτσι λοιπόν, ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός έχει την πρόσδεση (attachment), την είσοδο (entry), την αποσυναρμολόγηση (uncoating), την αντιγραφή (replication), την συναρμολόγηση (assembly), την ωρίμανση (maturation) και την έξοδο (egress) (Evers et al., 2004). Ο HCMV επιτελεί 2 είδη μόλυνσης: τη λυτική (lytic) μόλυνση και τη λανθάνουσα (latent) μόλυνση. Όταν ο ιός μολύνει για πρώτη φορά το ξενιστή τον οδηγεί στη λυτική φάση, στην οποία υπάρχει εκτεταμένη ιογενής γονιδιακή έκφραση καθώς και παραγωγή μολυσματικών ιών, χωρίς να υπάρχουν συμπτώματα σε ανοσοεπαρκή άτομα (Slobedman et al., 2010).

Παρόλο βέβαια που οι περισσότεροι ιοί απομακρύνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, υπάρχουν και κάποιοι οι οποίοι παραμένουν σε λανθάνουσα φάση. Μεγάλο μέρος της παθογένειας που σχετίζεται με τη μόλυνση από τον HCMV, μπορεί να αποδοθεί στην ικανότητα του ιού να εγκαθιδρύεται με μια μακράς διάρκειας μόλυνση στον ξενιστή, μέσω της λανθάνουσας φάσης. Με αυτό τον τρόπο, το ιικό γονιδίωμα διατηρείται στο κύτταρο – ξενιστή χωρίς να υπάρχει αντιγραφή ή παραγωγή νέων ιοσωματίων (Collins-McMillen et al., 2018).

2.3.1. Ο κύκλος ζωής κατά τη λυτική φάση

Ο λυτικός κύκλος ζωής του HCMV μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα μεγάλο εύρος διαφοροποιημένων κυτταρικών τύπων τελικού σταδίου, συμπεριλαμβανομένου των ινοβλαστών και των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να πραγματοποιείται η πλήρης ιική αντιγραφή (Poole & Sinclair, 2020). Η μόλυνση θα ξεκινήσει όταν ο μολυσματικός ιός προσκολληθεί σε ένα κύτταρο του ξενιστή πάνω σε συγκεκριμένους υποδοχείς, οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια. Αφού συνδεθούν πρώτα οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος, με τους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή, τα ιοσωμάτια εισέρχονται στον ξενιστή με ενδοκυττάρωση ή σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Οι ιικές πρωτεΐνες της πρωτεϊνικής επίστρωσης (tegument), οι οποίες συνδέονται με το καψίδιο, θεωρείται πως αλληλοεπιδρούν

με το μηχανισμό του κυτταροσκελετού του ξενιστή για τη μεταφορά ιικών καψιδίων στον πυρηνικό φάκελο καθώς και στον πυρήνα, όπου εκεί πραγματοποιείται η αντιγραφή του γονιδιώματος και η καψιδίωση (encapsidation). Άλλες πρωτεΐνες της πρωτεϊνικής επίστρωσης εναποτίθενται σε μολυσμένα κύτταρα από εισερχόμενα ιοσωμάτια, με σκοπό την αναστολή του αρχικού σταδίου της ανοσοαπόκρισης αλλά και τη ρύθμιση της ιικής γονιδιακής έκφρασης. Επιπλέον, πολλές μεταγραφόμενες ιικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τις οδούς σηματοδότησης του κυτταρικού μεταβολισμού, για να ενισχύσουν την αντιγραφή του ιού και τη μη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η έκφραση αυτών των ιογενών πρωτεϊνών μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένας πολύ καλά οργανωμένος καταρράκτης γεγονότων, ο οποίος διαφοροποιείται σε κύριες χρονικές περιόδους. Η καθεμία από αυτές είναι υπεύθυνη για τη διαφορετική πορεία του κύκλου ζωής του ιού, όσο διαρκεί η λυτική μόλυνση (**Jean Beltran & Cristea, 2014**). Όταν συναρμολογηθεί το νουκλεοκαψίδιο στον πυρήνα, εξέρχεται από αυτόν μέσω της διπλής μεμβράνης, ύστερα από την αποδόμηση της πυρηνικής λαμίνης. Από τη στιγμή που το νουκλεοκαψίδιο εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω της ενεργοποίησης πολλών κυτταρικών μονοπατιών μεταφοράς στο σύμπλοκο συναρμολόγησης (Assembly complex – AC). Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί μια δομή στην οποία περιέχονται στοιχεία που σχηματίζονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο, το σύστημα Golgi και τα ενδοσωμάτια του ξενιστή, με σκοπό τη σύνθεση του τελικού ιοσωματίου. Ολοκληρώνοντας το λυτικό κύκλο, τα μολυσματικά σωματίδια τα οποία έχουν παραχθεί, καθώς και τα μη μολυσματικά – γνωστά ως «πυκνά σώματα» (dense bodies) – απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο (**Jean Beltran & Cristea, 2014**) **(Εικόνα 2)**.



Εικόνα 2. (Α) Τα μολυσματικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Το καψίδιο και η πρωτεϊνική επίστρωση απελευθερώνονται στο κυτοσόλιο. **(Β)** Το καψίδιο ταξιδεύει στον πυρήνα. Η πρωτεϊνική επίστρωση ρυθμίζει τις αποκρίσεις του κυττάρου – ξενιστή και είναι υπεύθυνη για την έκφραση των άμεσα – πρώιμων γονιδίων (IE), τα οποία ακολουθούνται από τα καθυστερημένα – πρώιμα γονίδια (DE), τα οποία έχουν ως ρόλο να αντιγράψουν το γονιδίωμα, κατά τη ρύθμιση της έκφρασης των όψιμων γονιδίων (L). **(C)** Τα όψιμα γονίδια είναι υπεύθυνα για τη συγκρότηση του καψιδίου στον πυρήνα, το οποίο με τη σειρά του απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Τα καψίδια αποκτούν πρωτεϊνική επίστρωση στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στο σύμπλεγμα συναρμολόγησης (AC). Το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), τη συσκευή Golgi και του ενδοσωματίου. Έπειτα, τα καψίδια αποκτούν περαιτέρω περίβλημα, τον ιικό φάκελο (envelope). **(D)** Τα μολυσματικά σωματίδια μαζί με τα μη μολυσματικά «πυκνά σώματα» (dense bodies) απελευθερώνονται από το κύτταρο. (Jean Beltran & Cristea, 2014).

2.3.2. Ο κύκλος ζωής κατά τη λανθάνουσα φάση

Ο HCMV διαπιστώθηκε πως παραμένει σε λανθάνουσα φάση στα αιμοποιητικά κύτταρα και πιο συγκεκριμένα, στα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς (**Dupont & Reeves, 2016**). Η λανθάνουσα φάση χαρακτηρίζεται από τη μεταγραφική σίγηση, η οποία οφείλεται εν μέρει στη συσχέτιση των κατασταλτικών παραγόντων μεταγραφής, οι οποίοι λειτουργούν παράλληλα με τους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Λόγω της σίγασης λοιπόν, ο ιός έχει τη δυνατότητα να αποφεύγει την ανοσοαπόκριση του ξενιστή ενώ είναι σε αδράνεια, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο την λοίμωξη εφ' όρου ζωής (**Dooley & O'Connor, 2020**). Πιο αναλυτικά, όταν το ιικό γονιδίωμα εισχωρήσει στον πυρήνα, θα κυκλοποιηθεί και θα πακεταριστεί με τη βοήθεια των ιστονών και ο ιικός πολλαπλασιασμός που θα πραγματοποιούταν στην περίπτωση λυτικής μόλυνσης, παρεμποδίζεται. Αυτό επιτυγχάνεται με την παρεμπόδιση έκφρασης των άμεσα – πρώιμων γονιδίων (IE), μέσω της συμπύκνωσης της μορφής της χρωματίνης (ετεροχρωματίνη), στην περιοχή «Major Immediate Early Promoter – MIEP», ο οποίος έχει το ρόλο του υποκινητή των συγκεκριμένων γονιδίων. Η παρεμπόδιση έκφρασης πραγματοποιείται με ιικούς αλλά και με κυτταρικούς παράγοντες. Στην περίπτωση όπου υπάρξει επανενεργοποίηση, η χρωματίνη που βρίσκεται γύρω από την περιοχή MIEP μετατρέπεται σε μια πιο ανοιχτή δομή, την ευχρωματίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση των IE γονιδίων από τον MIEP και συνεπώς την έναρξη του ιικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος με τη σειρά του οδηγεί στην παραγωγή μολυσματικών ιοσωματίων (**Elder & Sinclair, 2019**).

2.4. Μετάδοση και Επιδημιολογία

Ο HCMV ανιχνεύεται στη σίελο, τα ούρα, το σπέρμα, τα κοιλικά υγρά, τα κόπρανα και το μητρικό γάλα των μολυσμένων μητέρων. Με αυτό τον τρόπο, μπορεί να μεταδοθεί μέσω στενής επαφής (σεξουαλική επαφή), με μεταμόσχευση οργάνων από οροθετικό δέκτη και αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, από μετάγγιση μολυσμένου αίματος, καθώς και από τη μητέρα στο έμβρυο – είτε ενδομητρίως, μέσω του πλακούντα, είτε κατά τον τοκετό και το θηλασμό (**Sezgin et al., 2019**).

Βάσει ερευνών, έχει αποδειχθεί ότι η μόλυνση από τον HCMV ποικίλλει ανάλογα με το κοινωνικό – οικονομικό πρότυπο μιας χώρας. Πιο συγκεκριμένα, ο επιπολασμός των

βιομηχανικών περιοχών, όπως η Αμερική, η Δυτική Ευρώπη και η Αυστραλία κυμαίνεται κατά μέσο όρο στο 40 – 70 % του πληθυσμού. Αντιθέτως, συγκριτικά με τις Αναπτυσσόμενες Χώρες, η συχνότητα μόλυνσης είναι εμφανώς αυξημένη, φτάνοντας και το 100 % του πληθυσμού (Seitz, 2010).

2.5. Θεραπεία

Δεδομένου ότι η ανοσία στον HCMV βελτιώνει τη σοβαρότητα της νόσου, έχουν γίνει προσπάθειες ανάπτυξης εμβολίων για τη χρήση τους σε υψηλού κινδύνου συνθήκες, όπως αυτή του HCMV. Ωστόσο, παρόλες τις προσπάθειες, κανένα εμβόλιο έναντι του HCMV δε φαίνεται να έχει πλησιάσει τον επιθυμητό στόχο. Οι λόγοι για την αποτυχία επίτευξης του στόχου είναι περίπλοκοι αλλά αξιολογήσιμοι. Αρχικά, οι ανοσοποιητικοί συσχετισμοί του ξενιστή της προστατευτικής ανοσίας (protective immunity) δεν είναι ακόμη σαφείς. Επιπλέον, οι ιικές πρωτεΐνες που πρέπει να περιλαμβάνονται στο εμβόλιο έναντι του ιού είναι αβέβαιες. Επιπρόσθετα, σε κλινικές δοκιμές όπου πραγματοποιήθηκαν, δόθηκε μεγαλύτερη βαρύτητα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, όπου μπορεί να θεωρηθούν ως ένας πληθυσμός που ίσως να μη σχετίζεται με το πρόβλημα της προστασίας του εμβρύου από συγγενή λοίμωξη. Εκτός από τα παραπάνω, ο τελικός «πληθυσμός – στόχος» για τον εμβολιασμό έναντι του HCMV παραμένει ασαφής. Κλείνοντας, θεωρώντας και τον πιο σημαντικό λόγο αποτυχίας, δεν υπήρξε η κατάλληλη εκπαίδευση και ενημέρωση σχετικά με το πρόβλημα της λοίμωξης από τον HCMV, ιδιαίτερα σε γυναίκες σε ηλικία τεκνοποίησης αλλά και στο γενικότερο πληθυσμό (Schleiss, 2008).

Παρόλο που δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για την αντιμετώπιση της μόλυνσης από τον ιό, υπάρχουν 5 είδη φαρμάκων, τα οποία έχουν εγκριθεί για την πρόληψη από τον HCMV. Η φαρμακευτική αγωγή που προτιμάται περισσότερο για την ενεργή λοίμωξη CMV σε ανοσοκατεσταλμένους είναι ενδοφλεβια Ganciclovir (GCV) θεραπεία. Ένα παράγωγο του GCV είναι το VGCV, το οποίο λαμβάνεται από το στόμα και χορηγείται συνήθως σε ασθενείς που πραγματοποίησαν κάποια μεταμόσχευση ως προφύλαξη. Επιπλέον, υπάρχουν και τα φάρμακα «δεύτερης γραμμής» (second – line drugs), το Cidofovir – CDV και το Foscarnet. Όλα τα παραπάνω φάρμακα, αναστέλλουν την ιική DNA πολυμεράση, με σκοπό την παρεμπόδιση της αντιγραφής του ιικού DNA. Το Letermovir είναι ένα καινούριο αντι – HCMV φάρμακο, το οποίο εγκρίθηκε πρόσφατα για την προφυλακτική θεραπεία

έναντι του ιού σε ασθενείς που έκαναν μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCT) (Krishna et al., 2019). Το συγκεκριμένο φάρμακο μπλοκάρει το σύμπλοκο τερματισμού του CMV, αποτρέποντας τη διάσπαση και το πακετάρισμα του ιικού DNA (El Helou & Razonable, 2019).

2.6. Ο ρόλος του HCMV στον καρκίνο

Ο ρόλος του HCMV δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως κι έτσι δε μπορεί να χαρακτηριστεί ακόμα ως ανθρώπινος ογκοϊός. Βέβαια, με τις συγκεκριμένες βιολογικές ιδιότητες που ήδη έχει, πληροί τα κριτήρια για να θεωρηθεί τουλάχιστον ογκοτρόπος ιός. Πιο συγκεκριμένα, ο HCMV βρέθηκε σε ποσοστό άνω του 90% σε τύπους ανθρωπίνων καρκινωμάτων, όπως στον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και του προστάτη αλλά και στο ραβδομυοσάρκωμα, στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και σε όγκους στον εγκέφαλο (μυελοβλάστωμα και γλοιοβλάστωμα). Επιπλέον, σε περίπτωση που ο ιός μολύνει κάποια καρκινικά κύτταρα, δεν μπορεί να ανιχνευθεί η μόλυνση σε διπλανούς φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης, το επίπεδο της λοίμωξης από τον ιό συσχετίστηκε αρνητικά με το θετικό αποτέλεσμα της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η θεραπεία για τον HCMV σε άτομα τα οποία είναι καρκινοπαθή, βελτίωσε το αποτέλεσμα της πρόγνωσης που αφορά την ασθένεια. Ακόμη, ο HCMV έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει πολλά ογκογόνα κυτταρικά μονοπάτια και λειτουργίες οι οποίες σχετίζονται με τα «χαρακτηριστικά του καρκίνου» (Hallmarks of Cancer), όπως είναι οι ουσιαστικές αλλαγές στη φυσιολογία των κυττάρων, που απαιτούνται για τον κυτταρικό μετασχηματισμό. Πολλές από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιεί ο HCMV, φαίνεται να συνδέονται άμεσα με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ογκογένεση (Herbein, 2018; Nauclicr et al., 2019).

Εκτός από τα παραπάνω, ο ιός έχει τη δυνατότητα να μολύνει και άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως είναι τα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και μερικές φορές το κυτταρικό στρώμα των όγκων όπου αυτό τον διαφοροποιεί από τους υπόλοιπους ογκογόνους ιούς. Παρ' όλα αυτά, βάσει του μεγάλου τροπισμού του ιού, υπάρχει η περίπτωση να έχει ισχυρή ογκογονική επίδραση τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα.

Ανακεφαλαιώνοντας, παρ' όλο που υπάρχουν επαρκή στοιχεία που αιτιολογούν έναν πιθανό ρόλο του HCMV στην ογκογένεση, μέσω μελλοντικών ερευνών θα πρέπει να διαλευκανθεί αν ο ιός τελικά είναι υπεύθυνος για το μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα **(Soroceanu & Cobbs, 2011)**.

3. Rho GTPases

3.1. Γενικά

Η οικογένεια των Rho GTPασών ανήκει στην Ras υπεροικογένεια. Οι Rho GTPάσες συντηρούνται σε μεγάλο βαθμό με το πέρασμα των χρόνων και βρίσκονται σχεδόν σε όλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συμβάλλουν σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου της οργάνωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού και των μικροσωληνίσκων, τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τη μεταφορά μέσω κυστιδίων, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική μορφογένεση, την κυτταρική πολικότητα και την κυτταρική μετανάστευση. Επιπλέον, οι Rho GTPάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε παθολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου της προόδου του καρκίνου, τη φλεγμονή και την επιδιόρθωση των τραυμάτων (**Haga & Ridley, 2016**).

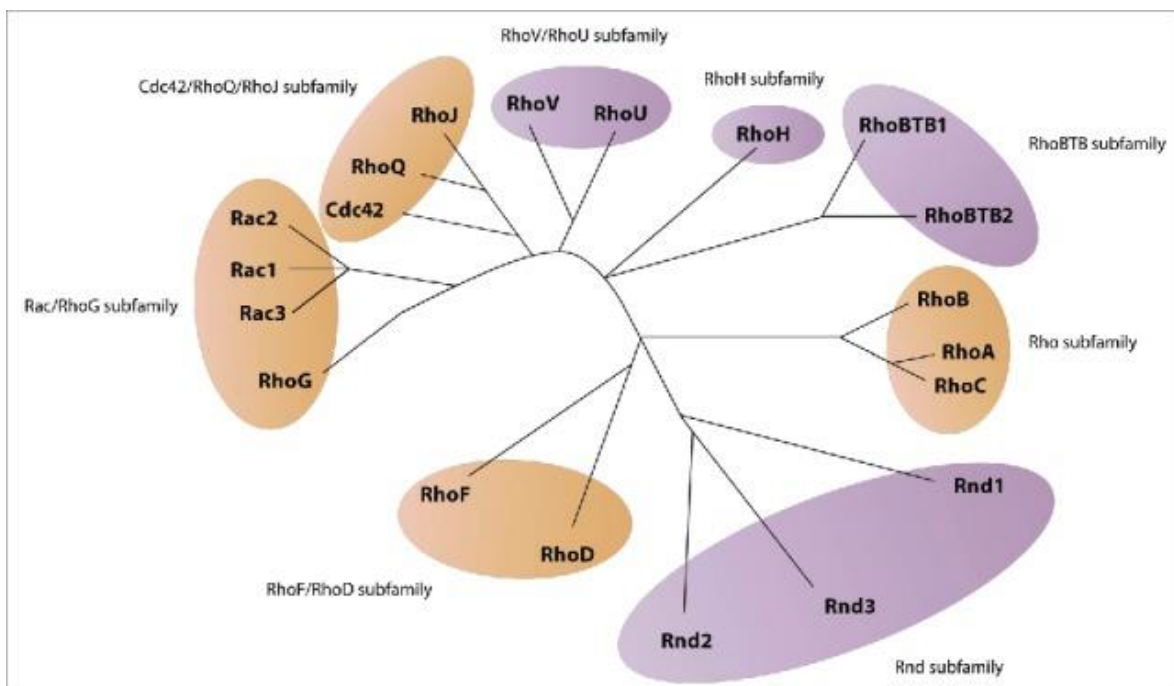
Οι Rho GTPάσες μπορεί να ενεργοποιηθούν από κάποιο εξωκυττάριο σήμα και να ξεκινήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια μέσα από ένα ευρύ αριθμό τελεστών ή στόχων, συμπεριλαμβανομένων των κινασών και των πρωτεϊνών προσαρμογέα. Με αυτή την ενεργοποίηση οδηγούνται σε αλλαγές στη διαμόρφωσή τους, αυξάνοντας την ικανότητά τους να δεσμεύονται στους παράγοντες στόχους τους.

Η οικογένεια των ανθρώπινων Rho GTPασών, συγγενείς με τις πρωτο – ογκογενείς Ras, αποτελούνται από 20 πρωτεΐνες, οι οποίες χωρίζονται σε 8 υπο – οικογένειες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε τυπικές (typical) και άτυπες (atypical), αναλόγως τον τρόπο ρύθμισής τους. Συγκεκριμένα, τις Rho, Rac, Cdc42, RhoH, RhoBTB, Rho, Rnd and Rif (Rif και RhoD) (**Haga & Ridley, 2016; Tseliou et al., 2016**) (**Εικόνα 3**).

3.2. RhoA GTPase

Η RhoA GTPάση ανήκει στην υπο – οικογένεια των Rho GTPασών. Έχει σημαντικό ρόλο σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η ρύθμιση σχηματισμού ινιδίων στρες (stress fibers).

Θεωρείται ως μια από τις πιο καλά μελετημένες Rho GTPάσες, η οποία είναι από τις πρώτες πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής που περιεγράφηκε για τις συγκεκριμένες λειτουργίες της, στην προώθηση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού ακτίνης (**Voena & Chiarle, 2019**). Βάσει μελετών, έχει αποδειχθεί ότι η RhoA διευκολύνει τις λειτουργίες του κυττάρου για μια παραγωγική μόλυνση με HCMV, όπως είναι η αποδιοργάνωση του δικτύου του κυτταροσκελετού σε αρχικά στάδια μόλυνσης ή της έκκρισης IL – 11, τόσο σε φυσιολογικούς ινοβλάστες όσο και σε καρκινικά κύτταρα (**Al-Qahtani et al., 2020**). Επιπλέον, φαίνεται η RhoA να εμπλέκεται σε όλα τα στάδια εξέλιξης του καρκίνου και παίζει σημαντικό ρόλο κατά τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, τον έλεγχο της δημιουργίας της επιθηλιακής πολικότητας, τη συναρμολόγηση και τη διακοπή των επιθηλιακών κυττάρων (**El Baba et al., 2020**).



Εικόνα 3. Η οικογένεια των Rho GTPασών. Η οικογένεια των Rho GTPασών αποτελείται από 20 γονίδια στους ανθρώπους. Η οικογένεια υποδιαιρείται σε 8 υποοικογένειες: Rac/RhoG, Rho, Cdc42/RhoQ/RhoJ, RhoF/RhoD, Rnd, RhoBTB, RhoH και RhoU/RhoV. Αυτές οι υποοικογένειες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως τυπικές (πορτοκαλί κύκλοι) ή άτυπες (μωβ κύκλοι), ανάλογα με τον τρόπο ρύθμισης τους (**Haga & Ridley, 2016**).

Κεφάλαιο 4

4. Γλοιοβλάστωμα

4.1. Γενικά

Οι κακοήθεις όγκοι του εγκεφάλου θεωρούνται από τους πιο επικίνδυνους τύπους καρκίνου, όχι μόνο λόγω της κακής τους διάγνωσης, αλλά και λόγω των άμεσων επιπτώσεων στην ποιότητα ζωής και τη γνωστική λειτουργία.

Το κακοήθες γλοίωμα (Malignant Glioma) είναι ο πιο κοινός τύπος πρωτοπαθούς κακοήθους όγκου στον εγκέφαλο. Η συγκεκριμένη ασθένεια θεωρείται πως είναι πιο συχνή στην 6^η έως την 8^η δεκαετία της ζωής ενός ανθρώπου (**Omuro & DeAngelis, 2013**). Βάσει της Διεθνούς Ταξινόμησης Νοσημάτων – Ογκολογίας (International Classification of Diseases – Oncology, ICD – O – 3) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), τα γλοιώματα μπορούν να ταξινομηθούν σε βαθμίδες ανάλογα την κακοήθη συμπεριφορά τους. Οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι ιστολογικοί τύποι γλοιώματος σε ενήλικες περιλαμβάνουν: το αστροκύτωμα (βαθμίδα I–IV), το ολιγοδενδρογλώωμα (βαθμίδα II–III) και το ολιγοαστρακύτωμα (βαθμίδα II–III) (**Ostrom et al., 2014**).

Το γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma Multiforme, GMB) θεωρείται ο πιο συχνός και ο πιο θανατηφόρος τύπος γλοιώματος στους ενήλικες, κυρίως σε ηλικιωμένους (μέσος όρος ηλικίας, 62 – 64 έτη) και βάσει της παραπάνω ταξινόμησης, ανήκει στη βαθμίδα IV (**Stragliotto et al., 2020**).

Το GMB μπορεί να διαχωριστεί σε 2 τύπους, τον πρωτογενή και το δευτερογενή. Ένα ποσοστό 90 % των περιπτώσεων αναπτύσσεται από φυσιολογικά κύτταρα της γλοίας με ογκογένεση πολλαπλών σταδίων, εντός 3 μηνών. Στο υπόλοιπο 10 % ανήκουν τα δευτερογενή νεοπλάσματα, τα οποία αναπτύσσονται μέσω της εξέλιξης από χαμηλότερης βαθμίδας αστροκύτταρα ή ολιγοδενδρογλώματα, τα οποία διαρκούν 4 – 5 χρόνια.

Το γλοιοβλάστωμα προκύπτει από μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, που περιλαμβάνονται διαδοχικές και αθροιστικές γενετικές αλλοιώσεις, οι οποίες επηρεάζονται από εγγενείς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σπανίως μπορεί να παρατηρηθεί σε ένα

οικογενειακό ιστορικό, αλλά στην περίπτωση που υπάρξει, σχετίζεται με μια διπλάσια αύξηση στον κίνδυνο εμφάνισής του. Δυστυχώς, η έγκαιρη διάγνωση και η θεραπεία του γλοιοβλαστώματος δε βελτιώνουν τα αποτελέσματα, καθώς ο μέσος όρος επιβίωσης μετά από μια τυπική θεραπεία – λαμβάνοντας υπόψη τη χειρουργική εκτομή, τη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία – είναι μόνο 14 μήνες (Ahani et al., 2014; Omuro & DeAngelis, 2013).

4.2. Ο ρόλος του HCMV στο γλοιοβλάστωμα

Η παρουσία των αντιγόνων του HCMV στο GMB αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2002, όταν μετά από μελέτες εντοπίστηκε υψηλό ποσοστό αντιγόνων HCMV σε δείγματα GMB (Lawler, 2015). Μέσω των κατάλληλων τεχνικών ανίχνευσης, στο μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων κακοήθους γλοιώματος έχουν ανιχνευθεί και αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων και πρωτεΐνες του HCMV. Συνολικά, από αυτές τις μελέτες οι ιικές πρωτεΐνες οι οποίες βρέθηκαν είναι οι IE1, US28, pp65, gB, HCMV IL – 10 και pp28, καθώς και τα γονίδια IE1 και gB. Η πρωτεΐνη, η οποία είναι η πιο μελετημένη είναι η IE1 και παρατηρείται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τις υπόλοιπες. Βέβαια, πέρα από την ύπαρξη των ιικών πρωτεϊνών βρέθηκαν περιοχές του γονιδιώματος και ολιγονουκλεοτίδια του HCMV, κάτι που δεν ισχύει για τις φυσιολογικές περιοχές του εγκεφάλου γύρω από τον όγκο του γλοιοβλαστώματος (Dziurzynski et al., 2012).

4.2.1. Ο κύκλος ζωής του HCMV στο γλοιοβλάστωμα

Στην περίπτωση του γλοιοβλαστώματος, ο HCMV δεν πραγματοποιεί ούτε τη λυτική αλλά και ούτε τη λανθάνουσα μόλυνση. Παρόλο που υπάρχει η έκφραση των γονιδίων IE1 και IE2 – που πραγματοποιείται κατά τη λυτική μόλυνση και όχι τη λανθάνουσα – δεν παράγονται μολυσματικά ισωμάτια. Με αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα οδηγούνται προς το τελικό τους στάδιο, δηλαδή τη λύση τους (Dziurzynski et al., 2012).

4.2.2. Θεραπεία του γλοιοβλαστώματος μέσω ιικής φαρμακευτικής αγωγής και ανοσοθεραπείας

Το Valganciclovir είναι ένα προφάρμακο που μεταβολίζεται σε ganciclovir, ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο το οποίο αναστέλλει τη σύνθεση του ιικού DNA και έχει εγκριθεί για τη

συστηματική θεραπεία, η οποία σχετίζεται με τον HCMV (**McFaline-Figueroa & Wen, 2017; Stragliotto et al., 2020**). Η συγκεκριμένη θεραπεία οδήγησε σε αύξηση του χρόνου ζωής των ασθενών, οι οποίοι πάσχουν από γλοιοβλάστωμα.

Το Cidofovir, ένα άλλο νουκλεοσιδικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία του HCMV, ώθησε να πραγματοποιηθεί απόπτωση σε καλλιέργειες γλοιοβλαστώματος, οι οποίες είτε είχαν μολυνθεί από τον HCMV, είτε όχι. Με αυτό τον τρόπο λοιπόν, η συγκεκριμένη θεραπεία μπορεί να δράσει σε όγκους γλοιοβλαστώματος ακόμα κι αν δεν υπάρχει κάποια μόλυνση από τον HCMV (**Krenzlin et al., 2019; McFaline-Figueroa & Wen, 2017**).

Όσον αφορά τις ειδικές ανοσοθεραπείες, αναδεικνύονται ως ένα ισχυρό εργαλείο για τη θεραπεία της νόσου, λόγω της αποτελεσματικότητας και της ειδικότητάς τους. Γενικά, υπάρχουν πολλές καινοτόμες μέθοδοι οι οποίες εξετάζονται. Κάποιες από αυτές είναι ο πεπτιδικός εμβολιασμός έναντι των αντιγόνων του όγκου του γλοιοβλαστώματος, η χρήση HCMV ειδικών T – κυττάρων και παλμικών δενδριτικών κυττάρων (DCs) (**Duinkerken et al., 2016; McFaline-Figueroa & Wen, 2017**).

Κεφάλαιο 5

5. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2)

5.1. Γενικά

Η επιγενετική απορρύθμιση των κυτταρικών προγραμμάτων είναι το σήμα κατατεθέν των ανθρωπίνων καρκίνων. Η επιγενετική σχετίζεται με οποιαδήποτε διαδικασία που τροποποιεί τη γονιδιακή δραστηριότητα, χωρίς όμως να αλλάζει η αλληλουχία του DNA και να οδηγεί σε τροποποιήσεις που μπορούν να μεταδοθούν σε θυγατρικά κύτταρα. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν: DNA – μεθυλίωση, μη κωδικοποιημένα – RNAs και μια ομάδα ιστονών (Idris et al., 2016).

Ο EZH2 ανήκει στην οικογένεια των γονιδίων της ομάδας polycomb (PcGs), η οποία περιλαμβάνει σημαντικούς παράγοντες που καταστέλλουν τη μεταγραφή. Το κατασταλτικό σύμπλοκο Polycomb 2 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2) είναι ένα από τα δύο σύμπλοκα πυρηνικών πρωτεϊνών PcG και μεσολαβεί στη σίγηση (silencing) των γονιδίων, κυρίως μέσω της τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Ο EZH2 είναι μια ενζυμική καταλυτική υπομονάδα του PRC2, που μπορεί να μεταβάλει τη γονιδιακή έκφραση, με τριμεθυλίωση της Lys – 27, σε ιστόνη 3 (H3K27me3). Το H3K27me3 σχετίζεται με την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων και θεωρείται ως κρίσιμο επιγενετικό συμβάν στη διάρκεια ανάπτυξης των ιστών και τον προσδιορισμό λειτουργίας των βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, ο EZH2 παράγοντας συμμετέχει στη ρύθμιση αρκετών κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι η αυτοφαγία και η απόπτωση, η επιδιόρθωση βλάβης του DNA και η αναστολή της κυτταρικής γήρανσης. Για το λόγο αυτό, επειδή δηλαδή συμμετέχει σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, σχετίζεται με πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Duan et al., 2020) (Εικόνα 3).

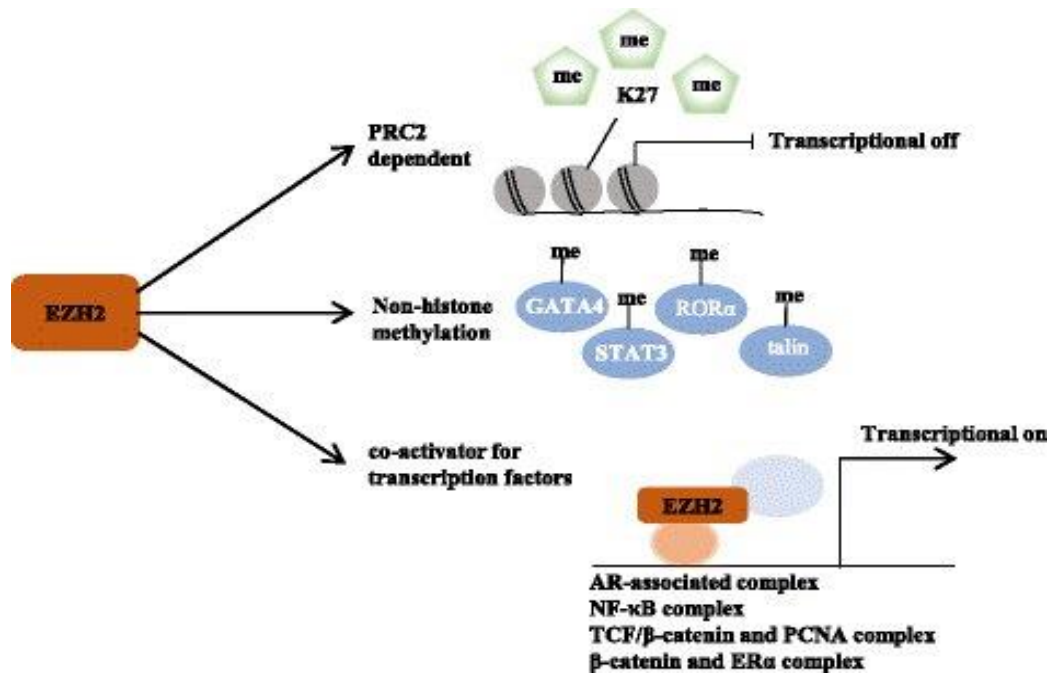
5.2. Οι βιολογικές λειτουργίες του EZH2

Ο κύριος ρόλος του EZH2 είναι η επιλεκτική καταστολή της μετάφρασης των γονιδίων, μέσω τροποποιήσεων της χρωματίνης. Αποτελεί ένα αναπόσπαστο μέρος του συμπλόκου PRC2. Το σύμπλοκο αυτό, αποτελείται από τέσσερις βασικές πρωτεΐνες: EZH2, EED, SUZ12

και RBBP4 και RBBP7, γνωστές και ως RbAp48 και RbAp46 αντίστοιχα και είναι υπεύθυνες για την τροποποίηση της λυσίνης H3 σε λυσίνη 27 (H3K27me3) **(Εικόνα 4)**. Σε αυτό το βασικό σύμπλοκο μπορεί να συνδεθούν και κάποιες επιπλέον υπομονάδες βασικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι η AEBP2, JARID2, και PCL. Και με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται το σύμπλοκο holc – PRC2. Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου αυτού, αποτελούν μια εξελικτικά συντηρημένη οικογένεια ρυθμιστών της χρωματίνης, και θεωρούνται περισσότερο διαδεδομένοι για τη λειτουργία τους στη δημιουργία και τη διατήρηση της επιγενετικής μνήμης, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης **(Batool et al., 2019; Vizán et al., 2015)**.

Ο EZH2 θεωρείται η κύρια καταλυτική υπομονάδα του PRC2, που για να ενεργοποιηθεί χρειάζεται και η παρουσία των 2 μη καταλυτικών μονάδων, του EED και του SUZ12. Διαφορετικά, στην περίπτωση που απουσιάζουν αυτές οι μονάδες, ο EZH2 δεν επιτρέπει στον εαυτό του να εκφραστεί (autoinhibited) **(Laugesen et al., 2019)**.

Ο EZH2 με τη βοήθεια του H3K27me3, εκτός από το να καταστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία, μπορεί και να οδηγήσει σε αυτή τη λειτουργία μέσω της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών (μη – ιστόνες), εξαρτώμενο από το σύμπλοκο PRC2. Από την άλλη μεριά, ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας μπορεί να οδηγήσει είτε μέσω της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών (μη – ιστόνες), είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της μεταγραφικής λειτουργίας, λειτουργώντας ανεξάρτητα από το σύμπλοκο PRC2 **(Gan et al., 2018; Laugesen et al., 2019)** **(Εικόνα 3)**.



Εικόνα 4. Οι λειτουργίες του EZH2. 1) Ο EZH2 καταλύει το H3K27me3, το οποίο εξαρτάται από το PRC2, το οποίο με τη σειρά του, συμβάλλει στη μεταγραφική σίγηση. 2) Ο EZH2 μπορεί να οδηγήσει σε μεθυλίωση μη ιστονών (π.χ. STAT3, GATA4, talin, και RORα) και είτε εμπλέκονται σε μεταγραφική σίγηση είτε σε μεταγραφική ενεργοποίηση. 3) Ο EZH2 μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική ενεργοποίηση, χωρίς να εξαρτάται από το PRC2, λειτουργώντας ως συν – ενεργοποιητής για μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι το AR – σχετιζόμενο σύμπλοκο, η σηματοδότηση NF – κB, τους παράγοντες TCF/β –catenin και PCNA, και β – catenin και ERα (Gan et al., 2018).

5.3. Ο ρόλος του EZH2 στον καρκίνο

Ο ευρύς βιολογικός ρόλος του EZH2 και ιδιαίτερα, η βαθιά εμπλοκή του στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καθώς και ο κεντρικός του ρόλος σε πολλές κυτταρικές οδούς εξηγεί γιατί η δυσλειτουργία του σχετίζεται με τον καρκίνο (Stazi et al., 2017). Σε πολλές μελέτες έχει παρατηρηθεί πως ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας παρουσιάζεται σε αυξημένα επίπεδα σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού, του προστάτη, σε αιματολογικές κακοήθειες (B – cell lymphoma) και πολλούς άλλους. Η υπερэкφραση αυτή σχετίζεται με επιθετικότητα, μετάσταση και κακή πρόγνωση στους περισσότερους τύπους καρκίνου (Stazi et al., 2017; Tan et al., 2014).

Η δυσλειτουργία του EZH2, σχετίζεται με πολλές διαδικασίες, οι οποίες αφορούν τη δημιουργία κάποιου όγκου. Αρχικά, εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και σε περίπτωση δυσλειτουργίας, μπορεί να επιταχύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

και να ευνοήσει την κυτταρική επιβίωση, οδηγώντας σε ανάπτυξη καρκίνου. Επιπλέον, μπορεί να ενισχύσει την Επιθηλιακή – Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) και να διηθήσει σε κάποιους όγκους, όπου αυτό μπορεί να οδηγήσει και στη μετάσταση (**Gan et al., 2018; Yan et al., 2017**).

Η έκφραση και η δράση του EZH2 στα καρκινικά κύτταρα διαχωρίζεται σε γενετικό, μεταγραφικό και μετα – μεταφραστικό επίπεδο. Λόγω της πολυπλοκότητας της ρύθμισης αυτού του επιγενετικού παράγοντα από πολλαπλές μοριακές οδούς, μπορεί να δοθεί εξήγηση των πολλών διαφορετικών λειτουργιών του, σε διαφορετικούς τύπους όγκων. Σε γενετικό επίπεδο, έχουν βρεθεί κάποιες μεταλλάξεις στο γονίδιο του EZH2, σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Όταν η μετάλλαξη αυτή οδηγήσει σε υπερέκφραση (gain – of – function) του EZH2, τότε έχουμε αυξημένα επίπεδα τριμεθυλίωσης H3K27 (H3K27me3) και συνεπώς, σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Στην περίπτωση όπου η μετάλλαξη οδηγήσει σε υποέκφραση (loss – of – function) του EZH2, τότε μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση ορισμένων καρκίνων (**Christofides et al., 2016**). Η μετα – μεταγραφική ρύθμιση για την έκφραση του EZH2, ρυθμίζεται μέσω micro – RNAs (miRs). Συγκεκριμένα, τα miRs μπορούν να συνδεθούν στο αντίγραφο του EZH2, ρυθμίζοντας τη σταθερότητα, την ακεραιότητα και τη μετάφρασή του, επηρεάζοντας άμεσα τα επίπεδα πρωτεΐνης του EZH2. Η μειωμένη ρύθμιση των miR, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση του EZH2 και να συνεπώς, σε αυξημένα επίπεδα H3K27me3, οδηγώντας έτσι, σε ογκογένεση. Όσον αφορά τη μετα – μεταφραστική ρύθμιση του EZH2, μπορεί να γίνει μέσω φωσφορυλιώσεων και ουμπικουιτιλιώσεων (ubiquitinylation) (**Christofides et al., 2016; Yan et al., 2017**).

Κεφάλαιο 6

6. Υλικά και μέθοδοι

6.1. Κύτταρα και ιός

Για την υλοποίηση του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος «U373MG».

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM High Glucose όπου ήταν αναμειγμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη.

Τα κύτταρα διατηρούνταν σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο, σε θερμοκρασία 37 °C και 5% CO₂.

Ο ιός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus), HCMV AD169wt strain.

6.2. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)

Για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκαν είτε 6 είτε 12 «well – plates» για την επίστρωση των κυττάρων.

Αφού πλύθηκαν με PBS, τα κύτταρα ξεκόλλησαν από το πιάτο και «σηκώθηκαν», φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, στις 2.500 rcf στροφές, στους 4 °C. Αφού λοιπόν, αφαιρεθεί το υπερκείμενο και η πελέττα διαλυθεί μέσω του διαλύματος λύσης (M – PER Mammalian Protein Extraction Reagent), γίνεται η προσθήκη των αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitors), με αραιώση 1/500. Αφού πραγματοποιηθεί vortex στα δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για 20 λεπτά, γίνεται φυγοκέντρηση στις 14.000 rcf, για 15 λεπτά, στους 4 °C και συλλέγεται το υπερκείμενο, όπου και φυλάσσεται στους -80 °C. Πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη διάρκεια της όλης διαδικασίας, τα δείγματα θα πρέπει να παραμένουν στον πάγο, για την προστασία τους από τη δράση των πρωτεασών. Αφού ολοκληρωθεί η πρωτεϊνική απομόνωση, σειρά έχει η ηλεκτροφόρησή τους σε SDS – gel πολυακρυλαμίδης. Το gel αυτό αποτελείται από δύο μέρη: το «Resolving» και το «Stacking» gel, αντίστοιχα.

➤ Resolving gel

Συστατικά / Όγκο Gel	10 ml (συνολικός όγκος)
H ₂ O	4.0 ml
30% acrylamide mix	3.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% ammonium persulfate (APS)	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

➤ Stacking gel

Συστατικά / Όγκο Gel	6 ml (συνολικός όγκος)
H ₂ O	4.1 ml
30% acrylamide mix	1.0 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.75 ml
10 % SDS	0.06 ml
10% ammonium persulfate (APS)	0.06 ml
TEMED	0.006 ml

Αρχικά, τα δείγματα θα πρέπει να ξεπαγώσουν από τους – 80 °C και να πραγματοποιηθεί Vortexing, καθώς διατηρούνται σε πάγο. Στη συνέχεια, θα προστεθεί στην ποσότητα η οποία θα φορτωθεί στο gel, το loading buffer, το οποίο είναι αποθηκευμένο στους – 20 °C. Αφού τοποθετηθούν τα δείγματα σε θερμοκρασία 95 °C, για 20 λεπτά, προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη των πρωτεϊνών, φορτώνονται στο gel, το οποίο είναι τοποθετημένο σε ειδική συσκευή. Πριν τα δείγματα φορτωθούν, θα πρέπει να προστεθεί το Running Buffer, όπου για την προετοιμασία του χρειάζονται:

Συστατικά / Όγκο Gel	
H ₂ O	560 ml
Running buffer 10x	40 ml
SDS	4 ml

Εκτός από τις πρωτεΐνες, θα φορτωθεί και ο κατάλληλος ladder. Αφού πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το gel σε μεμβράνη PVDF. Η μεταφορά αυτή λαμβάνει μέρος σε ειδική συσκευή, στην οποία έχουν πακεταριστεί σε μορφή «sandwich» το gel με τη μεμβράνη PVDF, έχοντας προστεθεί το Transfer Buffer στο εσωτερικό της:

Συστατικά / Όγκο Gel	
H ₂ O	700 ml
μεθανόλη	200 ml
Running Buffer 10x	100 ml

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη PVDF, όσες θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης έχουν απομείνει στη μεμβράνη, μπλοκάρονται ύστερα από την επώασή της, με Blocking Buffer. Αναλόγως το είδος του αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί, θα έχουμε 5% w/v non fat milk ή BSA, τα οποία διαλύονται σε TBS – T, για 1 ώρα. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται «overnight», στους 4 °C, με πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody), το οποίο έχει αραιωθεί σε TBS – T και το οποίο περιέχει 1% low – fat milk ή BSA. Τα πρωτογενή αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι mouse anti – actin και rabbit anti – EZH2. Το πρώτο αραιώνεται σε TBS – T με non – fat milk, ενώ το δεύτερο με BSA. Έπειτα, γίνονται πλύσεις της μεμβράνης με TBS – T και ακολουθεί επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δευτερογενή αντισώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εξαρτώνται από το πρωτογενές αντίσωμα. Στην περίπτωση του mouse anti – actin, θα χρησιμοποιηθεί anti – mouse HRP, ενώ στο rabbit – anti EZH2, anti – rabbit HRP. Το δευτερογενές αντίσωμα αραιώνεται σε

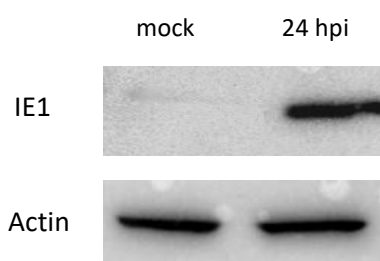
TBS – T με 1% low – fat milk ή BSA, λαμβάνοντας υπόψιν το πρωτογενές αντίσωμα. Μετά από πλύσεις με TBS – T και στέγνωμα της μεμβράνης, πραγματοποιείται η απεικόνιση της επιθυμητής πρωτεΐνης μέσω του ChemiDoc, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image Lab (BioRad). Για την απεικόνιση γίνεται προσθήκη ECL, που έχει ως υπόστρωμα το δευτερογενές αντίσωμα HRP .

Κεφάλαιο 7

7. Αποτελέσματα

7.1. Μελέτη της έκφρασης της άμεσα πρώιμης ιικής πρωτεΐνης IE1 σε κύτταρα ινοβλαστών

Αρχικά επιβεβαιώθηκε με Western Blot η αποτελεσματική μόλυνση από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό (Human Cytomegalovirus, HCMV). Κύτταρα ανθρώπινων ινοβλαστών (Human Foreskin Fibroblasts, HFF) χρησιμοποιήθηκαν και μολύνθηκαν με τον HCMV για 24 ώρες. Ακολούθως επώαστηκαν με το ειδικό αντίσωμα για την άμεσα πρώιμη πρωτεΐνη του ιού (IE1). Παρατηρήθηκε αποτελεσματική έκφραση της συγκεκριμένης ιικής πρωτεΐνης και συνεπώς αποτελεσματική μόλυνση των κυττάρων. Ακολούθησαν πειράματα που περιλάμβαναν τη μόλυνση κυττάρων και μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 και της RhoA GTPάσης (**Εικόνα 5**).



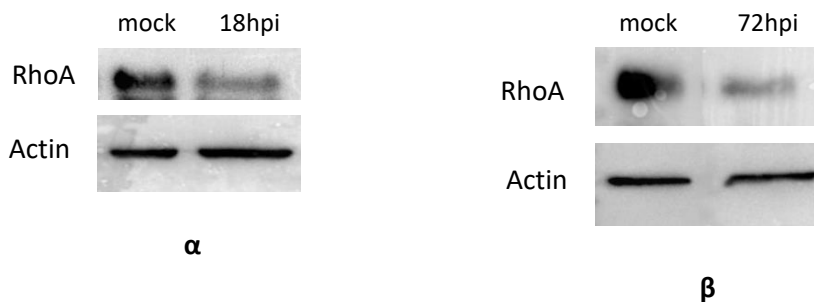
Εικόνα 5. Μόλυνση κυττάρων HFF με HCMV για 24 ώρες. Έκφραση IE1 στα μολυσμένα κύτταρα.

7.2. Μελέτη της έκφρασης της RhoA GTPάσης σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG

Αρχικά, στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της μόλυνσης με HCMV στα επίπεδα έκφρασης της RhoA πρωτεΐνης, σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG σε δύο διαφορετικά σημεία μόλυνσης. Τα αποτελέσματα του Western Blot αποκάλυψαν μια τάση μείωσης της έκφρασης της RhoA μεταξύ των μη μολυσμένων και μολυσμένων κυττάρων

18 ώρες μετά τη μόλυνση (**Εικόνα 6α**). Παρόμοιο φαινόμενο τάσης μείωσης στην έκφραση της RhoA παρατηρήθηκε και 72 ώρες μετά τη μόλυνση με τον ιό (**Εικόνα 6β**).

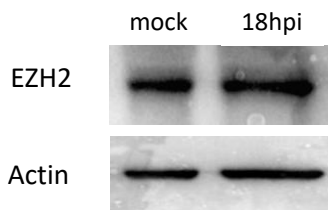
Αξίζει να σημειωθεί πως βάσει κάποιων μελετών που πραγματοποιήθηκαν για τις Rho GTPases σε κύτταρα ινοβλαστών, μολύνοντάς τα με τον HCMV, αποδείχθηκε πως με το πέρασ των ημερών της μόλυνσης αυξάνεται η έκφραση της RhoB κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (**Goulidaki et al., 2015**). Αυτό το γεγονός ίσως υποδεικνύει ότι οι διαφορετικές πρωτεΐνες της οικογένειας των Rho GTPασών, όπως η RhoA GTPase και η RhoB GTPase συμπεριφέρονται διαφορετικά σε περίπτωση μόλυνσης από κάποιον ερπητοϊό και η πρωτεϊνική τους έκφραση επηρεάζεται ποικιλοτρόπως, και στη συγκεκριμένη περίπτωση, από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό HCMV.



Εικόνα 6α. Έκφραση της RhoA GTPase σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό HCMV, κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της έκφρασης RhoA GTPase μετά από μόλυνση 18 ωρών. **β.** Έκφραση της RhoA GTPase σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό HCMV, κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Υπάρχει μια τάση μείωσης της έκφρασης της RhoA μετά από μόλυνση 72 ώρες μετά τη μόλυνση.

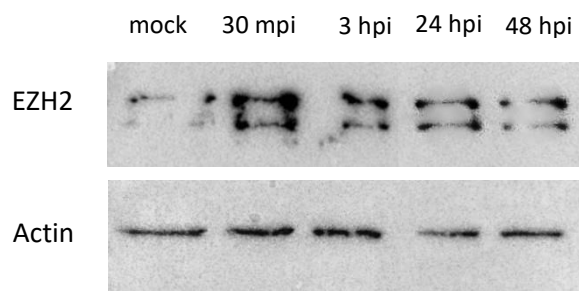
7.3. Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκφραση ρύθμισης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε συνθήκες μόλυνσης και μη, της κυτταρικής σειράς γλοιοβλαστώματος U373MG. Αρχικά, εξετάστηκε η έκφραση του επιγενετικού παράγοντα σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 18 ώρες (18hpi) κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Στο συγκεκριμένο σημείο μόλυνσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο επίπεδο έκφρασης του EZH2 (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Μελέτη με Western Blot, της έκφρασης του EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 18 ώρες με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα, τόσο στα μη μολυσμένα όσο και στα μολυσμένα για 18 ώρες με τον ιό κύτταρα.

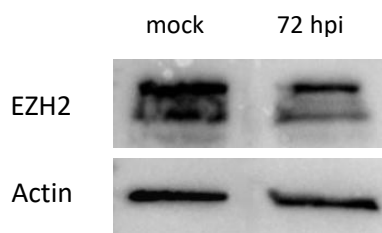
Ακολούθως, αποφασίστηκε να διευκρινιστεί αν υπάρχει διακύμανση στα επίπεδα έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε διάφορα χρονικά σημεία μόλυνσης από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό πέραν των 18 ωρών, και αν η μόλυνση με HCMV επηρεάζει την έκφραση του συγκεκριμένου επιγενετικού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση του EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα σε 4 διαφορετικά χρονικά σημεία με τον HCMV κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Για το συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν μικρότερα χρονικά σημεία μόλυνσης με τον ιό. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώιμη μόλυνση (early infection) παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση στην έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2 30 λεπτά μετά τη μόλυνση. Στις 3 ώρες μετά τη μόλυνση με τον HCMV, διατηρήθηκε αυτή η τάση για αύξηση του EZH2. Βέβαια, στις 24 και 48 παρατηρείται παρόμοιο επίπεδο έκφρασης του συγκεκριμένου παράγοντα τόσο στα μολυσμένα, όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. **(Εικόνα 8)**. Αξίζει να σημειώσουμε πως πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει αυξημένη έκφραση του EZH2 παράγοντα σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων. Επιπροσθέτως, έχει αποδειχτεί πως σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων και σε πρώιμα στάδια μόλυνσης, η έκφραση του EZH2 παρουσιάζει μείωση **(Svrlanska et al., 2019)**.



Εικόνα 8. Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG 30 λεπτά, 3, 24 και 48 ώρες μετά τη μόλυνση αντίστοιχα.

7.4. Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 72 ώρες με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG

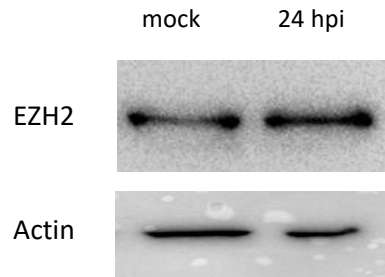
Στη συνέχεια των πειραμάτων μας, μελετήσαμε την επίδραση της μόλυνσης με HCMV σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG για 72 ώρες και με μεγαλύτερο multiplicity of infection (MOI). Προκειμένου να διερευνήσουμε αν σε ακόμη πιο μεγάλο χρονικό σημείο της μόλυνσης και με μεγαλύτερη ιική μόλυνση, εξετάστηκε εάν η έκφραση του EZH2 επηρεάζεται 72 ώρες μετά τη μόλυνση από τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό HCMV. Αυτό που παρατηρήσαμε ήταν μια τάση για μείωση της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα στο συγκεκριμένο σημείο μόλυνσης (**Εικόνα 9**). Επομένως συμπεραίνουμε και με βάση τα αποτελέσματα και των πειραμάτων μας που αναφέραμε παραπάνω πως τα επίπεδα έκφρασης του EZH2 μεταβάλλονται δυναμικά ανάλογα με το χρονικό σημείο και το επίπεδο της μόλυνσης.



Εικόνα 9. Μελέτη με Western Blot, της έκφρασης του EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 72 ώρες με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης στην έκφρασης του EZH2.

7.5. Μελέτη της έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα ινοβλαστών

Στη συνέχεια κι έπειτα από την παρατήρησή μας στα μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος για 24 ώρες κατά την οποία δεν παρατηρήσαμε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του EZH2 σε αυτά τα κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα μη μολυσμένα, θελήσαμε να δούμε αν παρατηρείται παρόμοιο μοτίβο έκφρασης και σε κύτταρα ινοβλαστών. Αξίζει να σημειωθεί πως στο χρονικό σημείο των 24 ωρών μόλυνσης, πραγματοποιείται και η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου επιγενετικού παράγοντα στους δύο τύπους κυττάρων, ινοβλαστών και κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν το γεγονός μιας τάσης προς αύξηση στην έκφραση του EZH2 στα μολυσμένα με ιό κύτταρα ινοβλαστών (**Εικόνα 10**). Παρόμοια αποτελέσματα από παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση του EZH2 αυξάνει σε μολυσμένους με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό ινοβλάστες (**Sourvinos et al., 2014**).



Εικόνα 10. Μελέτη με Western Blot, της έκφρασης του EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 24 ώρες με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) κύτταρα ινοβλαστών HFF. Παρατηρήθηκε μία τάση προς αύξηση στην έκφραση του συγκεκριμένου επιγενετικού παράγοντα.

8. Συζήτηση

Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός βάσει μελετών αποδείχθηκε πως παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκίνου του γλοιοβλαστώματος, μέσω της ογκοτρόπου δράσης του. Ο HCMV, όπως και κάθε ιός, με τη βοήθεια των μηχανισμών του κυττάρου που μολύνει, μπορεί και πολλαπλασιάζεται και τελικά να εξαπλώνεται μέσα στον οργανισμό. Κάποια κυτταρικά μόρια με τα οποία αλληλοεπιδρά και που τον βοηθούν στην πρόοδο της μόλυνσής του είναι ο επιγενετικός παράγοντας EZH2 και η πρωτεΐνη ρύθμισης του κυτταροσκελετού RhoA GTPάση. Ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας καθώς και η RhoA GTPάση, επιδρούν σημαντικά στο το πώς μπορεί να εξελιχθεί η πρόοδος του γλοιοβλαστώματος. Συνεπώς, αναφορικά με τα παραπάνω στοιχεία, ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να εξεταστεί ο πιθανός ρόλος που έχει ο EZH2 καθώς και η RhoA στην πρόοδο της μόλυνσης του HCMV στο κύτταρα γλοιοβλαστώματος, σε συνθήκες μόλυνσης και μη, με τον HCMV.

Αναφορικά με τη μελέτη της έκφρασης της RhoA GTPάσης σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, με τον HCMV παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της RhoA συγκριτικά με τα μολυσμένα και μη κύτταρα, μετά από μόλυνση 18 ωρών (**Εικόνα 6α**). Ένα παρόμοιο φαινόμενο τάσης μείωσης όσον αφορά την έκφραση της RhoA, σημειώθηκε και μετά από 72 ώρες μόλυνσης με τον ιό (**Εικόνα 6β**). Αυτό υποδηλώνει πως η μείωση της RhoA από μια παλαιότερη μελέτη, οδηγεί σε αποδιοργάνωση της ακτίνης, επηρεάζοντας έτσι, την κυτταρική μετανάστευση (**Zacharopoulou et al., 2018**). Αυτό συμβαίνει διότι λειτουργεί ως καταλυτικός παράγοντας στη διαμόρφωση του σχήματος, τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της συγκεκριμένης σειράς (**Tseliou et al., 2016**). Επιπλέον, σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ινοβλάστες, η μείωση των επιπέδων έκφρασης της RhoA από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό έχει παρατηρηθεί στα αρχικά στάδια της μόλυνσης και αυτό έχει ως σκοπό τη διευκόλυνση μεταφοράς του στον πυρήνα (**van den Broeke & Favoreel, 2011**).

Όσον αφορά τον παράγοντα EZH2, αρχικά μελετήθηκε η έκφρασή του σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος για 18 ώρες, χωρίς όμως να υπάρξει κάποια σημαντική διαφορά (**Εικόνα 7**). Για το λόγο αυτόν, επιλέχθηκαν διαφορετικά

χρονικά σημεία μόλυνσης από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό, για να παρατηρηθεί τυχόν μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του επιγενετικού παράγοντα. Ειδικότερα, μελετήθηκαν 4 διαφορετικά χρονικά σημεία μόλυνσης με τον HCMV για να παρατηρηθεί η έκφραση του EZH2 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Πιο συγκεκριμένα, σε πολύ πρώιμα στάδια της μόλυνσης (early infection), 30 λεπτά δηλαδή μετά τη μόλυνση, παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση στην έκφραση του EZH2, η οποία διατηρήθηκε και στις 3 ώρες μετά τη μόλυνση. Σε ίδια επίπεδα βρέθηκε η έκφραση του EZH2 στις 24 και 48 ώρες τόσο σε μολυσμένα, όσο και σε μη μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG (**Εικόνα 8**). Με βάση μια άλλη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ινοβλάστες, φαίνεται πως ο HCMV αλληλοεπιδρά με το συγκεκριμένο επιγενετικό παράγοντα στα αρχικά στάδια της μόλυνσης. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί από το γεγονός ότι ο παράγοντας EZH2 δείχνει να εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα κατά τη μόλυνση με τον ιό, μια ημέρα μετά τη μόλυνση, διότι συμμετέχει στην αντιγραφή του ιικού DNA (**Svrlanska et al., 2019**). Εκτός από τα παραπάνω χρονικά σημεία μόλυνσης έγινε μελέτη σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG, για 72 ώρες. Αυτό πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί η πιθανότητα αύξησης ή μείωσης της έκφρασης του EZH2, με ισχυρότερη ιική μόλυνση. Τελικά, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν μια τάση μείωσης της έκφρασης του γενετικού παράγοντα στο συγκεκριμένο σημείο μόλυνσης (**Εικόνα 9**). Συνεπώς, βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων αποδεικνύεται ότι τα επίπεδα έκφρασης του EZH2 διαφοροποιούνται ανάλογα με το χρονικό σημείο καθώς και το επίπεδο της μόλυνσης.

Κλείνοντας, ύστερα από την παρατήρηση των μολυσμένων κυττάρων γλοιοβλαστώματος U373MG για 24 ώρες, όπως προαναφέρθηκε, δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου επιγενετικού παράγοντα, συγκριτικά με αυτά που δεν είχαν μολυνθεί. Για τον λόγο αυτό, έγινε μόλυνση σε κύτταρα ινοβλαστών για να δούμε αν θα υπάρξει κάποιο παρόμοιο μοτίβο έκφρασης. Ο λόγος για τον οποίο θέλουμε να ελέγξουμε περαιτέρω το συγκεκριμένο χρονικό σημείο είναι γιατί στις 24 ώρες μόλυνσης, πραγματοποιείται η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Κατά συνέπεια, θα ήταν ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα επίπεδα έκφρασης του EZH2 στους δύο τύπους κυττάρων, σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος και ινοβλαστών. Παρατηρήθηκε λοιπόν, πως υπήρξε μια τάση προς αύξηση στην έκφραση του EZH2 στα μολυσμένα με ιό, κύτταρα ινοβλαστών (**Εικόνα 10**). Από παλαιότερες μελέτες, βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα όπου δείχνουν

πως η έκφραση του EZH2 αυξάνει σε μολυσμένους με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό, ινοβλάστες (Sourvinos et al., 2014).

Συνοψίζοντας, όλες οι παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, υποδεικνύουν μια πιθανή σχέση αλληλεπίδρασης της RhoA GTPάσης και του Ανθρώπινου Κυτταρομεγαλοϊού σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από τα διάφορα χρονικά σημεία της μόλυνσης στη διάρκεια των οποίων μελετάται.

Επιπλέον, παρατηρήσαμε πως ίσως υπάρχει και μια πιθανή σχέση στην έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2 με τη μόλυνση από HCMV κυττάρων γλοιοβλαστώματος.

Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται βεβαίως, προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η σχέση των μορίων αυτών με τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό και κατά πόσο η δράση τους αυτή επηρεάζει την πρόοδο της μόλυνσης από τον ιό.

Βιβλιογραφία

- Ahani, N., Nikraves, A., Shirkoobi, R., Karimi Arzenani, M., Rokouei, M., & Alipour Eskandani, M. (2014). Detection of human cytomegalovirus in glioma tumor tissues. *Comparative Clinical Pathology*, 23(5). <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1783-8>
- Al-Qahtani, A. A., Alarifi, S., Alkahtani, S., Stournaras, C., & Sourvinos, G. (2020). Efficient proliferation and mitosis of glioblastoma cells infected with human cytomegalovirus is mediated by RhoA GTPase. *Molecular Medicine Reports*, 22(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11434>
- Batool, A., Jin, C., & Liu, Y. X. (2019). Role of EZH2 in cell lineage determination and relative signaling pathways. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 24(5). <https://doi.org/10.2741/4760>
- Boeckh, M., & Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 121, Issue 5). <https://doi.org/10.1172/JCI45449>
- Christofides, A., Karantanos, T., Bardhan, K., & Boussiotis, V. A. (2016). Epigenetic regulation of cancer biology and anti-tumor immunity by EZH2. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 51). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12928>
- Collins-McMillen, D., Buehler, J., Peppenelli, M., & Goodrum, F. (2018). Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/v10080444>
- Crimi, S., Fiorillo, L., Bianchi, A., D'amico, C., Amoroso, G., Gorassini, F., Mastroieni, R., Marino, S., Scoglio, C., Catalano, F., Campagna, P., Bocchieri, S., De Stefano, R., Fiorillo, M. T., & Cicciù, M. (2019). Herpes virus, oral clinical signs and qol: Systematic review of recent data. In *Viruses* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/v11050463>
- Dooley, A. L., & O'Connor, C. M. (2020). Regulation of the MIE locus during HCMV latency and reactivation. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/pathogens9110869>
- Duan, R., Du, W., & Guo, W. (2020). EZH2: A novel target for cancer treatment. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00937-8>
- Duinkerken, S., van Kooyk, Y., & Garcia-Vallejo, J. J. (2016). Human cytomegalovirus-based immunotherapy to treat glioblastoma: Into the future. *Oncolmmunology*, 5(9). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1214791>

- Dupont, L., & Reeves, M. B. (2016). Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. In *Reviews in Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/rmv.1862>
- Dziurzynski, K., Chang, S. M., Heimberger, A. B., Kalejta, R. F., Dallas, S. R. M. G., Smit, M., Soroceanu, L., & Cobbs, C. S. (2012). Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *14*(3). <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor227>
- El Baba, N., Farran, M., Khalil, E. A., Jaafar, L., Fakhoury, I., & El-Sibai, M. (2020). The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells. In *Analytical Cellular Pathology* (Vol. 2020). <https://doi.org/10.1155/2020/2097214>
- El Helou, G., & Razonable, R. R. (2019). Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients: An evidence-based review. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 12). <https://doi.org/10.2147/IDR.S180908>
- Elder, E., & Sinclair, J. (2019). HCMV latency: what regulates the regulators? In *Medical Microbiology and Immunology* (Vol. 208, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00581-1>
- Evers, D. L., Wang, X., & Huang, E. S. (2004). Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection. In *Microbes and Infection* (Vol. 6, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.026>
- Gan, L., Yang, Y., Li, Q., Feng, Y., Liu, T., & Guo, W. (2018). Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential. In *Biomarker Research* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40364-018-0122-2>
- Gerna, G., Baldanti, F., & Revello, M. G. (2004). Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Human Immunology*, *65*(5). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.02.009>
- Goulidaki, N., Alarifi, S., Alkahtani, S. H., Al-Qahtani, A., Spandidos, D. A., Stournaras, C., & Sourvinos, G. (2015). RhoB is a component of the human cytomegalovirus assembly complex and is required for efficient viral production. *Cell Cycle*, *14*(17). <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1066535>
- Gugliesi, F., Coscia, A., Griffante, G., Galitska, G., Pasquero, S., Albano, C., & Biolatti, M. (2020). Where do we stand after decades of studying human cytomegalovirus? In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050685>

- Haga, R. B., & Ridley, A. J. (2016). Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. In *Small GTPases* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>
- Herbein, G. (2018). The human cytomegalovirus, from oncomodulation to oncogenesis. In *Viruses* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/v10080408>
- Idris, S., Lindsay, C., Kostiuik, M., Andrews, C., Côté, D. W. J., O'Connell, D. A., Harris, J., Seikaly, H., & Biron, V. L. (2016). Investigation of EZH2 pathways for novel epigenetic treatment strategies in oropharyngeal cancer. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/s40463-016-0168-9>
- Jackson, S. E., Sedikides, G. X., Mason, G. M., Okecha, G., & Wills, M. R. (2017). Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4+ T Cells Are Polyfunctional and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro. *Journal of Virology*, 91(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.02128-16>
- Jean Beltran, P. M., & Cristea, I. M. (2014). The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: Lessons from proteomics. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>
- Krenzlin, H., Behera, P., Lorenz, V., Passaro, C., Zdioruk, M., Nowicki, M. O., Grauwet, K., Zhang, H., Skubal, M., Ito, H., Zane, R., Gutknecht, M., Griessler, M. B., Ricklefs, F., Ding, L., Peled, S., Rooj, A., David James, C., Cobbs, C. S., ... Lawler, S. E. (2019). Cytomegalovirus promotes murine glioblastoma growth via pericyte recruitment and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4). <https://doi.org/10.1172/JCI123375>
- Krishna, B. A., Wills, M. R., & Sinclair, J. H. (2019). Advances in the treatment of cytomegalovirus. In *British Medical Bulletin* (Vol. 131, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz031>
- Kukhanova, M. K., Korovina, A. N., & Kochetkov, S. N. (2014). Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 79, Issue 13). <https://doi.org/10.1134/S0006297914130124>
- Laugesen, A., Højfeldt, J. W., & Helin, K. (2019). Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. In *Molecular Cell* (Vol. 74, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.011>
- Lawler, S. E. (2015). Cytomegalovirus and glioblastoma; controversies and opportunities. In *Journal of Neuro-Oncology* (Vol. 123, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1734-0>

- Ma, Y., Wang, N., Li, M., Gao, S., Wang, L., Zheng, B., Qi, Y., & Ruan, Q. (2012). Human CMV transcripts: An overview. In *Future Microbiology* (Vol. 7, Issue 5).
<https://doi.org/10.2217/fmb.12.32>
- McFaline-Figueroa, J. R., & Wen, P. Y. (2017). The Viral Connection to Glioblastoma. In *Current Infectious Disease Reports* (Vol. 19, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0563-z>
- Naublér, C. S., Geisler, J., & Vetvik, K. (2019). The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: A review of current evidence and potential therapeutic implications. *Oncotarget*, 10(42). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27016>
- Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 310, Issue 17).
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319>
- Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: A state of the science review. In *Neuro-Oncology* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>
- Poole, E., & Sinclair, J. (2020). Understanding hcmv latency using unbiased proteomic analyses. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/pathogens9070590>
- Rechenchoski, D. Z., Faccin-Galhardi, L. C., Linhares, R. E. C., & Nozawa, C. (2017). Herpesvirus: an underestimated virus. In *Folia Microbiologica* (Vol. 62, Issue 2).
<https://doi.org/10.1007/s12223-016-0482-7>
- Schleiss, M. R. (2008). Cytomegalovirus vaccine development. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 325). https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_20
- Seitz, R. (2010). Human Cytomegalovirus (HCMV)-Revised. In *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Vol. 37, Issue 6). <https://doi.org/10.1159/000322141>
- Sezgin, E., An, P., & Winkler, C. A. (2019). Host genetics of cytomegalovirus (CMV) pathogenesis. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 10, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00616>
- Sijmons, S., Van Ranst, M., & Maes, P. (2014). Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. In *Viruses* (Vol. 6, Issue 3).
<https://doi.org/10.3390/v6031049>

- Slobedman, B., Cao, J. Z., Avdic, S., Webster, B., McAllery, S., Cheung, A. K. L., Tan, J. C. G., & Abendroth, A. (2010). Human cytomegalovirus latent infection and associated viral gene expression. In *Future Microbiology* (Vol. 5, Issue 6). <https://doi.org/10.2217/fmb.10.58>
- Soroceanu, L., & Cobbs, C. S. (2011). Is HCMV a tumor promoter? *Virus Research*, *157*(2). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.026>
- Sourvinos, G., Morou, A., Sanidas, I., Codruta, I., Ezell, S. A., Doxaki, C., Kampranis, S. C., Kottakis, F., & Tsihli, P. N. (2014). The Downregulation of GFI1 by the EZH2-NDY1/KDM2B-JARID2 Axis and by Human Cytomegalovirus (HCMV) Associated Factors Allows the Activation of the HCMV Major IE Promoter and the Transition to Productive Infection. *PLoS Pathogens*, *10*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004136>
- Stazi, G., Zwergel, C., Mai, A., & Valente, S. (2017). EZH2 inhibitors: a patent review (2014-2016). In *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 27, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1316976>
- Stragliotto, G., Pantalone, M. R., Rahbar, A., & Söderberg-nauclér, C. (2020). Valganciclovir as add-on to standard therapy in secondary glioblastoma. *Microorganisms*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101471>
- Svrlanska, A., Reichel, A., Schilling, E.-M., Scherer, M., Stamminger, T., & Reuter, N. (2019). A Noncanonical Function of Polycomb Repressive Complexes Promotes Human Cytomegalovirus Lytic DNA Replication and Serves as a Novel Cellular Target for Antiviral Intervention. *Journal of Virology*, *93*(9). <https://doi.org/10.1128/jvi.02143-18>
- Tan, J. Z., Yan, Y., Wang, X. X., Jiang, Y., & Xu, H. E. (2014). EZH2: Biology, disease, and structure-based drug discovery. In *Acta Pharmacologica Sinica* (Vol. 35, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/aps.2013.161>
- Tseliou, M., Al-Qahtani, A., Alarifi, S., Alkahtani, S. H., Stournaras, C., & Sourvinos, G. (2016). The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *38*(1). <https://doi.org/10.1159/000438612>
- van den Broeke, C., & Favoreel, H. W. (2011). Actin' up: Herpesvirus interactions with Rho GTPase signaling. In *Viruses* (Vol. 3, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/v3040278>
- Vizán, P., Beringer, M., Ballaré, C., & Di Croce, L. (2015). Role of PRC2-associated factors in stem

cells and disease. *FEBS Journal*, 282(9). <https://doi.org/10.1111/febs.13083>

Voena, & Chiarle. (2019). RHO Family GTPases in the Biology of Lymphoma. *Cells*, 8(7).

<https://doi.org/10.3390/cells8070646>

Wang, J., Yuan, S., Zhu, D., Tang, H., Wang, N., Chen, W., Gao, Q., Li, Y., Wang, J., Liu, H., Zhang, X., Rao, Z., & Wang, X. (2018). Structure of the herpes simplex virus type 2 C-capsid with capsid-vertex-specific component. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06078-4>

Yan, K. S., Lin, C. Y., Liao, T. W., Peng, C. M., Lee, S. C., Liu, Y. J., Chan, W. P., & Chou, R. H. (2017).

EZH2 in cancer progression and potential application in cancer therapy: A friend or foe? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 6).

<https://doi.org/10.3390/ijms18061172>

Zacharopoulou, N., Tsapara, A., Kallergi, G., Schmid, E., Tsihchlis, P. N., Kampranis, S. C., &

Stournaras, C. (2018). The epigenetic factor KDM2B regulates cell adhesion, small rho GTPases, actin cytoskeleton and migration in prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.009>