



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Ογκολογία

....από την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ρόλος της RhoA GTPάσης και του επιγενετικού παράγοντα
EZH2 σε καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος μετά από
μόλυνση από τον Ανθρώπινο Κυτταρομεγαλοϊό (HCMV)**

Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας
Τμήμα Ιατρικής

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Σουρβίνος Γεώργιος, Καθηγητής Κλινικής
Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Σηφάκης Κωνσταντίνος (ΑΜ: 1140014)
Βιολόγος

Ηράκλειο, Ιούλιος 2021



UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
MEDICAL DEPARTMENT



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES IN
ONCOLOGY



MASTER THESIS

**The role of RhoA GTPase and EZH2 epigenetic factor in
Human Cytomegalovirus (HCMV) infected glioblastoma cells**

Laboratory of Clinical Virology
Medical Department

SUPERVISOR: Sourvinos George, Professor of Clinical Virology, Medical
Department, University of Crete

Sifakis Konstantinos (Stud. Code: 1140014)

Biologist

Heraklion, July 2021

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης που απονέμει το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε από τη κάτωθι τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σουρβίνος Γεώργιος (Επιβλέπων): Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ζουμπουρλής Βασίλειος: Διευθυντής Ερευνών, Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Αγγελάκη Σοφία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής – Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Ερπητοϊοί.....	10
1.2 Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV) 11	
1.2.1 Γενικές πληροφορίες	11
1.2.2 Δομή ιοσωματίου.....	12
1.2.3 Το γονιδίωμα του HCMV	13
1.2.4 Ο κύκλος ζωής του HCMV.....	14
1.2.4.1 Λυτικός κύκλος ζωής.....	15
1.2.4.2 Λανθάνουσα κατάσταση και επανενεργοποίηση	20
1.2.5 Αλληλεπίδραση του HCMV με το ξενιστή.....	22
1.2.6 Διασπορά του HCMV	22
1.2.7 Παθολογία του HCMV	22
1.2.8 Επιδημιολογία του HCMV.....	26
1.2.9 HCMV και εμβόλιο.....	27
1.2.10 Θεραπεία του HCMV	28
1.2.11 HCMV και καρκίνος	30
1.3 Γλοιοβλάστωμα.....	31
1.3.1 Γενικές πληροφορίες	31
1.3.2 Συσχέτιση του HCMV με το γλοιοβλάστωμα.....	34
1.4 Rho GTPάσες.....	37
1.4.1 Γενικές πληροφορίες	37
1.4.2 RhoA GTPάση.....	39
1.4.3 RhoA και καρκίνος.....	41
1.4.4 RhoA και γλοιοβλάστωμα	45
1.4.5 Η σύνδεση του HCMV με τη RhoA GTPάση	47

1.4.5.1 Ο ρόλος της RhoA σε μολυσμένους με HCMV ινοβλάστες.....	48
1.4.5.2 Ο ρόλος της RhoA σε μολυσμένα με HCMV κύτταρα γλοιοβλαστώματος.....	49
1.5 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)	51
1.5.1 Γενικές πληροφορίες	51
1.5.2 Οι βιολογικές λειτουργίες του EZH2.....	52
1.5.3 Ο ρόλος του EZH2 στον καρκίνο	53
1.5.4 Ο ρόλος του EZH2 στο γλοιοβλάστωμα.....	57
1.5.5 Η επίδραση του HCMV στον EZH2 σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος.....	59
1.5.6 Ο ρόλος του EZH2 στο λυτικό κύκλο ζωής του HCMV.....	60
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	63
2. Υλικά και μέθοδοι	64
2.1 Κύτταρα και ιός	64
2.1.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιιεργειών.....	64
2.2 Δημιουργία ιικού αποθέματος (stock).....	65
2.3 Τιτλοποίηση του ιού και μέθοδος ιικών μολύνσεων.....	65
2.4 Ανοσοφθορισμός	66
2.5 Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης μετα από ανοσο-αποτύπωση (Western blot)	67
2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	67
2.5.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων	67
2.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία-SDS (SDS-PAGE).....	68
2.5.4 Ανοσο-αποτύπωση (Western blot)	69
2.5.4 Ανοσο-ανίχνευση.....	69
2.5.5 Ποσοτικοποίηση, κανονικοποίηση και στατιστική ανάλυση	70
2.5.6 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσο-αποτύπωση	71
2.6 Παρατήρηση σχηματισμού συσσωματωμάτων.....	71
2.7 Υλικά.....	72

3. Αποτελέσματα	73
3.1 Διαπίστωση επιτυχούς μόλυνσης των U373MG κυττάρων.....	73
3.2 Η μόλυνση με HCMV μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση της RhoA GTPάσης και του EZH2 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG κυττάρων.....	74
3.3 Η μόλυνση με HCMV οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των U373MG κυττάρων	76
4. Συζήτηση.....	78
5. Βιβλιογραφία	82

Περίληψη

Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV) είναι ένας β-Ερπητοϊός δίκλωνου, γραμμικού DNA και αποτελεί σημαντικό παθογόνο με παγκόσμια γεωγραφική κατανομή και υψηλή κλινική σημασία, καθώς μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις σε άτομα με κατασταλμένο ή μη επαρκώς ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπλέον, ο HCMV μπορεί να ρυθμίσει, μέσω της ογκοτρόπου δράσης του, τον κακοήγη φαινότυπο ορισμένων τύπων όγκου, όπως του γλοιοβλαστώματος, που είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος του ανθρώπινου κεντρικού νευρικού συστήματος. Η RhoA GTPάση, η οποία ανήκει στην υποοικογένεια των Rho GTPασών, αποτελεί ρυθμιστή της ακτίνης του κυτταροσκελετού έχοντας καθοριστικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η πολικότητα, η προσκόλληση και η κίνηση των κυττάρων. Βέβαια, η λειτουργία της απορυθμίζεται σε πολλούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος, όπου εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διηθητική ικανότητα των κυττάρων. Εκτός αυτού, σημαντική είναι και η αλληλεπίδραση της με τον HCMV, με τον τελευταίο να επιδρά στη σηματοδότηση της, με σκοπό τη πρόοδο της ιικής μόλυνσης σε ινοβλάστες. Ο επιγενετικός παράγοντας EZH2, αποτελεί μία μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, που συμμετέχει σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως η καταστολή της κυτταρικής γήρανση και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όμως, συχνά υπερεκφράζεται σε ιστούς όγκων όπως του γλοιοβλαστώματος, έχοντας σημαντική ογκογόνο δράση σε αυτούς. Εκτός αυτού, έχει βρεθεί ότι η μόλυνση ινοβλαστών με HCMV οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του EZH2, τόσο σε αρχικό, όσο και σε ενδιάμεσο στάδιο της λυτικής πορείας μόλυνσης του HCMV σε αυτά τα κύτταρα, με αποτέλεσμα να ευνοείται η πρόοδος της μόλυνσης σε αυτά.

Δεδομένων των παραπάνω, στη παρούσα διπλωματική εργασία ερευνήθηκε η επίδραση που είχε η ενεργή μόλυνση με HCMV κυττάρων γλοιοβλαστώματος (U373MG), στη πρωτεϊνική έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2 και της RhoA GTPάσης. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση που είχε η μόλυνση στη μορφολογία των U373MG κυττάρων. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι η πρωτεϊνική έκφραση του EZH2 είναι αυξημένη σε όλα τα μελετώμενα χρονικά σημεία [6 hpi (ώρες μετά τη μόλυνση), 12 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi] κατά τη διάρκεια της μόλυνσης συγκριτικά με τα μη-μολυσμένα κύτταρα, ενώ η έκφραση της RhoA μεταβάλλεται δυναμικά κατά την χρονική εξέλιξη της μόλυνσης. Ενώ η έκφραση της είναι αυξημένη στα χρονικά σημεία των 12 hpi, 24 hpi, μειώνεται απότομα στο χρονικό σημείο των 48 hpi, διατηρώντας τα ίδια επίπεδα έκφρασης και στις 72 hpi.

Όσον αφορά την επίδραση του HCMV στη μορφολογία των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, διαπιστώθηκε ότι στο χρονικό σημείο των 48 hpi, τα U373MG δεν συντάσσονταν πλέον ως μονοστιβάδα κυττάρων, καθώς είχαν αρχίσει να συσσωματώνονται σε “σφαίρες”, χάνοντας παράλληλα την ικανότητα προσκόλλησης τους στον πυθμένα της φλάσκας καλλιέργειας. Ο συγκεκριμένος φαινότυπος διατηρούνταν και στο χρονικό σημείο των 72 hpi, με τα σχηματιζόμενα συσσωματώματα να είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος, έχοντας αυξημένη τάση αποκόλλησης από τον πυθμένα της φλάσκας.

Λαμβάνοντας υπόψη την ιδιότητα των glioblastoma stem-cells (GSCs) να σχηματίζουν “σφαίρες”, καθώς και το γεγονός ότι ο HCMV έχειδειχθεί ότι ευνοεί την ανάπτυξη και τη διατήρηση του GSC φαινοτύπου, η “επιλογή” των U373MG κυττάρων να σχηματίζουν σφαίρες μετά από μόλυνση με τον HCMV ίσως αποτελεί ακόμα μία ένδειξη της ικανότητας του εν λόγω ιού να επάγει αυτό το φαινότυπο, ευνοώντας με αυτό το τρόπο την εξέλιξη της νόσου του γλοιοβλαστώματος. Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση, ώστε να υπάρξουν περισσότερα δεδομένα που να υποστηρίζουν πιο ξεκάθαρα την απόκτηση ιδιοτήτων GSC από τα U373MG κύτταρα μετά από μόλυνση με τον HCMV.

Το γεγονός ότι η έκφραση του EZH2 και της RhoA μεταβάλλονται κατά τη χρονική εξέλιξη της μόλυνσης των U373MG, αποτελεί μία ένδειξη της ενδεχόμενης εμπλοκής των συγκεκριμένων παραγόντων στο κύκλο ζωής του HCMV στο γλοιοβλάστωμα. Η αύξηση της έκφρασης του EZH2, που προκαλείται μετά από μόλυνση από τον HCMV, συνάδει με τα ευρήματα στη περίπτωση των ινοβλαστών, οπότε ενδέχεται ο EZH2 να έχει αντίστοιχη δράση και στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Αναφορικά με τη RhoA, η απότομη μείωση της έκφρασης της από το χρονικό σημείο των 24 hpi σε αυτό των 48 hpi, ίσως να συνδέεται με την ιδιότητα των U373MG να συσσωματώνονται σε σφαίρες στο αντίστοιχο χρονικό σημείο, καθώς η απόκτηση της συγκεκριμένης μορφολογίας προϋποθέτει την αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού, που αποτελεί μία από τις κύριες λειτουργίες της RhoA. Τα συγκεκριμένα ευρήματα αποτελούν πρωταρχικές ενδείξεις για την περαιτέρω ερευνητική προσπάθεια που πρέπει να πραγματοποιηθεί, ώστε να διαλευκανθεί ο ακριβής ρόλος του EZH2 και της RhoA στον κύκλο ζωής του HCMV σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος, καθώς και ο πιθανός τρόπος εμπλοκής τους στην ιδιότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος να σχηματίζουν “σφαίρες”, και γενικότερα να αποκτούν GSC φαινότυπο κατά τη μόλυνση με HCMV. Τέλος, η απόκτηση περισσότερων δεδομένων που συνδέουν τον HCMV με το να ευνοεί την εξέλιξη της νόσου του γλοιοβλαστώματος, όπως η σύνδεση του με τον GSC φαινότυπο, θα δώσει

περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με τη θεραπευτική στόχευση των HCMV (+) γλοιοβλαστωμάτων, είτε μέσω χρήσης αντι-ϊικής θεραπείας, είτε μέσω στόχευσης κυτταρικών παραγόντων που επηρεάζονται από τον εν λόγω ιό, όπως οι μελετώμενοι στη συγκεκριμένη εργασία, EZH2 και RhoA.

Λέξεις κλειδιά: Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV), κύτταρα γλοιοβλαστώματος, ογκοτρόπος ρόλος, EZH2, RhoA GTPάση

Abstract

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a beta-herpes virus, and possesses a linear, double-stranded DNA genome. It is a pathogen with worldwide distribution and high clinical importance, causing severe implications in individuals with suppressed or underdeveloped immune systems. Also, HCMV can favor, through its oncomodulatory role, the progression of malignancy in many types of tumors, including glioblastoma, which is the most common malignant central nervous system (CNS) type of tumor. RhoA GTPase, which belongs to the family of Rho GTPases, is a regulator of the actin cytoskeleton, playing crucial role in processes like cell polarization, cell-cell adhesion and cell migration. Dysregulation of RhoA function has been found in a variety of cancers, including glioblastoma, in which RhoA is involved in cellular processes, such as cell proliferation and invasion. Besides, it has been shown that HCMV interacts with RhoA signaling pathways, favoring the progression of its infection in fibroblasts. The epigenetic factor, EZH2, is a histone methyltransferase, and it has been indicated to be involved in some important cellular processes, such as inhibition of cellular senescence and regulation of cell cycle. Except of its normal functions, EZH2 can play a crucial role in cancer progression, as it has been found that is generally up-regulated in many types of tumors, such as glioblastoma, having oncogenic role in them. Furthermore, it has been revealed that productive infection of fibroblasts with HCMV leads to increased EZH2 protein expression both in initial and intermediate stages of the viral life cycle, thus promoting the progression of viral infection.

Given the above, in the present thesis, it was studied the effect of HCMV productive infection of U373MG glioblastoma (GBM) cells on the protein expression of RhoA and EZH2. The effect of viral infection on U373MG morphology was, also, examined. It was therefore found that, the protein expression of EZH2 is increased at all studied time points [6 hpi (hours post infection), 12 hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi] during infection, compared to non-infected cells. RhoA expression levels change dynamically during temporal progression of HCMV infection. While its expression is elevated at 12 and 24 hpi, it significantly decreases at the subsequent time point of 48 hpi, maintaining its expression at the same level at 72 hpi. Regarding the effect of HCMV infection on GBM cells morphology, it was revealed that U373MG had stopped growing as monolayer culture at 48 hpi, since cellular "spheres" had started to form at the same time point, losing concurrently their ability to adhere to the flask surface. This phenotype was maintained and at 72 hpi, with formed spheres being

larger in size and having an increased tendency to detach from the surface of the flask.

Taking into consideration the property of glioblastoma stem-cells (GSCs) to form spheres, and the fact that HCMV may drives development or maintenance of GSC phenotype, the “choice” of U373MG to form spheres upon HCMV infection is maybe one more indication of the ability of HCMV to induce this phenotype, thereby favoring malignant progression of glioblastoma. Surely, a more thorough investigation is needed, in order to detect more data, which would support more clearly the acquisition of GSC properties by U373MG upon HCMV infection.

The fact that expression levels of EZH2 and RhoA altered during the course of infection of U373MG, indicates a possible involvement of these factors in the HCMV life cycle in glioblastoma. The increase in EZH2 expression, caused after infection of U373MG with HCMV, is consistent with the findings in the case of fibroblasts, thus EZH2 may has similar role in glioblastoma cells. The significant reduction in RhoA expression from 24 hpi to 48hpi may be linked with the property of U373MG to form spheres at the same time point, since the acquisition of this morphology presupposes the remodeling of actin cytoskeleton, which is one of the main functions of RhoA. The aforementioned observations are preliminary data, which can be useful for future research efforts, in order to clarify, first of all, the exact role of EZH2 and RhoA in HCMV life cycle in glioblastoma cells, and secondly, the probable manner of their involvement in the property of glioblastoma cells to form spheres, and generally to acquire GSC phenotype upon HCMV infection. Finally, the finding of more data, which connect HCMV infection with the malignant progression of glioblastoma, such as HCMV association with GSC phenotype, could offer more information in regard with therapeutic targeting of HCMV (+) glioblastoma tumors either using anti-viral therapy or targeting cellular factors which interact with this virus, such as RhoA and EZH2.

KEYWORDS: Human Cytomegalovirus (HCMV), glioblastoma cells, oncomodulatory role, EZH2, RhoA GTPase

1. Εισαγωγή

1.1 Ερπητοϊοί

Οι Ερπητοϊοί (Herpes viruses or herpesviruses) είναι δίκλωνοι-DNA ιοί με εικοσαεδρική συμμετρία, έχοντας ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, ως επί το πλείστον σπονδυλωτών (θηλαστικά, ερπετά, πτηνά, ψάρια), αλλά και ορισμένων ασπόνδυλων μορφών ζωής. Ειδικότερα, υπάρχουν συνολικά εννέα Ερπητοϊοί που προσβάλουν το ανθρώπινο είδος, όπως οι ιοί του απλού έρπητα τύπου 1 και 2 (HSV-1, -2, Herpes Simplex Virus type-1, type-2), ο ιός Epstein-Barr (EBV ή HHV-4) και ο σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi ερπητοϊός (KSHV, Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ή HHV-8), καθώς και ο ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV ή HHV-5). Η μόλυνση από αυτή τη κατηγορία ιών μπορεί να μην έχει καμία παθολογική συνέπεια στον ξενιστή, αλλά ενδέχεται και να οδηγήσει σε σοβαρές επιπτώσεις, που μπορεί να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο, συμπεριλαμβάνοντας και τις κακοήθεις νεοπλασίες. Επιπλέον, χαρακτηριστικό γνώρισμα των Ερπητοϊών είναι η παραμονή τους σε λανθάνουσα μορφή στα κύτταρα του ξενιστή, μετά το πέρας της πρωταρχικής (λυτικής) μόλυνσης. Η περίοδος παραμονής στη λανθάνουσα μορφή διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ιού, αλλά και την ευαισθησία των κυττάρων-ξενιστών. Όμως, έχουν την ικανότητα να επανενεργοποιηθούν, κυρίως σε περιπτώσεις αποδυνάμωσης του ανοσοποιητικού συστήματος (**A J Davison 2014; Riddell, Jeffery-Smith, and Tong 2017**).

Οι ανθρώπινοι Ερπητοϊοί, και γενικότερα εκείνοι των θηλαστικών, των πτηνών και των ερπετών, ανήκουν στην οικογένεια *Herpesviridae*. Η οικογένεια χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες: *Alphaherpesvirinae* (περιέχει πέντε γένη: *Iltovirus*, *Mardivirus*, *Scutavirus*, *Simplexvirus*, και *Varicellovirus*), *Betaherpesvirinae* (περιέχει τέσσερα γένη: *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus*, *Proboscivirus*, και *Roseolovirus*) και *Gammapherpesvirinae* (περιέχει τέσσερα γένη: *Lymphocryptovirus*, *Macavirus*, *Percavirus*, και *Rhadinovirus*). Το πρωταρχικό κριτήριο για να ταξινομηθεί ένας ιός στην οικογένεια *Herpesviridae* είναι η συγκεκριμένη μορφολογία του ισωματίου του, το οποίο είναι σφαιρικό και αποτελείται από 4 κύρια συστατικά: τον πυρήνα (core), το καψίδιο (capsid), το υμένιο (tegument) και τον επενδυτή (envelope). Η διάμετρος του ισωματίου είναι συνήθως περίπου 200 nm και ο πυρήνας αποτελείται από ένα αντίγραφο γραμμικού, δίκλωνου μορίου DNA, το οποίο είναι πακεταρισμένο στο καψίδιο. Το καψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας, διαμέτρου 125-130 nm. Το ιικό υμένιο (tegument), το οποίο περιβάλλει το καψίδιο, περιέχει τουλάχιστον 30 ιικές πρωτεΐνες, δεν είναι καλά καθορισμένο δομικά, εμφανίζοντας συμμετρία σε σχέση με

το καψίδιο μόνο από τις δομές που βρίσκονται πλησίον του καψιδίου. Ο λιπιδικός επενδυτής περιβάλλει το εξωτερικό του υμενίου και περιέχει τουλάχιστον 10 ιικές μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, καθώς και κάποιες κυτταρικές. Η σύσταση τόσο του υμενίου όσο και του επενδυτή ποικίλουν ευρέως ανάμεσα στην οικογένεια (**Andrew J. Davison 2007**).

Οι τρεις υποοικογένειες μπορούν να διαχωριστούν με βάση ορισμένα βιολογικά κριτήρια, όπως το εύρος ξενιστών σε κυτταρική καλλιέργεια, τη διάρκεια του κύκλου ζωής, την κυτταρική παθολογία, και τα χαρακτηριστικά της λανθάνουσας μόλυνσης που προκαλούν. Όσον αφορά τους Alpha-herpesviruses (π.χ. HSV-1/2) έχουν ένα μεταβλητό εύρος ξενιστών *in vitro*, έχουν μικρό κύκλο ζωής, εξαπλώνονται γρήγορα καταστρέφοντας αποτελεσματικά τα μολυσμένα κύτταρα, και πραγματοποιούν λανθάνουσες μολύνσεις κυρίως στα αισθητήρια γάγγλια και γενικότερα στους νευρώνες. Οι Beta-herpesviruses (π.χ. HCMV) έχουν στενό εύρος ξενιστών, μεγάλο κύκλο ζωής, με αργή διάδοση, προκαλώντας κυτταρική διόγκωση. Βρίσκονται γενικά σε λανθάνουσα μορφή σε μονοκύτταρα. Οι Gamma-herpesviruses (π.χ. EBV, KSHV) σχετίζονται με λεμφοϋπερπλαστικές ασθένειες και βρίσκονται σε λανθάνουσα μορφή στο λεμφαδενοειδή ιστό. Μολύνουν Β ή Τ λεμφοκύτταρα *in vitro*, στα οποία όμως η μόλυνση διακόπτεται, χωρίς να παράγονται νέα μολυσματικά ισωμάτια. Όμως, έχουν τη δυνατότητα επαγωγής λυτικής μόλυνσης σε κυτταρικές σειρές επιθηλιακών κυττάρων και ινοβλαστών (**A J Davison 2014**).

Οι Ερπητοϊοί είναι ιδιαίτερα προσαρμοσμένοι στους ξενιστές τους, προκαλώντας σοβαρά συμπτώματα συνήθως στα πολύ νέα ή στα ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Αυτή η προσαρμογή του κάθε Ερπητοϊού σε ένα μεμονωμένο είδος ξενιστή, αποδεικνύει την παράλληλη προσαρμογή και εξέλιξη αυτών στο πέρασμα του χρόνου. Τέλος, οι ομοιότητες που εμφανίζονται μεταξύ των διάφορων Ερπητοϊών, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι έχουν προκύψει από έναν κοινό πρόγονο (**A J Davison 2014**).

1.2 Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus, HCMV)

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

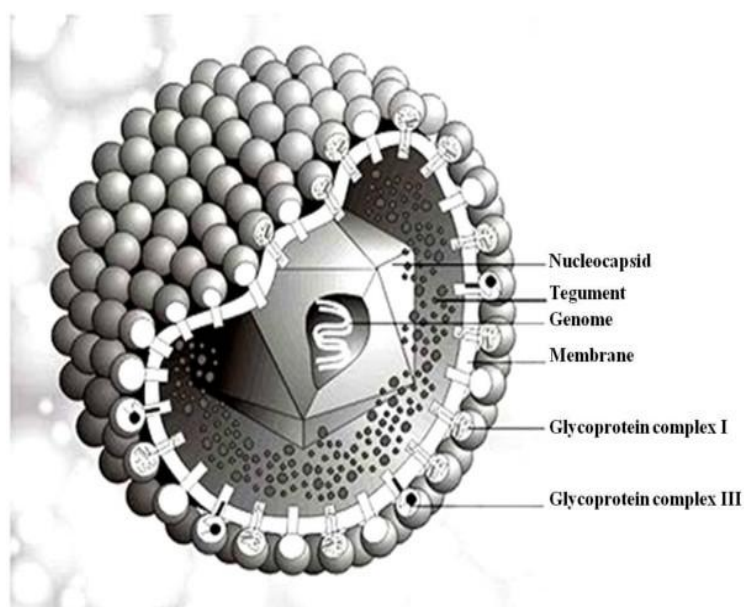
Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV), συχνά αναφερόμενος ως Human Herpes Virus 5 (HHV-5), ανήκει στην οικογένεια *Herpesviridae*, υποοικογένεια *Betaherpesvirinae*, γένος *Cytomegalovirus*. Αποτελεί έναν από τους ευρέως διαδεδομένους ιούς με παγκόσμια κατανομή. Ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί την πιο σημαντική λοιμογόνο αιτία συγγενούς ασθένειας, ένα σημαντικό “οπορτουνιστικό”

παθογόνο όσον αφορά τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα, καθώς και την αιτία για την σποραδική εμφάνιση εμπύρετης νόσου, καθώς και λοιμώδους μονοπυρήνωσης στο γενικό πληθυσμό. Ο HCMV μεταδίδεται αποτελεσματικά σε όλο το πληθυσμό μέσω της άμεσης επαφής με σωματικές εκκρίσεις, και όπως και άλλοι ανθρωπίνοι Ερπητοϊοί δεν εξαφανίζεται ποτέ πλήρως μετά την πρωτογενή λοίμωξη, καθώς παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ξενιστή, υφιστάμενος βέβαια σε σποραδικά χρονικά διαστήματα επανενεργοποίηση, πράγμα το οποίο διευκολύνει τη μετάδοση του. Η ευαισθησία στη νόσηση από τον εν λόγω ιό σχετίζεται με την αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος, σχετιζόμενη ειδικότερα με μη σωστή λειτουργία των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η ενδομητριακή μετάδοση στο έμβρυο μπορεί να οδηγήσει σε αισθητηριακή βλάβη. Σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, όπως εκείνα, που έχουν κάνει μεταμόσχευση συμπαγούς οργάνου ή αιμοποιητικών κυττάρων, που έχουν δεχθεί ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, καθώς και σε εκείνα με κληρονομική ή επίκτητη ανοσοανεπάρκεια, παραμένει κλινικά σημαντική η λοίμωξη από τον HCMV, παρόλο που υπάρχουν διαθέσιμες αντι-ϊικές θεραπείες που μειώνουν το ολικό φορτίο της νόσου (**Mocarski et al. 2013**). Εκτός από τις παραπάνω περιπτώσεις, ο HCMV παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόοδο του καρκίνου, μέσω της ογκοτρόπου δράσης του, αν και υπάρχουν ενδείξεις με βάση τις οποίες θα μπορούσε να καταταγεί ακόμα και στους ογκογόνους ιούς (**Herbein 2018**). Χρειάζονται, λοιπόν, πιο αποτελεσματικά και ασφαλέστερα αντι-ϊικά φάρμακα.

1.2.2 Δομή ιοσωματίου

Το ιοσωμάτιο του HCMV έχει τη χαρακτηριστική δομή των ιοσωματίων που διέπουν όλους τους Ερπητοϊούς, όπως περιγράφηκε παραπάνω, έχοντας διάμετρο 230nm. Πιο συγκεκριμένα, στο εσωτερικό του νουκλεοκαψιδίου βρίσκεται το γραμμικό δίκλωνο DNA, μαζί με δύο ιικά RNAs. Το εικοσαεδρικής συμμετρίας καψίδιο, με διάμετρο 130 nm, συναρμολογείται από τέσσερις βασικές στους Ερπητοϊούς πρωτεΐνες, την κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου (MCP, major capsid protein), τις υπομονάδες “triplex” 1 και 2 (TRI1, TRI2), καθώς και τη μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη (SCP). Το καψίδιο αποτελείται από 162 καψομερή, δηλαδή 150 εξαμερή (κάθε ένα αποτελείται από έξι μόρια της MCP), συνθέτοντας τις τριγωνικές όψεις του καψιδίου, αλλά και 12 πενταμερή. Κάθε ένα από τα 11 πενταμερή αποτελείται από πέντε μόρια της MCP, ενώ ένα πενταμερές αποτελείται από την PORT (portal) πρωτεΐνη. Οι triplexes υπομονάδες βρίσκονται μεταξύ των καψομερών. Το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλεται από το υμένιο (tegument), το οποίο αποτελείται από τουλάχιστον 32 ιικές πρωτεΐνες, πολλές εκ των οποίων είναι φωσφορυλιωμένες.

Επίσης πολλές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες καθώς και RNAs εγκλείονται στο ώριμο ισωμάτιο του HCMV. Οι tegument πρωτεΐνες έχουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της μόλυνσης καθώς και στα τελικά στάδια της συναρμολόγησης του ισωματίου. Τέλος, στο διπλό λιπιδικό φάκελο (envelope), που περικλείει το υμένιο, ενσωματώνονται 23 ιικές γλυκοπρωτεΐνες. Μερικές από αυτές συμμετέχουν στην επαφή και την είσοδο του ιού, αλλά οι περισσότερες είναι πιο πιθανό να εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόκρισης του κυττάρου ξενιστή στη μόλυνση. Ειδικότερα, οι πέντε γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου, gB, gM:gN, gH:gL, που απαρτίζουν τα τρία κύρια συντηρημένα γλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα gC1, gCII, gCIII, αντίστοιχα, είναι σημαντικές για τον ιικό πολλαπλασιασμό και στόχοι εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Οι gB, gH:gL είναι σημαντικές για την πρόσδεση και την είσοδο του ιού, ενώ οι gM:gN για τη διαδικασία της ωρίμανσης του ισωματίου (Mocarski et al. 2013). Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται σε τρισδιάστατη μορφή η δομή του ισωματίου του HCMV.



Εικόνα 1. Δομή τού ισωματίου του HCMV (Βρέθηκε από (Tomtishen III 2012))

Εκτός από τα μολυσματικά ισωμάτια που παράγονται από τα κύτταρα του ξενιστή κατά τον πολλαπλασιασμό του HCMV, παράγονται και μη-μολυσματικά σωματίδια, όπως τα “Dense bodies” (DB) και τα “Noninfectious enveloped particles” (NIEP), τα οποία, ενώ έχουν λιπιδικό φάκελο, δεν περιέχουν νουκλεοκαψίδιο (DB) ή γενετικό υλικό (NIEP) εσωτερικά του νουκλεοκαψιδίου (Mocarski et al. 2013).

1.2.3 Το γονιδίωμα του HCMV

Το γονιδίωμα του HCMV έχει μήκος περίπου 235 kbp, οργανωμένο σε δομή τάξης E, καθώς αποτελείται από μία μακριά μοναδική (unique large, U_L) και μία κοντή μοναδική (unique short, U_S) περιοχή, των οποίων ο μεταξύ τους προσανατολισμός

μπορεί να αναστραφεί, οδηγώντας σε τέσσερα πιθανά ισομερή. Κάθε μία από τις παραπάνω περιοχές πλαισιώνεται από τμήματα με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τόσο στα άκρα του γονιδιώματος (TR_L , TR_S), όσο και εσωτερικά στο σημείο συνένωσης τους (IR_L , IR_S). Συνεπώς, η διάταξη του γονιδιώματος να είναι η εξής: $TR_L-U_L-IR_L-IR_S-U_L-TR_S$. Η περιοχή TR_L εμπεριέχει τις αλληλουχίες a_n και b , η IR_L-IR_S τις $b'a_n'c'$, και η TR_S τις c και a_n , όπου οι αλληλουχίες με (') υποδηλώνουν αντίθετο προσανατολισμό σε σχέση με αυτές που δεν έχουν. Τα ισομερή του συγκεκριμένου γονιδιώματος επέρχονται μετά από ανασυνδιασμό των τερματικών αλληλουχιών a_n με την εσωτερική αλληλουχία a_n' (**Murphy and Shenk 2008**).

Έχει αναδειχθεί ότι το γονιδίωμα του HCMV έχει 751 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) (**Stern-Ginossar et al. 2012**), με τουλάχιστον 167 γονίδια να κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες, τέσσερα να αφορούν μακριά μη-κωδικοποιούμενα RNAs, δύο oriLyt RNAs, και τουλάχιστον 23 miRNAs. Το γονιδίωμα περιέχει cis-δρώντα στοιχεία (cis acting signals) σημαντικά για τη σύνθεση του DNA (oriLyt), το τεμαχισμό (cleavage) και το πακετάρισμα (packaging) του γονιδιώματος (rac1 και rac2 εσωτερικά των τερματικών α αλληλουχιών), καθώς και για τη μεταγραφική έκφραση. Όσον αφορά την τελευταία, χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι ο MIEP (Major-Immediate-Early-Promoter) ενισχυτής στην U_L περιοχή, αλλά και US3 υποκινητής-ενισχυτής στη U_S περιοχή (**Mocarski et al. 2013**).

Αν και τα διαφορετικά στελέχη του HCMV εμφανίζουν ομολογία αλληλουχίας μεγαλύτερη του 95%, υπάρχουν συγκεκριμένες περιοχές με υψηλή διακύμανση, όπως τα γονίδια που εκφράζουν τις γλυκοπρωτεΐνες UL73, UL74, UL144, UL146, καθώς και η τερματική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία a . Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια ανακαλλιέργειας ινοβλαστών, κάποια στελέχη όπως το "AD169" και το "Towne", αποκτούν σημειακές μεταλλάξεις, ελλείψεις και διπλασιασμούς, έτσι ώστε τα συνήθη εργαστηριακά στελέχη να έχουν έλλειψη έως και 20 γονιδίων, πράγμα το οποίο δεν οδηγεί, βέβαια, σε ελαττωμένο μήκος γονιδιώματος, λόγω του διπλασιασμού που υπόκεινται μία άλλη περιοχή του (**Mocarski et al. 2013**).

1.2.4 Ο κύκλος ζωής του HCMV

Ο κύκλος ζωής του HCMV μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις διαφορετικές φάσεις, τη λυτική φάση μόλυνσης, τη λανθάνουσα φάση μόλυνσης και την επανενεργοποίηση. Η πρωτογενής μόλυνση με HCMV οδηγεί σε λυτικό κύκλο, κατά τον οποίο υπάρχει εκτενής έκφραση ιικών γονιδίων και παραγωγή νέων ιοσωματίων (παραγωγική μόλυνση). Όσον αφορά τη λανθάνουσα φάση μόλυνσης, το ιικό γονιδίωμα παραμένει

στο κύτταρο-ξενιστή χωρίς όμως να υπάρχει παραγωγή νέων ιοσωματίων, καθώς υπάρχει μεταγραφική καταστολή απαραίτητων για τον ιικό πολλαπλασιασμό γονιδίων, χωρίς βέβαια να παρατηρείται πλήρης σίγηση, αφού εκφράζονται ορισμένα σχετιζόμενα με τη λανθάνουσα φάση γονίδια. Βέβαια, ο HCMV δύναται να επανενεργοποιηθεί, σε συγκεκριμένες συνθήκες, από τη λανθάνουσα φάση, οδηγώντας σε λυτική μόλυνση (παραγωγή νέων ιοσωματίων) (**Adler, Sattler, and Adler 2017; Gugliesi et al. 2020**).

Η λυτική μόλυνση ή η παραμονή στη λανθάνουσα φάση εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν τα κύτταρα-ξενιστή. Αν και η μόλυνση με HCMV περιορίζεται στον άνθρωπο σε επίπεδο ξενιστή, ο εν λόγω ιός μπορεί να εξαπλωθεί σχεδόν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, λόγω του ευρέως φάσματος κυτταρικών τύπων, που μπορεί να μολύνει. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι ο HCMV ακολουθεί λυτικό κύκλο ζωής στους ινοβλάστες, στα επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά, στρωματικά, αλλά και στα νευρικά κύτταρα in vivo. Ειδικότερα οι ινοβλάστες (δέρματος ή πνεύμονα) αποτελούν το χαρακτηριστικότερο μοντέλο μελέτης της παραγωγικής μόλυνσης, καθώς σε αυτούς παράγεται υψηλός τίτλος ιού in vitro. Επίσης, περιορισμένος ιικός πολλαπλασιασμός μπορεί να επιτευχθεί σε μια σειρά αθανατοποιημένων κυτταρικών σειρών, όπως γλοιοβλαστώματος, με τη κυτταρική σειρά U373MG να υποστηρίζει την παραγωγή νέων ιοσωματίων μετά από μόλυνση με HCMV, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τους ινοβλάστες (**Sinzger, Digel, and Jahn 2008; Reeves and Sinclair 2008; Landolfo et al. 2003**). Αναφορικά με τη λανθάνουσα φάση, παρατηρείται σε κύτταρα της μυελοειδούς σειράς in vivo, τόσο στα πρόδρομα αυτών αιμοποιητικά κύτταρα (CD34+), καθώς και στα παράγωγα (CD14+) μονοκύτταρα. Βέβαια, όταν τα κύτταρα της συγκεκριμένης σειράς φτάσουν στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης τους είτε σε μακροφάγα, είτε σε δενδριτικά κύτταρα, τότε παρατηρείται επανενεργοποίηση του HCMV, παράγοντας νέα ιοσωμάτια (**Poole and Sinclair 2020**).

1.2.4.1 Λυτικός κύκλος ζωής

Ο λυτικός κύκλος ζωής (Εικόνα 2) του HCMV μπορεί να διαχωριστεί σε πέντε επιμέρους στάδια, τα οποία είναι η είσοδος στο κύτταρο ξενιστή, η μετανάστευση στον πυρήνα, η αντιγραφή-γονιδιακή έκφραση, η ωρίμανση και τελικώς η έξοδος.

Είσοδος

Η είσοδος του HCMV στα κύτταρα-ξενιστές μπορεί να επιτευχθεί, τόσο μέσω σύντηξης με την κυτταρική μεμβράνη (ινοβλάστες) του κυττάρου, όσο και μέσω ενδοκύτωσης (ενδοθηλιακά/επιθηλιακά κύτταρα). Η σύντηξη του ιοσωματίου με την

κυτταρική μεμβράνη επιτελείται, στους ινοβλάστες, μέσω του τριμερούς συμπλόκου gH/gL/gO, το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α), οδηγώντας σε μία ανεξάρτητη από το pH κυτταρική σύντηξη (pH-independent membrane-fusion). Αντίθετα, στα επιθηλιακά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η είσοδος του ιού επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης του πενταμερούς συμπλόκου gH/gL/UL128/UL130/UL131 με τον παράγοντα Nrp2 (neuropilin-2), οδηγώντας σε ενδοκύτωση εξαρτώμενη από χαμηλό pH (low pH-dependent endocytosis). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι οι γλυκοπρωτεΐνες του ιικού επενδυτή gM/gN (διμερές) και gB (τριμερές) εμπλέκονται στη διαδικασία εισόδου του ιού, καθώς αλληλεπιδρούν με τις πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης της κυτταρικής επιφάνειας, με τη gB να μεσολαβεί για τη μεμβρανική σύντηξη (**Mocarski et al. 2013; Ye et al. 2020**).

Μετανάστευση στον πυρήνα

Μόλις το νουκλεοκαψίδιο του ιού εισαχθεί στο κυτταρόπλασμα μεταναστεύει προς τον πυρήνα μέσω μικροσωληνίσκων. Παράλληλα με την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα, απελευθερώνονται και οι tegument πρωτεΐνες, από τις οποίες, ορισμένες παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, ενώ άλλες προσδένονται στο καψίδιο (pUL47/pUL48 dimer) διαμεσολαβώντας τη μεταφορά του στον πυρήνα. Ακόμα, οι tegument πρωτεΐνες pp65 (pUL83) και pp71 (pUL82) μεταφέρονται ανεξάρτητα του καψιδίου στο εσωτερικό του πυρήνα, με την πρώτη να έχει σημαντικό ρόλο στην ανοσο-διαφυγή (Immune-evasion) και τη δεύτερη να εμπλέκεται κυρίως στη γονιδιακή έκφραση. Τέλος, αφού το καψίδιο αποσυνδεθεί από τους μικροσωληνίσκους, προσδένεται στον πυρηνικό πόρο, από όπου απελευθερώνεται το γονιδίωμα του ιού στον εσωτερικό του πυρήνα. Αξίζει να αναφερθεί ότι εντός του πυρήνα πραγματοποιούνται οι διαδικασίες της μεταγραφής των ιικών γονιδίων, της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, καθώς και τα πρωταρχικά στάδια ωρίμανσης του καψιδίου (**Mocarski et al. 2013; Ye et al. 2020**).

Γονιδιακή έκφραση και αντιγραφή

Μετά την είσοδο του γονιδιώματος στον πυρήνα, ξεκινάει αμέσως η έκφραση των άμεσα-πρώιμων (immediate-early, IE) γονιδίων του HCMV, ακολουθούμενη διαδοχικά από την έκφραση των καθυστερημένα-πρώιμων (delayed-early, DE) και των όψιμων (late, L) γονιδίων. Η διαδοχική αυτή έκφρασή πραγματοποιείται με ένα αυστηρά καθορισμένο τρόπο, εφόσον η έκφραση των DE γονιδίων εξαρτάται από τα πρωτεϊνικά προϊόντα των IE γονιδίων, ενώ η έκφραση των L γονιδίων από τα πρωτεϊνικά προϊόντα των DE.

Πριν τη μεταγραφική έκφραση των ΙΕ γονιδίων, και ενώ το γονιδίωμα βρίσκεται δίπλα από τα PML-nuclear bodies (NB), η πρωτεΐνη pp71 συνδεδεμένη με τον παράγοντα Daxx (death domain associated protein), οδηγεί στην αποσύνθεση του, με αποτέλεσμα να αποτρέπει τη μεταγραφική σίγηση, που αυτός επιτελεί μέσω των HDACs (histone deacetylases), στον MIEP, με τον τελευταίο να αποτελεί τον υποκινητή των δύο σημαντικότερων ΙΕ γονιδίων (IE1/IE2), τα οποία κωδικοποιούν τις πυρηνικές φωσφοπρωτεΐνες IE1-p72 και IE2-p86. Αν και η τελευταία αποτελεί σημαντικότερο ιικό μεταγραφικό παράγοντα και κατά συνέπεια πρωτεΐνη κλειδί για την ιική γονιδιακή έκφραση, η IE1-p72 και η IE2-p86 μαζί, αποτρέπουν την επιγενετική σίγηση, ενεργοποιούν τα DE και L γονίδια κατά τον ιικό πολλαπλασιασμό, αυτορυθμίζουν την έκφραση των ΙΕ γονιδίων, και καθορίζουν τις πυρηνικές περιοχές, όπου πραγματοποιείται η αντιγραφή του ιικού DNA.

Αναφορικά με τη δεύτερη χρονικά εκφραζόμενη ομάδα γονιδίων, τα επονομαζόμενα DE γονίδια, γίνονται μεταγραφικά ενεργά αφού έχουν εκφραστεί οι ΙΕ πρωτεΐνες, που αποτελούν και μεταγραφικούς παράγοντες αυτών. Τα εν λόγω γονίδια είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, καθώς και για χρονικά μεταγενέστερες λειτουργίες κατά την ιική μόλυνση, όπως την ωρίμανση και την έξοδο των ιοσωματίων από το κύτταρο ξενιστή. Επιπροσθέτως, ορισμένα από αυτά τα γονίδια, που δεν είναι απαραίτητα για τον ιικό πολλαπλασιασμό, ίσως εμπλέκονται στην τροποποίηση της απάντησης του κυττάρου στην μόλυνση.

Το ιικό γονιδίωμα, το οποίο παραμένει κυκλοποιημένο μετά την εισαγωγή του στον πυρήνα και πέριξ των PML-NB, αρχίζει να αντιγράφεται, με σημείο έναρξης να αποτελεί η γονιδιωματική περιοχή oriLyt. Αρχικά, απαιτείται η πρόσδεση του συμπλόκου ppUL84:IE2-p86 στον υποκινητή του oriLyt, με σκοπό την ενεργοποίηση του. Η ppUL84 σε σύμπλοκο με τις UL112-113 πρωτεΐνες, οδηγεί στη στρατολόγηση της ppUL44 (PPS, polymerase processivity subunit), μέσω της οποίας στρατολογούνται στη συνέχεια οι έξι πρωτεΐνες του αντιγραφοσώματος (replisome). Το αντιγραφόσωμα, λοιπόν, αποτελείται από έξι συντηρημένες στους Ερπητοϊούς πρωτεΐνες, την DNA πολυμεράση (UL54 γονίδιο), τον συμπαράγοντα της PPS (UL44 γονίδιο), την πρωτεΐνη πρόσδεσης μονόκλωνου DNA SSB (UL57 γονίδιο), και τις HP1 (UL105 γονίδιο), HP2 (UL70 γονίδιο), HP3 (UL102 γονίδιο), που αποτελούν το ετεροτριμερές σύμπλοκο ελικάσης-πριμάσης (helicase-primase). Επιπροσθέτως, ορισμένες ιικές πρωτεΐνες (pUL36, pUL37×1, ppIRS1, ppTRS1) δευτερεύουσας σημασίας, ευνοούν την αντιγραφή, χωρίς να συμμετέχουν ενεργά στα κέντρα αντιγραφής (replication compartments). Εκτός των ιικών πρωτεϊνών, ορισμένοι κυτταρικοί παράγοντες κρίνονται απαραίτητοι για την επιτέλεση της αντιγραφής.

Τέλος, η αντιγραφή του γονιδιώματος του HCMV πραγματοποιείται με το μηχανισμό του κυλιόμενου κύκλου, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται DNA αλυσιδομερή (concatamers), δηλαδή μία αλληλουχία DNA που περιέχει επαναλαμβανόμενα αντίγραφα του γονιδιώματος του HCMV.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η έκφραση των L γονιδίων, εξαρτάται από την προγενέστερη έκφραση των DE. Βέβαια, τα L γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις υποκατηγορίες γ_1 και γ_2 , με κριτήριο αν απαιτείται η επιτέλεση της διαδικασίας της αντιγραφής για την έκφραση τους, με τα γ_2 συγκεκριμένα να εξαρτώνται από αυτή. Οι L πρωτεΐνες εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η ωρίμανση του καψιδίου, η είσοδος του DNA σε αυτό, το τελικό στάδιο ωρίμανσης του ιοσωματίου και η έξοδος από το κύτταρο, διαδικασίες που θα περιγραφούν εκτενέστερα παρακάτω (**Mocarski et al. 2013**).

Ωρίμανση και έξοδος

Η διαδικασία της ωρίμανσης ξεκινάει εσωτερικά του πυρήνα, με την ενκαψιδίωση του ιικού DNA στα συναρμολογημένα καψίδια, καταλήγοντας στην απόκτηση φακέλου στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας εν τέλει μολυσματικά ιοσωμάτια. Ειδικότερα στον πυρήνα εκτυλίσσονται η συναρμολόγηση του καψιδίου, η ενσωμάτωση του DNA σε αυτό (ενκαψιδίωση), η αρχική απόκτηση tegument πρωτεϊνών (tegumentation) και η έξοδος του από αυτόν. Στη συνέχεια, στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται η συναρμολόγηση του AC (Assembly Complex), το τελικό στάδιο της απόκτησης tegument πρωτεϊνών (tegumentation), η απόκτηση φακέλου, και εν τέλει η έξοδος (**Tandon and Mocarski 2012**).

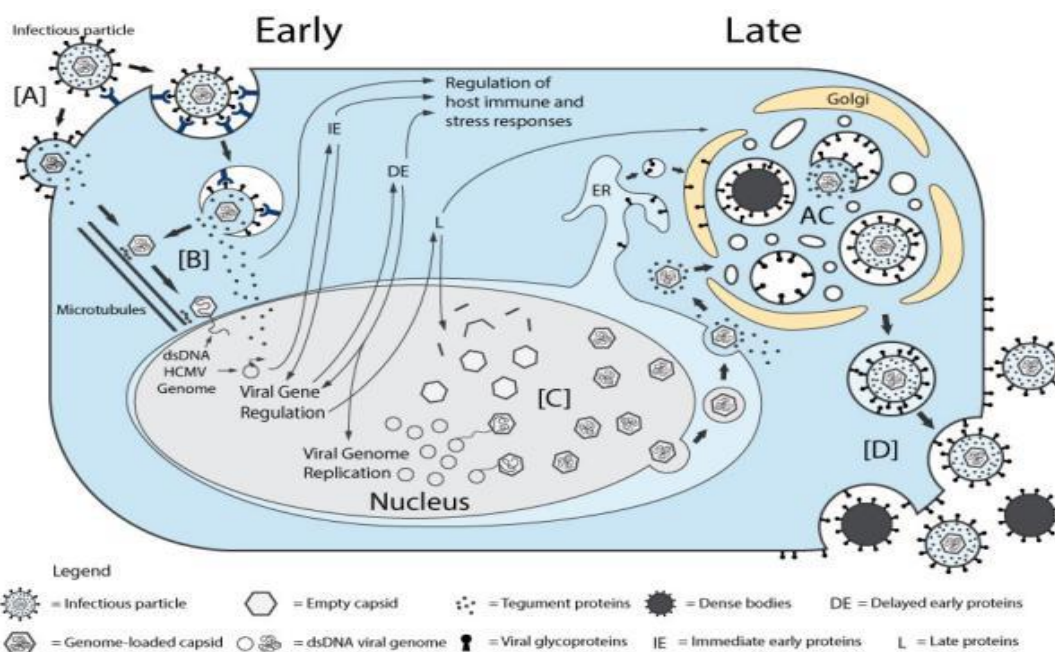
Η συναρμολόγηση του καψιδίου μεσολαβεί από τις επονομαζόμενες πρωτεΐνες ικριώματος (scaffold proteins), pAP (assembly protein precursor, pUL80.5) και pPR (protease precursor, pUL80a), οι οποίες συνδέονται ως σύμπλοκο με τη κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου, MCP, μεταφέροντας την στον πυρήνα, ρυθμίζοντας τη συναρμολόγηση του προκαψιδίου (πρώιμη μορφή του καψιδίου). Η πρωτεΐνη pPR είναι υπεύθυνη για το μετέπειτα κόψιμο των πρωτεϊνών του ικριώματος, οι οποίες εν συνεχεία απελευθερώνονται από το εσωτερικό του καψιδίου. Μετά το σχηματισμό των καψιδίων, ενσωματώνεται σε κάθε ένα από αυτά ένα μονομερές ιικό γονιδίωμα (single genome length of DNA), το οποίο προκύπτει από κόψιμο των αλυσιδομερών από το σύμπλοκο τερμινάσης (pUL89–pUL56–pUL51) στα απαραίτητα για τον τεμαχισμό του DNA cis-δρώντα στοιχεία pac, που βρίσκονται στις τερματικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες a του γονιδιώματος (**Mocarski et al. 2013; Tandon and Mocarski 2012; Gibson 2008**). Βέβαια, εκτός από την παραγωγή των

νουκλεοκασιδίων με τη παραπάνω μορφή (C καψίδια), τα οποία θα ωριμάσουν σε μολυσματικά ιοσωμάτια, υπάρχουν άλλες δύο κατηγορίες κασιδίων που προκύπτουν (A και B) όταν δε γίνεται σωστά η διαδικασία της ενκασιδίωσης του DNA σε αυτά, με την πρώτη (A) περίπτωση να αφορά καψίδια που δεν εμπεριέχουν ούτε πρωτεΐνες ικριώματος ούτε και DNA, ενώ την δεύτερη (B) να αφορά καψίδια που περικλείουν τις πρωτεΐνες ικριώματος, χωρίς όμως το DNA του ιού. Πιο συγκεκριμένα, τα B καψίδια μπορούν να αποκτήσουν λιπιδικό φάκελο μετέπειτα, καταλήγοντας στα προαναφερθέντα NIEPs (**Tandon and Mocarski 2012**).

Αφού σχηματιστούν τα νουκλεοκασιδία, μεταφέρονται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Αν και η απόκτηση tegument πρωτεϊνών γίνεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, η pp150 tegument πρωτεΐνη συνδέεται με το νουκλεοκασιδίδιο πριν την έξοδο από τον πυρήνα, προσδίδοντας του σταθερότητα καθώς το συνοδεύει στο AC του κυτταροπλάσματος. Σημαντικό ρόλο στην έξοδο του νουκλεοκασιδίου από τον πυρήνα έχει το σύμπλοκο NEC (nuclear egress complex), το οποίο αγκυροβολεί στην εσωτερική μεμβράνη του πυρήνα, και είναι υπεύθυνο για την αποσύνθεση της πυρηνικής λαμίνης, μέσω της στρατολόγησης ιικών και κυτταρικών κινασών, που φωσφορυλιώνουν τις πυρηνικές λαμίνες, οδηγώντας σε αποσύνθεσή τους, ευνοώντας το πέρασμα του νουκλεοκασιδίου. Τα νουκλεοκασιδία, εν συνεχεία, αποκτούν ένα προσωρινό φάκελο από την εσωτερική πυρηνική μεμβράνη, τον οποίο χάνουν κατά την έξοδο τους από την εξωτερική πυρηνική μεμβράνη (primary envelopment/de-envelopment) (**Mocarski et al. 2013; Tandon and Mocarski 2012**).

Αφού τα νουκλεοκασιδία εξέλθουν από τον πυρήνα κατευθύνονται και συσσωρεύονται στο AC (Assembly Complex), το οποίο έχει σημαντικό ρόλο στα κυτταροπλασματικά στάδια της ωρίμανσης, τα οποία αφορούν την τελική απόκτηση tegument (final tegumentation) πρωτεϊνών, την απόκτηση φακέλου και την έξοδο από το κύτταρο. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από κυτταρικά οργανίδια, όπως το σύστημα Golgi (cis και trans), το Ενδοπλασματικό δίκτυο και τα Ενδοσώματα, αποκτώντας μία χαρακτηριστική δομή δίπλα από τον πυρήνα. Επίσης, στη περιοχή του AC, εκτός από το μηχανισμό του ενδοσωμιακού συμπλέγματος διαλογής και μεταφοράς, ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) και ορισμένων Rab GTPασών, βρίσκονται και tegument πρωτεΐνες (pp150, pUL96, pp28, pp65, pUL103 και pUL94) όσο και οι γλυκοπρωτεΐνες (gM:gN, gB, και gH:gL) που θα απαρτίζουν τον ιικό λιπιδικό φάκελο. Μόλις τα νουκλεοκασιδία αποκτήσουν τις tegument πρωτεΐνες και το λιπιδικό φάκελο, μεταφέρονται μέσω κυστιδίων, για να απελευθερωθούν μέσω εξωκύτωσης από το κύτταρο ξενιστή. Αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τα ώριμα ιοσωμάτια στο AC παράγονται και τα μη μολυσματικά

σωματίδια, DBs και NIEPs, για τα οποία έγινε αναφορά σε προηγούμενη ενότητα (Mocarski et al. 2013; Tandon and Mocarski 2012).



Εικόνα 2. Απεικόνιση του κύκλου ζωής του HCMV κατά τη λυτική μόλυνση.

A) Είσοδος των ισωματίων στο κύτταρο μέσω της αλληλεπίδρασης τους με κυτταρικούς υποδοχείς. Το νουκλεοκαψίδιο και οι “tegument” πρωτεΐνες εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα.

B) Το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρεται στο πυρήνα, όπου το γονιδίωμα απελευθερώνεται και κυκλοποιείται. Οι “tegument” πρωτεΐνες ρυθμίζουν τις αποκρίσεις του κυττάρου ξενιστή και ρυθμίζουν την έκφραση των άμεσα-πρώιμων (IE) γονιδίων, ακολουθούμενα από τα καθυστερημένα-πρώιμα (DE) γονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντιγραφή του γονιδιώματος και την ρύθμιση της έκφρασης των όψιμων (L) γονιδίων.

C) Τα όψιμα γονίδια είναι υπεύθυνα για την διαδικασία της ωρίμανσης του HCMV. Αρχικά, πραγματοποιείται η συναρμολόγηση του νουκλεοκαψιδίου στον πυρήνα, το οποίο ακολούθως απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Τα νουκλεοκαψίδια περιβάλλονται με τις “tegument” πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στη δομή assembly complex (AC), η οποία αποτελείται από κομμάτια του Ενδοπλασματικού δικτύου (ER), του συστήματος Golgi και του Ενδοσωματίου. Μετέπειτα, τα νουκλεοκαψίδια αποκτούν επενδυτή (envelope) μέσα σε ενδοκυτταρικά κυστίδια στο AC.

D) Τα συναρμολογημένα μολυσματικά ισωμάτια και τα μη μολυσματικά “dense bodies” απελευθερώνονται από το κύτταρο (Βρέθηκε από (Jean Beltran and Cristea 2014))

1.2.4.2 Λανθάνουσα κατάσταση και επανενεργοποίηση

Η λανθάνουσα κατάσταση χαρακτηρίζεται από παραμονή του ιικού γονιδιώματος στα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, χωρίς τη παραγωγή νέων ισωματίων, κατάσταση η οποία μπορεί να αντιστραφεί με την επανενεργοποίηση του ιού κατά τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα (Elder and Sinclair 2019). Κατά τη λανθάνουσα φάση καταστέλλεται γενικά η ιική γονιδιακή

έκφραση, χωρίς βέβαια να παρατηρείται πλήρης καταστολή της, καθώς εκφράζεται ένας περιορισμένος αριθμός ιικών πρωτεϊνών, όπως η US28, η UL138, η ιική IL-10, η UL144, και το αντιγόνο LUNA (latency unique natural antigen), που είναι απαραίτητο για την επανενεργοποίηση του ιού. Εκτός αυτού, κατά τη λανθάνουσα φάση έχουν βρεθεί δύο μακρά μη-κωδικοποιητικά RNAs (lnc-RNAs 2.7 και 4.9), καθώς και ορισμένα ιικά mi-RNAs (**Gugliesi et al. 2020**).

Η παραμονή σε λανθάνουσα κατάσταση οφείλεται στη καταστολή της έκφρασης των IE γονιδίων (IE1-p72 και IE2-p86), μέσω της συμπύκνωσης της δομής της χρωματίνης (ετεροχρωματίνη) και της στρατολόγησης κατασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του υποκινητή τους, MIEP. Η ανενεργή δομή της χρωματίνης επιτυγχάνεται πρώτα από όλα, από τον αποκλεισμό της tegument πρωτεΐνης pp71 από τον πυρήνα, με αποτέλεσμα να μην αποτρέπεται η κατασταλτική δράση του Daxx για τη μεταγραφή των IE γονιδίων. Μόλις εισαχθεί στο εσωτερικό του πυρήνα, το ιικό γονιδίωμα πακετάρεται με ιστόνες, με αποτέλεσμα να μπορεί να δεχθεί επιγενετική ρύθμιση. Συγκεκριμένα, κατά τη λανθάνουσα φάση επιστρατεύονται επιγενετικοί ρυθμιστές, όπως μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs, Histone Methyltransferases) και από-ακετυλάσες ιστονών (HDACs, Histone Deacetylases), όπως και η πρωτεΐνη HP1 (heterochromatin protein 1), που οδηγούν στη μεταγραφική καταστολή των IE, μέσω της “επιβολής” δομής ετεροχρωματίνης στην περιοχή του MIEP. Επίσης χαρακτηριστικά παραδείγματα κατασταλτικών μεταγραφικών παραγόντων, που προσδένονται στον MIEP, είναι οι YY1 και ERF (**Elder and Sinclair 2019; Goodrum 2016**).

Αντίθετα, κατά την επανενεργοποίηση του ιού, η χρωματίνη στη περιοχή του MIEP αποκτάει πιο ανοικτή δομή (ευχρωματίνη), οδηγώντας στην ενεργοποίηση του εν λόγω υποκινητή, με αποτέλεσμα την έκφραση των IE γονιδίων, που είναι απαραίτητα για την είσοδο στο λυτικό κύκλο (**Gugliesi et al. 2020; Elder and Sinclair 2019**). Ειδικότερα, παρατηρείται, απομάκρυνση της HP1 και απομεθυλίωση των τριμεθυλιωμένων ιστονών (H3K27me3 και H3K9me3), που επικρατούν στην λανθάνουσα κατάσταση, καθώς και ακετυλίωση των ιστονών, πράγμα το οποίο οδηγεί σε ανοικτή δομή χρωματίνης, ευνοώντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση των IE γονιδίων. Εκτός αυτού, προσδένονται στον MIEP μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής, όπως ο CREB και ο NF-κB (**Elder and Sinclair 2019**).

1.2.5 Αλληλεπίδραση του HCMV με το ξενιστή

Η μόλυνση με HCMV τόσο στη περίπτωση της λυτικής μόλυνσης, όσο και σε αυτή της λανθάνουσας κατάστασης, οδηγεί σε τροποποίηση πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών των κυττάρων ξενιστών. Συγκεντρωτικά, κατά τη λυτική μόλυνση, ο HCMV τροποποιεί κυτταρικές διεργασίες, όπως αυτές του μεταβολισμού, της μεταγραφής, της μετάφρασης, της σηματοδότησης, καθώς και του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, εμποδίζονται διαδικασίες που αφορούν την ανοσο-επιπήρηση των κυττάρων, καθώς και αυτές του κυτταρικού stress και του κυτταρικού θανάτου. Ακόμα και κατά τη λανθάνουσα κατάσταση, που η ιική μεταγραφική έκφραση είναι μηδαμινή, παρατηρείται εμπλοκή του ιού σε διαδικασίες όπως η κυτταρική γονιδιακή έκφραση και η κυτταρική σηματοδότηση, καθώς και σε αυτές της ανοσο-επιπήρησης, του κυτταρικού θανάτου και stress, με ανασταλτικό, βέβαια, τρόπο για τις τρεις τελευταίες (Poole and Sinclair 2015).

1.2.6 Διασπορά του HCMV

Ο HCMV μπορεί να μεταδοθεί τόσο μέσω κάθετης, όσο και μέσω οριζόντιας μετάδοσης. Όσον αφορά τη κάθετη μετάδοση, η μητέρα μπορεί να μεταδώσει το παθογόνο είτε κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στο έμβρυο μέσω του πλακούντα, είτε κατά τον τοκετό στο νεογνό μέσω των γεννητικών εκκρίσεων, είτε και μέσω του μητρικού γάλακτος κατά το θηλασμό. Η οριζόντια μετάδοση από άτομο σε άτομο γίνεται μέσω των σωματικών υγρών, όπως του σάλιου, των ούρων, των δακρύων, του αίματος, των γεννητικών εκκρίσεων (κολπικές, τραχηλικές, σπέρμα), καθώς και μέσω μεταμόσχευσης οργάνου ή μετάγγισης αίματος. Τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, αλλά και ο εσωτερικός βλεννογόνος αποτελούν τα πρώτα σημεία μόλυνσης του ξενιστή από τον ιό, ο οποίος εισχωρεί στο εσωτερικό του ξενιστή κυρίως μέσω της άνω γαστρεντερικής και αναπνευστικής οδού. Τα λευκοκύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα, μονοκύτταρα, δενδριτικά) και τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλουν στην αιματογενή διασπορά του ιού, η οποία αφορά πρωτογενώς τη μόλυνση πολλαπλών ιστών όπως του πνεύμονα, του ήπατος, και της σπλήνας, και δευτερογενώς των σιελογόνων, μαστικών αδένων και των νεφρών, όπου μέσω των εκκρίσεων τους απελευθερώνεται ο ιός στο περιβάλλον, ευνοώντας τη μόλυνση άλλου ξενιστή (Gugliesi et al. 2020; Mocarski et al. 2013).

1.2.7 Παθολογία του HCMV

Γενικώς, τα ανοσοεπαρκή άτομα δεν εμφανίζουν συμπτώματα μετά από μόλυνση με τον HCMV, αν και ορισμένες φορές παρατηρείται μονοπυρήνωση. Αντίθετα σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, όπως αυτών, που πάσχουν από AIDS,

που είναι δέκτες μωσχεύματος, ή λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία (χημειοθεραπεία), η μόλυνση με τον εν λόγω ιό σχετίζεται με υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνητότητας. Επίσης, η μόλυνση του εμβρύου από τη μητέρα μέσω του πλακούντα, αλλά και η μόλυνση πρόωρων νεογνών, αποτελούν κλινικά σημαντικές περιπτώσεις. Συνεπώς, τόσο η πρωτογενής μόλυνση, όσο και η επανενεργοποίηση του ιού, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή νοσηρότητα άτομα με κατασταλμένο ή μη επαρκώς ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα. Εκτός αυτών, ο HCMV έχει συσχετισθεί με την πρόοδο συγκεκριμένων καρκίνων και καρδιαγγειακών νοσημάτων (**Mocarski et al. 2013; Fulkerson et al. 2021**).

Ανοσοεπαρκή άτομα

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η προσβολή ενός ανοσοεπαρκούς ατόμου με τον ιό HCMV, δε θα προκαλέσει τη παρουσία συμπτωμάτων, ακόμα και όταν μεταδίδεται από τη μητέρα στο νεογνό κατά τον τοκετό ή μέσω του θηλασμού μετέπειτα. Όμως, σε κάποιες περιπτώσεις, ο ξενιστής μπορεί να εμφανίσει συμπτώματα λοιμώδους μονοπυρήνωσης, παρόμοια με αυτά που παρουσιάζονται στη περίπτωση του EBV (Epstein–Barr Virus). Τα κοινά συμπτώματα, που εμφανίζονται κατά τη λοιμώδη μονοπυρήνωση είναι πυρετός, ναυτία, μυαλγίες, πονοκέφαλος, και κόπωση. Λιγότερο συχνά εμφανίζονται συμπτώματα όπως σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία, αδενοπάθεια, και εξανθήματα. Τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της σχετιζόμενης με τον EBV μονοπυρήνωσης (φαρυγγίτιδα, αδενοπάθεια, σπληνομεγαλία) είναι λιγότερο συχνά στη περίπτωση της μονοπυρήνωσης του HCMV. Σπάνια, η μόλυνση με HCMV ανοσοεπαρκών ατόμων σχετίζεται με σοβαρή νόσηση, με πιθανότητα ακόμα και να οδηγήσει στο θάνατο. Οι κλινικά, λοιπόν, σημαντικές εκδηλώσεις, που μπορεί να εμφανιστούν είναι οι εξής: κολίτιδα, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, εγκάρσια μυελίτιδα, αιμολυτική αναιμία, θρομβοκυτταροπενία, ραγοειδίτιδα, αμφιβληστροειδίτιδα, ηπατίτιδα, πνευμονίτιδα, θρομβώσεις στο αρτηριακό και φλεβικό σύστημα (**Mocarski et al. 2013; Fulkerson et al. 2021; Gugliesi et al. 2020**).

Συγγενής μόλυνση

Η συγγενής μόλυνση με HCMV αποτελεί τη πιο συχνή αιτία ιικών συγγενών μολύνσεων στις Η.Π.Α., και προκύπτει όταν ο ιός μεταδίδεται από τη μητέρα στο έμβryo διαμέσου του πλακούντα. Αυτό μπορεί να συμβεί, είτε όταν η μητέρα προσβάλλεται για πρώτη φορά από τον ιό (πρωτογενής μόλυνση), είτε σε περίπτωση μη πρωτογενούς μόλυνσης, δηλαδή κατά τη επαναμόλυνση της ήδη οροθετικής μητέρας με διαφορετικό στέλεχος του ιού ή σε περίπτωση επανενεργοποίησης του ιού. Τα συγγενώς μολυσμένα νεογνά κατηγοριοποιούνται με

βάση τη συμπτωματολογία κατά τη γέννηση σε συμπτωματικά (10%) και ασυμπτωματικά (90%). Από τα συμπτωματικά, ένα ποσοστό της τάξεως του 30-40% θα εμφανίσει σοβαρή συμπτωματολογία, όπως πνευμονία, νόσους του γαστρεντερικού και του αμφιβληστροειδούς, αιμολυτική αναιμία, θρόμβοκυτταροπενία, ίκτερο, ηπατοσπληνομεγαλία, καθώς και νόσων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Αν και τα συμπτώματα αυτά συνήθως υποχωρούν μερικές εβδομάδες μετά από τη γέννηση, η νόσηση μπορεί να είναι σοβαρή σε ορισμένα νεογνά, με ένα μικρό ποσοστό αυτών να οδηγούνται και στο θάνατο. Στις περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις συμπτωματικών συγγενώς μολυσμένων ατόμων εμφανίζονται ανωμαλίες στο ΚΝΣ, οι οποίες συχνά προκαλούν ένα εύρος νευρολογικών συμπτωμάτων, όπως νοητική στέρωση, περιορισμένη κινητική ικανότητα, νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής, και απώλεια όρασης. Οι επιπλοκές στο ΚΝΣ εμφανίζονται και σε νεογνά που ήταν ασυμπτωματικά κατά τη γέννηση, με το 10% των ασυμπτωματικών νεογνών να είναι σε κίνδυνο ανάπτυξης νευροαισθητηριακής απώλειας ακοής, με το 8-10% όλων των συγγενώς μολυσμένων νεογνών να πάσχει από αυτή (**Fulkerson et al. 2021**).

Σε γενικές γραμμές, θεωρείται ότι σε περίπτωση πρωτογενούς μόλυνσης της μητέρας, οι πιθανότητες συγγενούς μόλυνσης, καθώς και η εμφάνιση συμπτωμάτων από το νεογνό είναι υψηλότερες σε σχέση με τη περίπτωση της μη πρωτογενούς μόλυνσης, πράγμα το οποίο δεν επικυρώνεται από όλες τις μελέτες. Επίσης, η χρονική στιγμή μόλυνσης της μητέρας κατά την κύηση παίζει σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα των συμπτωμάτων, με αυξημένη επικινδυνότητα να υπάρχει στα πρωταρχικά στάδια της κύησης (**Fulkerson et al. 2021; Mocarski et al. 2013**).

Μόλυνση πρόωρων νεογνών

Στη περίπτωση των πρόωρων νεογνών, τα οποία μολύνονται στα αρχικά στάδια της ζωής τους, μπορεί να εμφανιστούν σοβαρές επιπλοκές. Η εκδήλωση νόσου από HCMV έχει συσχετισθεί με τα πρόωρα νεογνά οροαρνητικών για HCMV μητέρων, τα οποία έλαβαν αίμα (μετάγγιση) από οροθετικούς για HCMV δότες, εμφανίζοντας πολυοργανική ανεπάρκεια. Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα πρόωρα νεογνά μολύνονται σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα τελειόμηνα, αν θηλάζονται από οροθετική μητέρα. Οι επιπλοκές που σχετίζονται με μόλυνση με HCMV στα πρόωρα νεογνά είναι θρομβοκυτταροπενία, ηπατοσπληνομεγαλία, άπνοια, βραδυκαρδία, πνευμονική δυσλειτουργία, σύνδρομο σήψης, και σύνδρομο μονοπυρήνωσης. Κάποιες μελέτες έχουν συνδέσει τη πρώιμη μεταγεννητικά μόλυνση με HCMV των πρόωρων νεογνών με αρνητικές συνέπειες στη νευρολογική/νοητική ανάπτυξη, πράγμα το οποίο δεν υποστηρίζεται από άλλες. Τέλος, η νόσηση των πρόωρων νεογνών μετά από

μετάγγιση, μπορεί να ελαττωθεί αν επιλεγθούν οροαρνητικοί για HCMV δότες, ή απομακρυνθούν τα λευκοκύτταρα από το μεταγγιζόμενο αίμα (**Fulkerson et al. 2021**).

Μόλυνση δεκτών μοσχεύματος

Η κύρια αιτία εμφάνισης νόσου HCMV στους δέκτες μοσχεύματος συμπαγούς οργάνου (SOT, solid organ transplant recipients) είναι η επανενεργοποίηση του ιού, που βρίσκεται στο αλλομόσχευμα του δότη, ενώ στη περίπτωση μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) είναι η επανενεργοποίηση του ιού στον ήδη οροθετικό για τον HCMV δέκτη. Βέβαια, οι δέκτες μοσχευμάτων μπορούν να εμφανίσουν πρωτογενή μόλυνση από άτομο που μεταδίδει ενεργά τον ιό. Συνήθως, ο ιός ανιχνεύεται στο αίμα ή στις εκκρίσεις περίπου 4-8 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση, με τη νόσο να εκδηλώνεται τους πρώτους τρεις μήνες μετά τη μεταμόσχευση (πρώιμη έναρξη της CMV νόσου), ενώ σπανίως εκδηλώνεται μετά το πέρας τριών μηνών (όψιμη έναρξη της CMV νόσου). Η μόλυνση με HCMV μεταμοσχευμένων ασθενών, οδηγεί τόσο σε άμεσες όσο και σε έμμεσες κλινικές εκδηλώσεις. Οι άμεσες εκδηλώσεις στους SOT ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε αυτές που αφορούν το CMV σύνδρομο και σε αυτές που αφορούν τη διηθητική CMV νόσο των ιστών. Αναφορικά με το CMV σύνδρομο, συμπεριλαμβάνει συμπτώματα κοινής γρίπης, κακουχία, πυρετό, θρομβοκυτταροπενία, και λευκοπενία. Η διηθητική νόσος των ιστών μπορεί να αφορά πολλά όργανα, ειδικότερα το αλλομόσχευμα, οδηγώντας σε ηπατίτιδα, πνευμονίτιδα, κολίτιδα, νεφρίτιδα, και αμφιβληστροειδίτιδα. Σχετικά με τους HSCT ασθενείς, οι κυριότερες κλινικές επιπλοκές, που παρουσιάζονται, είναι αυτές της γαστρεντερικής οδού και της πνευμονίτιδας. Οι έμμεσες επιπτώσεις της μόλυνσης με HCMV είναι εκείνες που προέρχονται από την ανοσοτροποποιητική ικανότητα του ιού και περιλαμβάνουν: αυξημένη συχνότητα εμφάνισης βακτηριακών και μυκητιακών μολύνσεων, καρδιαγγειακής νόσου, απόρριψης αλλομοσχεύματος σε SOT ασθενείς, νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή στους HSCT ασθενείς, καθώς και απώλεια της ζωής των μεταμοσχευμένων ασθενών (**Fulkerson et al. 2021; Mocarski et al. 2013**).

Το ορολογικό προφίλ του δότη/δέκτη πριν τη μεταμόσχευση παίζει σημαντικό ρόλο ως προς την έκβαση της νόσου. Στους SOT ασθενείς ο συνδυασμός οροθετικού δότη με οροαρνητικού δέκτη αποτελεί την υψηλότερου ομάδα κινδύνου, ενώ στους HSCT ασθενείς η υψηλότερου ομάδα κινδύνου είναι εκείνη οροαρνητικού δότη/οροθετικού δέκτη. Συνεπώς το ορολογικό προφίλ του δότη/δέκτη μοσχεύματος πρέπει να ελέγχεται πριν τη μεταμόσχευση (**Fulkerson et al. 2021**).

Δύο είναι οι κύριοι τρόποι πρόληψης της CMV νόσου, η αντική προφύλαξη και η προφυλακτική θεραπεία (preemptive therapy, PET). Η πρώτη αφορά τη χορήγηση αντι- ιικών παραγόντων σε περιόδους υψηλού κινδύνου εμφάνισης της νόσου, χωρίς να ανιχνεύεται η παρουσία του ιού στη κυκλοφορία του αίματος, ενώ η δεύτερη αφορά τη τακτική παρακολούθηση του ασθενούς, με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση του ιού στο αίμα, ώστε να γίνει χορήγηση αντι-ιικών παραγόντων πριν την έναρξη της νόσου. Οι συγκεκριμένοι τρόποι πρόληψης έχουν οδηγήσει στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης CMV νόσου και σχετιζόμενων με αυτή θανάτων μεταμοσχευμένων ασθενών, αν και η εμφάνιση όψιμης νόσου αποτελεί ακόμα ένα μείζον πρόβλημα για αυτούς τους ασθενείς, καθώς είναι υπεύθυνη για τα υψηλά επίπεδα θνησιμότητας (**Fulkerson et al. 2021**).

HCMV και AIDS

Ο HCMV αποτελεί ορορτουιστικό παθογόνο για τους ασθενείς που πάσχουν από AIDS (Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome) και έχει συσχετισθεί με τη πρόοδο της μόλυνσης του ιού HIV (Human Immunodeficiency Virus), που το προκαλεί. Ο ορολογικός επιπολασμός του HCMV είναι εμφανής σχεδόν όλα τα ενήλικα άτομα και περίπου τα μισά παιδιά που είναι οροθετικά για τον HIV. Περίπου το 40% των ενηλίκων και το 10% των παιδιών με AIDS είχαν κλινικές εκδηλώσεις της HCMV νόσου, πριν την εισαγωγή της αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (highly active antiretroviral therapy, HAART). Συχνές εκδηλώσεις της νόσου HCMV σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS είναι η αμφιβληστροειδίτιδα, η οισοφαγίτιδα, και η κολίτιδα, των οποίων η εμφάνιση έχει ελαττωθεί μετά την εισαγωγή της HAART. Παρόλα αυτά, η μόλυνση με HCMV παραμένει ένας ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας νοσηρότητας και θνητότητας σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS. Επιπροσθέτως, ανεξάρτητα από τη δράση του HCMV ως ορορτουιστικό παθογόνο στη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών, ο συγκεκριμένος ιός φαίνεται ότι επηρεάζει τη πρόοδο της μόλυνσης του HIV και κατά συνέπεια τη θνησιμότητα σε αυτούς τους ασθενείς (**Fulkerson et al. 2021**).

1.2.8 Επιδημιολογία του HCMV

Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι κατά μέσο όρο το 83% του γενικού πληθυσμού είναι οροθετικό για τον HCMV, με σημαντικές διακυμάνσεις ανά περιοχή, καθώς σε επίπεδο χωρών το ποσοστό οροθετικότητας κυμαίνεται από 39% (Ιρλανδία) έως και 97% (Τουρκία). Σε ευρύτερο χωρικό πλαίσιο, η περιοχή της ανατολικής Μεσογείου εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά οροθετικότητας, ενώ η Ευρώπη τα χαμηλότερα,

τόσο στο γενικό πληθυσμό, όσο και στις γυναίκες που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία και στους δότες οργάνων **(Zuhair et al. 2019)**.

Αν και τα ποσοστά επιπολασμού της μόλυνσης από HCMV είναι αυξημένα στις μεγαλύτερες ηλικιακά ομάδες ανεξάρτητα του κοινωνικού συνόλου που μελετάται, έχει παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες διαβίωσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα μόλυνσης από τον εν λόγω ιό, καθώς ο επιπολασμός για τον HCMV στα κατώτερα κοινωνικο-οικονομικά στρώματα είναι υψηλότερος. Ειδικότερα, στις αναπτυσσόμενες χώρες η πρωτογενής μόλυνση των ανθρώπων από HCMV συμβαίνει νωρίτερα κατά τη διάρκεια της ζωής σε σχέση με την Ευρωπαϊκή ήπειρο και τις ΗΠΑ, όπου και σε αυτές τα φτωχότερα στρώματα, οι μετανάστες από αναπτυσσόμενες χώρες και οι “μη-λευκοί” εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά επιπολασμού. Βέβαια, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών φυλών δεν οφείλεται στα φυλετικά χαρακτηριστικά, αλλά στις διαφορετικές συνθήκες διαβίωσης τους **(Mocarski et al. 2013)**. Χαρακτηριστικά δεδομένα για τη συσχέτιση των κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών παρατίθενται στην Αμερικανική μελέτη NHANES, η οποία υποδεικνύει ανεξάρτητη συσχέτιση των αυξημένων ποσοστών επιπολασμού με το χαμηλό οικογενειακό εισόδημα, το χαμηλό οικογενειακό μορφωτικό επίπεδο, τη διαμονή σε συνθήκες συνωστισμού, καθώς και τη μη-παροχή ιατρικής ασφάλισης **(Bate, Dollard, and Cannon 2010)**.

1.2.9 HCMV και εμβόλιο

Αν και οι ερευνητικές προσπάθειες για εφεύρεση εμβολίου έναντι του HCMV έχουν ξεκινήσει εδώ και 50 χρόνια, δεν έχει μπορέσει ακόμα να παραχθεί ένα αποτελεσματικό για αυτόν τον ιό εμβόλιο, πράγμα το οποίο αποτελεί ύψιστη ανάγκη κυρίως για τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα και τις οροαρνητικές κυοφορούσες γυναίκες. Πρωταρχικός στόχος για την εφεύρεση του εμβολίου είναι η αποφυγή εκδήλωσης πρωτογενούς μόλυνσης από τα υψηλού κινδύνου άτομα, και δευτερευόντως η διατήρηση μίας μόνιμης προστασίας σε πιθανές επαναμολύνσεις από διαφορετικά στελέχη του ιού, αλλά και σε ενδεχόμενο επανενεργοποίησης του ιού. Το “ιδανικό” εμβόλιο για την επίτευξη αυτών των στόχων, θα πρέπει να επάγει τόσο απαντήσεις εξουδετερωτικών (neutralizing) και μη (binding) αντισωμάτων (χυμική ανοσία), αλλά και CD8+/CD4+ T-κυττάρων (κυτταρική ανοσία). Η επίτευξη αυτού του συνδυασμού ανοσολογικής απάντησης ίσως απαιτεί την παραγωγή εμβολίου, που θα συμπεριλαμβάνει πολλούς ανοσογόνους παράγοντες, με τα αποτελέσματα από τις μέχρι τώρα μελέτες να υποδεικνύουν ως καταλληλότερους την gB γλυκοπρωτεΐνη (προάγει χυμική και κυτταρική ανοσία), την pp65 tegument πρωτεΐνη (προάγει ισχυρή κυτταρική ανοσία), και το πενταμερές σύμπλοκο

gH/gL/UL128/UL130/UL131 (προάγει τη παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων) (**Gugliesi et al. 2020; Cui and Snapper 2019**).

1.2.10 Θεραπεία του HCMV

Μέχρι στιγμής, έξι είναι τα φάρμακα τα οποία έχουν πάρει έγκριση για συστηματική η προφυλακτική θεραπεία έναντι του HCMV, εκ των οποίων τα GCV (Ganciclovir), VGCV (Valganciclovir), CDV (Cidofovir), FOS (Foscarnet) έχουν παρόμοιες ιδιότητες καθώς στοχεύουν στη δράση της ιικής DNA πολυμεράσης (UL54 γονίδιο), με αποτέλεσμα τη παρεμπόδιση της σύνθεσης του ιικού DNA. Αντιθέτως, το Fomivirsen στοχεύει στην εμπόδιση της έκφρασης του άμεσα πρώιμου γονιδίου IE2, ενώ το LTV (Letermovir) στοχεύει στο σύμπλοκο τερμινάσης του HCMV, παρεμποδίζοντας το πακετάρισμα του ιικού DNA στα καψίδια. Αν και οι εν λόγω θεραπευτικές επιλογές έχουν επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του ιού, η χορήγηση τους ενέχει και αρνητικά σημεία όπως η επαγωγή τοξικότητας, η φτωχή βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγούνται δια του στόματος, αλλά και η ανάπτυξη ανοχής από τον οργανισμό έναντι αυτών (**Gugliesi et al. 2020; Britt and Prichard 2018**).

Στη πρώτη γραμμή θεραπείας του HCMV είναι το GCV, το οποίο χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις των συγγενώς μολυσμένων νεογνών, των μολυσμένων με HCMV ανοσοκατεσταλμένων ατόμων, καθώς και ως προφυλακτική θεραπεία για την πρόληψη της νόσου από HCMV. Ενώ το GCV χορηγείται ενδοφλεβίως, το VGCV, που αποτελεί προφάρμακο του πρώτου χορηγείται δια του στόματος έχοντας υψηλότερη στοματική διαθεσιμότητα και χορηγείται στους SOT δέκτες ως προφυλακτική θεραπεία. Η κυτταροτοξικότητα, που προκαλείται από τη χορήγηση του GCV, μπορεί να οδηγήσει σε ουδετεροπενία, αναιμία, και θρομβοκυτταροπενία. Επίσης, παρατηρείται ανοχή στα δύο αυτά φάρμακα, με τις μεταλλάξεις που την προκαλούν να αφορούν κυρίως τα γονίδια UL54 και UL97, καθώς το GCV αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το τελευταίο (**Gugliesi et al. 2020; Britt and Prichard 2018; Krishna, Wills, and Sinclair 2019**).

Τα φάρμακα CDV και FOS αποτελούν αγωγές δεύτερης επιλογής για τη θεραπεία του HCMV, αν και τα δύο μπορούν να προκαλέσουν νεφροτοξικότητα και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικών μεταλλάξεων από τον ιό. Συγκεκριμένα, το CDV χορηγείται ενδοφλεβίως για τη θεραπεία της αμφιβληστροειδίτιδας που προκαλεί ο HCMV σε ασθενείς που πάσχουν από AIDS. Η ανθεκτικότητα στο CDV σχετίζεται μόνο με μεταλλάξεις, παρόμοιας συχνότητας με το GCV, στην ιική DNA πολυμεράση και όχι στη ιική κινάση UL97, καθώς δεν τη χρειάζεται όπως το GCV για την ενεργοποίησή του. Παρομοίως με το CDV, το φάρμακο FOS εμποδίζει τον ιικό

πολλαπλασιασμό σε πολλούς τύπους DNA ιών, όμως χρησιμοποιείται πρωταρχικά για τη θεραπεία της προκαλούμενης από HCMV, αμφιβληστροειδίτιδας. Παρόλο που και στη περίπτωση του FOS αναπτύσσεται ανθεκτικότητα λόγω των μεταλλάξεων στη DNA πολυμεράση, το εν λόγω φάρμακο χρησιμοποιείται πιο ευρέως σε σχέση με το CDV σε περιπτώσεις ορισμένων GCV-ανθεκτικών μεταλλάξεων, αφού η πιθανότητα εμφάνισης διασταυρούμενης ανθεκτικότητας (cross-resistance) με το GCV είναι πολύ μικρότερη συγκριτικά με αυτή που εμφανίζεται μεταξύ GCV και CDV (**Gugliesi et al. 2020; Britt and Prichard 2018**).

Προσφάτως, εγκρίθηκε η χορήγηση του LTV φαρμάκου σε HSCT δέκτες ως προφυλακτική θεραπεία σε περίπτωση μόλυνσης από τον HCMV. Το συγκεκριμένο φάρμακο έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με την ήδη υπάρχουσα συμβατική θεραπεία, αφού χορηγείται δια του στόματος, προκαλεί ήπια τοξικότητα, που δε σχετίζεται με μυελοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα, και στοχεύει την υπομονάδα pUL56 του συμπλόκου της ιικής τερμινάσης αντι για την ιική DNA πολυμεράση, με αποτέλεσμα να μην επάγεται διευρυμένη ανθεκτικότητα με τα ήδη υπάρχοντα αντι-HCMV φάρμακα. Όμως, και σε αυτή τη περίπτωση θα επέλθει ανθεκτικότητα στην εν λόγω θεραπεία, λόγω κυρίως αποκτηθείσας μετάλλαξης στην pUL56 (**S.-J. Chen, Wang, and Chen 2019; Britt and Prichard 2018**).

Ένα πολλά υποσχόμενο αντι-ιικό φάρμακο για τον HCMV είναι το Maribavir (MBV), το οποίο βρίσκεται ακόμα σε επίπεδο κλινικών μελετών. Στόχος του συγκεκριμένου φαρμάκου είναι η ιική κινάση UL97, η οποία χρειάζεται για τη σωστή συναρμολόγηση του ιικού υμενίου (tegument), του AC (Assemply Complex), αλλά και για την απελευθέρωση του ιού από το κύτταρο. Όμως η συγχορήγηση του MBV με το GCV δεν ενδείκνυται, καθώς το πρώτο είναι αναστολέας της UL97, ενώ το δεύτερο τη χρειάζεται για τον αναβολισμό του σε ενεργή μορφή. Το πλεονέκτημα του MBV έναντι των GCV και VGCV είναι η μειωμένη αιματολογική τοξικότητα και νεφροτοξικότητα που επιφέρει, πράγμα το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην αντικατάσταση των παλαιότερων αυτών φαρμάκων από το MBV (**Krishna, Wills, and Sinclair 2019**).

Παρόλο που τα μέχρι τώρα εγκρινόμενα φάρμακα είναι γενικώς ασφαλή και αποτελεσματικά, υπάρχει η ανάγκη για περαιτέρω ερευνητική προσπάθεια, με σκοπό τη εύρεση νέων θεραπευτικών επιλογών μειώνοντας έτσι τις προκύπτουσες τοξικότητες, αλλά κυρίως την ανθεκτικότητα που επάγεται από την παρατεταμένη χρήση αυτών των υπάρχοντων φαρμάκων, πράγμα το οποίο μπορεί να επιτευχθεί στοχεύοντας σε διαφορετικούς παράγοντες στόχους που συμμετέχουν στον ιικό πολλαπλασιασμό. Μάλιστα η ενδεχόμενη συνδυαστική χρήση φαρμάκων που έχουν διαφορετικούς μοριακούς στόχους, μπορεί εν δυνάμει να οδηγήσει σε

αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου του HCMV για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απουσία εμφάνισης ανθεκτικότητας. Τέλος, δεδομένου ότι και η επανενεργοποίηση του ιού από τη λανθάνουσα κατάσταση εγκυμονεί κινδύνους στους ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς, αποτελεί ύψιστη ανάγκη η προσπάθεια για εφεύρεση φαρμάκων που στοχεύουν στη λανθάνουσα φάση, καθώς μέχρι στιγμής τα υπάρχοντα φάρμακα έχουν όλα ως στόχο παράγοντες που εμπλέκονται στο λυτικό κύκλο ζωής του HCMV (**Krishna, Wills, and Sinclair 2019; Britt and Prichard 2018**).

1.2.11 HCMV και καρκίνος

Ο ακριβής ρόλος του HCMV, ως παράγοντας που προκαλεί καρκίνο, δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, συνεπώς ο συγκεκριμένος ιός δεν συγκαταλέγεται στους ογκογόνους ιούς. Ωστόσο, ο εν λόγω ιός εμπλέκεται αναμφισβήτητα σε διεργασίες που ευνοούν την πρόοδο του καρκίνου, ενισχύοντας την ήδη υπάρχουσα κακοήθεια του όγκου, χωρίς απαραίτητα να οδηγεί ο ίδιος στην “μεταμόρφωση” (transformation) των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, πράγμα το οποίο του προσδίδει τον τίτλο του “ογκοτρόπου” ιού. Βέβαια, οι παρακάτω βιολογικές ιδιότητες του, συσχετίζονται σε απόλυτο βαθμό τον HCMV με τις διαδικασίες της καρκινογένεσης, και αποτελούν ενδείξεις για τη πιθανότητα να ανήκει στη κατηγορία των ογκογόνων ιών. Πρώτον, ο HCMV έχει βρεθεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% στους παρακάτω τύπους ανθρώπινων καρκινωμάτων, όπως στον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών και του προστάτη, καθώς και στο ραβδομυοσάρκωμα, στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, στο νευροβλάστωμα και στους εγκεφαλικούς όγκους (μυελοβλάστωμα και γλοιοβλάστωμα). Επίσης, σε περίπτωση μόλυνσης καρκινικών κυττάρων από τον ιό, δεν ανιχνεύεται σε δίπλα φυσιολογικούς ιστούς, παρά μόνο στα κύτταρα του όγκου και σε μεταστατικά κύτταρα. Επιπλέον, το επίπεδο μόλυνσης από τον HCMV, σχετίζεται αρνητικά με τη θετική έκβαση της νόσου. Επιπροσθέτως, πρέπει να αναφερθεί ότι η αντι-ιική θεραπεία κατά του HCMV, ατόμων που πάσχουν από καρκίνο, βελτίωσε το αποτέλεσμα της πρόγνωσης όσον αφορά την ασθένεια. Ο HCMV ρυθμίζει πληθώρα από ογκογόνα κυτταρικά μονοπάτια και διαδικασίες που σχετίζονται με το σύνολο των “Χαρακτηριστικών του Καρκίνου” (Hallmarks of cancer), όπως τα συνεχή σήματα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αποφυγή της δράσης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης, την αθανατοποίηση, την επαγωγή της αγγειογένεσης, την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου, την απορύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, την αποφυγή της ανοσολογικής αντιμετώπισης, τη γενετική αστάθεια και τις επαγόμενες από τον όγκο φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Πολλές πρωτεΐνες, που κωδικοποιεί ο HCMV,

επιδεικνύουν λειτουργίες που συνδέονται άμεσα με τη κυτταρική μεταμόρφωση και ογκογένεση, καθώς και την ενεργοποίηση προ-ογκογόνων μονοπατιών. Ο HCMV μπορεί να προκαλέσει μόλυνση σε ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων, όπως καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα, και κύτταρα του στρώματος του όγκου, πράγμα το οποίο τον διαφοροποιεί από τους “επίσημα” ογκογόνους ιούς. Όμως, ο ευρύς τροπισμός του HCMV, ίσως έχει μεγάλη ογκογόνο επίδραση και στα κύτταρα του όγκου, μέσω της επίδρασης του στο μικροπεριβάλλον του όγκου, αλλά και στο ανοσοποιητικό σύστημα (**Naucclér, Geisler, and Vetvik 2019; Herbein 2018**).

Το γεγονός ότι τα περισσότερα στελέχη του HCMV, σε αντίθεση με τους εξακριβωμένα ογκογόνους ιούς, δεν έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα σε καρκινικά *in vitro*, δημιουργεί σημαντικές αμφιβολίες για την κατηγοριοποίηση του στους ογκογόνους ιούς. Βέβαια, αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω του ότι ο συγκεκριμένος ιός συμπεριφέρεται διαφορετικά *in vitro*, αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά του συγκριτικά με *in vivo*. Εκτός αυτού, είναι δύσκολο να προσομοιαστούν οι συνθήκες που επικρατούν *in vivo* κατά την *in vitro* πειραματική διαδικασία, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ελεγχθεί η πιθανότητα να επάγεται μετασχηματισμός των κυττάρων, λόγω της δυνατότητας του ιού να μολύνει πολλά διαφορετικά κύτταρα στη περιοχή του όγκου, η συνεργασία των οποίων να οδηγεί εν τέλει στο μετασχηματισμό. Επιπλέον, ίσως είναι απαραίτητο τα κύτταρα στόχοι να χρειάζεται να αποκτήσουν ένα αριθμό σωματικών μεταλλάξεων, ώστε η επακόλουθη μόλυνση με HCMV να οδηγήσει στο μετασχηματισμό τους σε καρκινικά. Όμως, έχει δειχθεί ότι το αγρίου-τύπου στέλεχος HCMV-DB έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει τα HMECs (Human mammary epithelial cells) *in vitro*, τα οποία σχηματίζουν αποικίες σε πήκτωμα άγαρ, και πέραν αυτού τα μετασχηματισμένα αυτά κύτταρα σχηματίζουν όγκο μετά από έγχυση τους σε xenograft ποντίκια (NOD/SCID Gamma). Οπότε, ορισμένα στελέχη του HCMV ίσως έχουν δυνατότητα επαγωγής της ογκογένεσης *in vivo*, σε συγκεκριμένα κύτταρα στόχους και στις κατάλληλες κυτταρικές συνθήκες, πράγμα το οποίο δε μπορεί να διαλευκανθεί σε *in vitro* συνθήκες καλλιέργειας (**Naucclér, Geisler, and Vetvik 2019; Herbein 2018**).

1.3 Γλοιοβλάστωμα

1.3.1 Γενικές πληροφορίες

Το γλοιοβλάστωμα αποτελεί τον πιο συχνό και συνάμα τον πιο κακοήθη τύπο καρκίνου μεταξύ των γλοιωμάτων, τα οποία είναι οι πιο συχνοί όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Τα γλοιώματα μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν σε

αστροκυττώματα, ολιγοδενδρογλοιώματα, και επενδυμώματα, ανάλογα με την κατηγορία των νευρογλοιακών κυττάρων από την οποία προέρχονται (αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα, επενδυματικά κύτταρα). Το γλοιοβλάστωμα είναι διηθητικό αστροκύττωμα με βαθμό κακοήθειας IV, που είναι και ο υψηλότερος στη κλίμακα (I-IV) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), υποδηλώνοντας υψηλότερη κακοήθεια. Αν και είναι διηθητικός όγκος, σπάνια παρατηρείται μετάσταση σε άλλα όργανα μέσω του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ή του αίματος. Ειδικότερα, το γλοιοβλάστωμα αποτελεί τον πιο συχνό κακοήθη όγκο του ΚΝΣ, καθώς αντιπροσωπεύει περίπου το 48% όλων των κακοήθων όγκων του εγκεφάλου και του ΚΝΣ. Η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα 65 έτη, με το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης μετά τη διάγνωση να μην υπερβαίνει το 6% (Wesseling and Capper 2018; McFaline-Figueroa and Lee 2018; A. C. Tan et al. 2020; Urbańska et al. 2014).

Δεδομένου ότι οι ασθενείς που πάσχουν από γλοιοβλάστωμα δεν εμφανίζουν έγκαιρα κλινικά συμπτώματα (πονοκέφαλο, αταξία, διαταραχές της όρασης, ζάλη), η διάγνωση της νόσου γίνεται όταν βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο. Η απεικόνιση με Μαγνητική Τομογραφία (MRI) αποτελεί τη πρωταρχική διαγνωστική μέθοδο που χρησιμοποιείται, η οποία ακολουθείται από την ιστοπαθολογική εξέταση, μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου ή βιοψία, με σκοπό να εξακριβωθεί ότι έγινε η σωστή διάγνωση. Οι όγκοι του γλοιοβλαστώματος μπορούν να ταξινομηθούν με κριτήριο την ύπαρξη η όχι μετάλλαξης στην IDH (Isocitrate Dehydrogenase) πρωτεΐνη, με βάση την ταξινόμηση των όγκων του ΚΝΣ που υπέδειξε ο WHO εν έτη 2016. Οι δύο, λοιπόν, βασικές διακριτές κατηγορίες όγκων γλοιοβλαστώματος είναι οι IDH-αγρίου τύπου (IDH-wild-type) και οι IDH-μεταλλαγμένοι (IDH-mutant). Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία αντιστοιχεί σε μεγάλο βαθμό με το κλινικά επονομαζόμενο πρωτοπαθές γλοιοβλάστωμα και χαρακτηρίζεται από de novo ανάπτυξη, χωρίς να έχει αποδειχθεί ότι προέρχεται από προγενέστερη διαφορετική βλάβη, πράγμα το οποίο παρατηρείται στους όγκους της IDH-mutant (δευτεροπαθές γλοιοβλάστωμα) κατηγορίας, οι οποίοι προέρχονται από τα χαμηλότερης κακοήθειας διηθητικά γλοιώματα, συγκεκριμένα από το διηθητικό (grade II) ή το αναπλαστικό (grade III) αστροκύττωμα. Επίσης οι ασθενείς με IDH-wild-type όγκο αποτελούν την πλειονότητα των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (90%) έναντι των IDH-mutant (10%), οι οποίοι διαγιγνώσκονται κατά μέσο όρο σε μικρότερη ηλικία και έχουν γενικά καλύτερη πρόγνωση από τους προαναφερθέντες. Εκτός από την μετάλλαξη στην IDH πρωτεΐνη, υπάρχουν μία σειρά από άλλες γενετικές και επιγενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο κατηγοριών, καθώς η IDH-wild-type διακρίνεται

από υψηλότερα ποσοστά υπερέκφρασης του EGFR, μεταλλάξεων στον υποκινητή του TERT, έλλειψης του PTEN, αλλά και μεθυλίωσης του υποκινητή της MGMT στο 30-50% των ασθενών αυτής της κατηγορίας, χαρακτηριστικό το οποίο συνδέεται με καλύτερη πρόγνωση. Οι IDH-mutant όγκοι γλοιοβλαστώματος χαρακτηρίζονται συχνά από μεταλλάξεις στα γονίδια ATRX και TP53. Επιπροσθέτως, οι όγκοι γλοιοβλαστώματος, για τους οποίους δεν επιτυγχάνεται διευκρίνιση για την ύπαρξη της IDH-μετάλλαξης κατατάσσονται στην κατηγορία NOS (not otherwise specified) **(Wesseling and Capper 2018; McFaline-Figueroa and Lee 2018; A. C. Tan et al. 2020; Louis et al. 2016).**

Η συνήθης θεραπεία του γλοιοβλαστώματος συμπεριλαμβάνει αρχικά τη χειρουργική εκτομή του όγκου, η οποία ακολουθείται από ακτινοθεραπεία 6 εβδομάδων με ταυτόχρονη χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου, Τεμοζολομίδη (temozolomide), του οποίου η χορήγηση μπορεί να συνεχίζεται ως χημειοθεραπεία συντήρησης για έξι ακόμα κύκλους. Η εφαρμογή της θεραπείας με πεδία-θεραπείας-όγκου (tumor-treating-fields, TTF) παράλληλα με τη χημειοθεραπεία συντήρησης με Τεμοζολομίδη έχει πάρει έγκριση από τον FDA, καθώς βελτιώνει την επιβίωση χωρίς-πρόοδο νόσου (progression free survival, PFS) συγκριτικά με τη χορήγηση μόνο Τεμοζολομίδης. Αναφορικά με την υποτροπή της νόσου, οι υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές δεν επηρεάζουν αισθητά την ολική επιβίωση των ασθενών. Συνοπτικά, οι θεραπευτικές επιλογές είναι οι εξείς: επανεκτομή του όγκου, ακτινοθεραπεία, χορήγηση Iomustine (χημειοθεραπευτικό φάρμακο) ή bevasizumab (αντι-αγγειογενετικός παράγοντας), συνδυαστικές θεραπείες, ή μόνο υποστηρικτική θεραπεία **(A. C. Tan et al. 2020).**

Τέλος, παρά τη πληθώρα των υπάρχόντων θεραπευτικών επιλογών για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος, το διάστημα ολικής επιβίωσης των ασθενών δε φαίνεται να βελτιώνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Οπότε αποτελεί επιτακτική ανάγκη η περαιτέρω έρευνα για εισαγωγή στη κλινική πρακτική διαγνωστικών, προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση της νόσου, την καλύτερη κατηγοριοποίηση των ασθενών, και την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας. Εκτός αυτού, σημαντική για την έκβαση της νόσου είναι η εισαγωγή στη κλινική πρακτική νέων καινοτόμων θεραπευτικών επιλογών, όπως η ανοσοθεραπεία και οι βασιζόμενες στην ιατρική ακριβείας θεραπείες, πολλές από τις οποίες βρίσκονται σε κλινικό στάδιο ακόμα, έχοντας βέβαια σημαντικές μελλοντικές προοπτικές **(Rajaratnam et al. 2020; Silantyev et al. 2019; A. C. Tan et al. 2020).**

1.3.2 Συσχέτιση του HCMV με το γλοιοβλάστωμα

Εν έτη 2002 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά η παρουσία του HCMV σε ιστούς γλοιομάτων, συμπεριλαμβανομένου και του γλοιοβλαστώματος. Έκτοτε, πολλές διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν επιβεβαιώσει την αρχική αυτή ένδειξη συσχέτισης του HCMV με τους όγκους γλοιομάτων ανιχνεύοντας γενετικό υλικό και πρωτεΐνες του ιού σε αυτά. Αντίθετα, σε ένα ποσοστό μελετών δεν ανιχνεύθηκε ο εν λόγω ιός στους ιστούς γλοιομάτων που ελέγχθηκαν, πράγμα το οποίο ενδέχεται να οφείλεται στις χαμηλής ευαισθησίας μεθόδους ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκαν. Ακόμα κι αν η συσχέτιση του HCMV με τα γλοιώματα και ειδικότερα με το γλοιοβλάστωμα είναι αμφιλεγόμενη από μια μερίδα επιστημόνων, κατά γενική ομολογία υποστηρίζεται η παρουσία γενετικών αλληλουχιών και πρωτεϊνών του HCMV στις περισσότερες, αν όχι σε όλες, τις περιπτώσεις των γλοιομάτων. Επιπλέον, υπάρχουν ισχυρά δεδομένα που εμπλέκουν τον HCMV με την εξέλιξη της νόσου του γλοιοβλαστώματος, για αυτό άλλωστε σημαντικές ερευνητικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη με σκοπό την αντιμετώπιση των HCMV (+) γλοιοβλαστωμάτων μέσω στόχευσης του HCMV, είτε με αντι-ιικά φάρμακα είτε με ανοσοθεραπεία που έχει ως στόχο τον ιό (**Foster, Ulasov, and Cobbs 2017; Dziurzynski et al. 2012**).

Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα πρωτεϊνών και γονιδίων του HCMV, που έχουν ανιχνευθεί μέχρι στιγμής σε δείγματα ιστών γλοιοβλαστώματος είναι οι IE1, US28, pp65, gB, HCMV IL-10, pp28 πρωτεΐνες, και τα IE1, gB γονίδια. Επιπλέον, δεδομένα που συσχετίζουν θετικά τον HCMV με το γλοιοβλάστωμα, είναι η μη ανίχνευση του ιού στους πέριξ του όγκου φυσιολογικούς ιστούς, αλλά και η ανίχνευση του από μία ερευνητική ομάδα στο περιφερικό αίμα των περισσότερων νεοδιαγνωσθέντων με γλοιοβλάστωμα ασθενών σε σχέση με τους control-συμμετέχοντες χωρίς τη νόσο (**McFaline-Figueroa and Lee 2018; Dziurzynski et al. 2012**). Εκτός αυτών, έχει παρατηρηθεί αυξημένο ποσοστό θετικότητας για τον HCMV σε ιστούς γλοιοβλαστώματος συγκριτικά με ιστούς χαμηλότερων βαθμών κακοήθειας γλοιομάτων (**Rahman et al. 2019**). Όμως, οι ασθενείς με όγκους γλοιομάτων, συμπεριλαμβανομένων και των γλοιοβλαστωμάτων, που είναι θετικοί στον HCMV, δε φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με εκείνους που είναι αρνητικοί στον HCMV (**Ding et al. 2014**). Βέβαια, έχει δειχθεί ότι ασθενείς με γλοιοβλάστωμα, που είχαν μικρότερο ποσοστό μόλυνσης των κυττάρων του όγκου τους, είχαν κατά 20 μήνες περισσότερο χρόνο μέσης επιβίωσης σε σχέση με εκείνους που είχαν υψηλό ποσοστό HCMV-μόλυνσης στους ιστούς, πράγμα το οποίο υποδεικνύει ότι το επίπεδο μόλυνσης με HCMV έχει προγνωστική αξία στην έκβαση της νόσου του γλοιοβλαστώματος (**Rahbar et al. 2013**).

Αναφορικά με το κύκλο ζωής του HCMV στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος, φαίνεται ότι δεν ακολουθεί ούτε την τυπική πορεία λυτικής μόλυνσης, αλλά ούτε παραμένει και στην τυπική λανθάνουσα φάση. Αυτό στηρίζεται αφενός στο γεγονός ότι δεν έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής η παραγωγή νέων ιοσωματίων από τα κύτταρα των ιστών των γλοιωμάτων, όπως τυπικά συμβαίνει κατά τη λυτική μόλυνση και αφετέρου στο γεγονός ότι ενώ δε συμβαίνει αυτό υπάρχει έκφραση των ΙΕ γονιδίων του HCMV, που τυπικά δε παρατηρείται στη λανθάνουσα φάση (**Dziurzynski et al. 2012**). Οπότε ίσως, ακολουθείται μία “ενδιάμεση” κατάσταση κατά την οποία υπάρχει μία πρόοδος στη χρονικά καθορισμένη έκφραση των γονιδίων του ιού, χωρίς να καταλήγει σε παραγωγή νέων ιοσωματίων ή ενδέχεται να παράγεται ορισμένος αριθμός αυτών χωρίς απαραίτητα να υπάρχει λύση του κυττάρου (persistent infection). Πάντως, τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος είναι δυνατό να μολυνθούν σε in vitro συνθήκες, και εκτός αυτού ορισμένες κυτταρικές σειρές όπως η U373MG έχουν την ικανότητα να οδηγούν σε παραγωγική μόλυνση, παράγοντας νέα ιοσωμάτια, (**McFaline-Figueroa and Wen 2017**). Μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος παρατηρείται διαφορετική πρόοδος του λυτικού κύκλου του ιού, για παράδειγμα στα A172 κύτταρα η πρόοδος της μόλυνση “διακόπτεται” στην ΙΕ φάση, ενώ στη περίπτωση των TP365MG και U251MG προχωράει μέχρι και την Ε και L φάση (**dos Santos et al. 2018**). Επιπλέον, χαρακτηριστική κυτταρική σειρά που προσομοιάζει τα χαρακτηριστικά επίμονης μόλυνσης του HCMV (persistent infection) είναι η LN-229 (**Singh and Neumann 2020**).

Αναφορικά με το ρόλο του HCMV στους όγκους των γλοιωμάτων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί ρυθμιστή του κακοήθη φαινοτύπου αυτών των όγκων, καθώς εμπλέκεται σε πολλούς κυτταρικούς μηχανισμούς, που σχετίζονται με τα επανομαζόμενα “Χαρακτηριστικά του Καρκίνου”, ευνοώντας με αυτόν τον τρόπο την πρόοδο της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, έχει δείχθει ότι ο HCMV προάγει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, καθώς η σταθερά εκφραζόμενη ΙΕ1-p72 πρωτεΐνη στην κυτταρική σειρά U87 γλοιοβλαστώματος οδήγησε σε επαγωγή του μονοπατιού PI3K/Akt μονοπατιού, και σε καταστολή της ενεργότητας των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών p53 και Rb, που αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, η ενεργοποίηση της τελομεράσης μετά από μόλυνση κακοήθων κυτταρικών σειρών γλοιωμάτων με HCMV, καθιστά τον ιό ως πιθανά εμπλεκόμενο παράγοντα στην αθανάτοποίηση των κυττάρων, προάγοντας έτσι την κακοήθεια του όγκου. Επιπλέον, ο HCMV εμπλέκεται και στις διαδικασίες διήθησης και μετάστασης των γλοιωμάτων, καθώς προάγει τη κυτταρική μετανάστευση και διήθηση κυττάρων

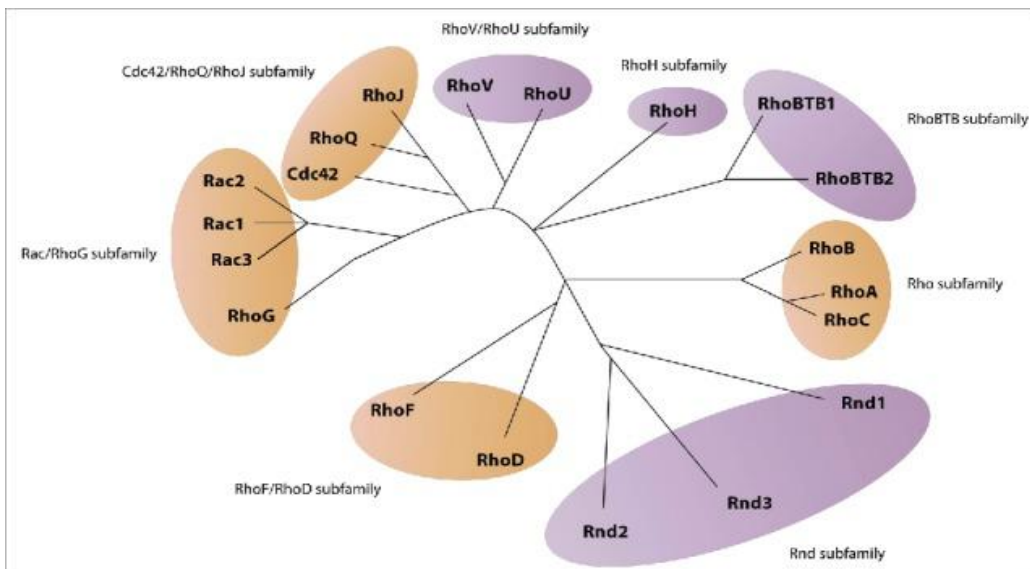
γλοιώματος μέσω της φωσφορυλίωσης της FAK κινάσης. Ακόμα, η US28 πρωτεΐνη του HCMV, έχει προταθεί ως παράγοντας που προκαλεί αγγειογένεση σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος μέσω της αύξησης της έκφρασης του VEGF. Επιπροσθέτως, η υπερέκφραση της ATF-5 από τον HCMV σε μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, οδηγεί σε αποφυγή της απόπτωσης. Η ικανότητα του όγκου του γλοιοβλαστώματος να διαφεύγει του ανοσολογικού ελέγχου ενισχύεται με την παρουσία του HCMV, με σημαντικό ρόλο να έχουν και κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, όπως τα σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα (tumor associated macrophages, TAMs) και τα μικρογλοιακά κύτταρα (microglia). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο HCMV εμπλέκεται στην ανάπτυξη και τη διατήρηση του φαινοτύπου των βλαστικών κυττάρων του γλοιοβλαστώματος (glioblastoma stem cells, GSCs), τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη του όγκου, λόγω της πολυδυναμικότητάς τους και εμφανίζουν αντίσταση στην ακτινοθεραπεία και στη χημειοθεραπεία με Τεμοζολομίδη (**Dziurzynski et al. 2012; Rahman et al. 2019; Ferguson et al. 2016; Joseph et al. 2017; Soroceanu and Cobbs 2011; Soroceanu et al. 2015; Fornara et al. 2016; Liu et al. 2017**).

Η παρουσία του HCMV στους όγκους γλοιοβλαστώματος, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό “όπλο” στην αντιμετώπιση γενικότερα του γλοιοβλαστώματος, χρησιμοποιώντας ως θεραπευτικά μέσα αντι-ϊικά φάρμακα ή νέες καινοτόμες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις, που έχουν ως ανοσοθεραπευτικό στόχο τον ίδιο τον ιό, με συνέπεια την καταστροφή εν τέλει και του ίδιου του όγκου. Σχετικά με το αντι-HCMV φάρμακο VGCV (Valganciclovir), βελτίωσε τη μέση ολική επιβίωση των ασθενών με νέο-διαγνωσθέν γλοιοβλάστωμα, που έλαβαν το εν λόγω φάρμακο μετά τη κλασική θεραπεία σε σχέση με εκείνους που δεν το έλαβαν (control), ακόμα και στη περίπτωση μη-μεθυλιωμένου MGMT υποκινητή, που η ανταπόκριση στη κλασική θεραπεία είναι γενικά φτωχή (**Stragliotto et al. 2020**). Η έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών του HCMV στους όγκους γλοιοβλαστώματος τις καθιστά πιθανούς στόχους ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος μέσω μίας αντι-HCMV στόχευσης. Αν και μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ανοσοθεραπείες έναντι του HCMV στη κλινική πρακτική, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός προ-κλινικών και κλινικών μελετών, που βασίζονται κυρίως σε στρατηγικές θετής μεταφοράς αυτόλογων CMV-ειδικών T-κυττάρων (Adoptive transfer of autologous CMV-specific T-cells) και θεραπευτικών εμβολίων δενδριτικών κυττάρων παλμικά επιφορτισμένων με κάποιο HCMV-αντιγόνο (π.χ. mRNA pp65) (**Ferguson et al. 2016; Rahman et al. 2019**).

1.4 Rho GTPάσες

1.4.1 Γενικές πληροφορίες

Η οικογένεια των Rho GTPασών ανήκει στην Ras υπεροικογένεια. Οι Rho GTPάσες είναι συντηρημένες σχεδόν σε όλους τους Ευκαρυώτες. Συμμετέχουν σε πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών, όπως στην οργάνωση την ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στη μεταφορά μέσω κυστιδίων, στη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στη μορφογένεση, στη πολικότητα και στη μετανάστευση των κυττάρων. Επιπρόσθετα, έχουν σημαντικό ρόλο σε παθολογικές διαδικασίες, όπως στη πρόοδο του καρκίνου, στη φλεγμονή και στην επιδιόρθωση τραυμάτων (Haga and Ridley 2016).

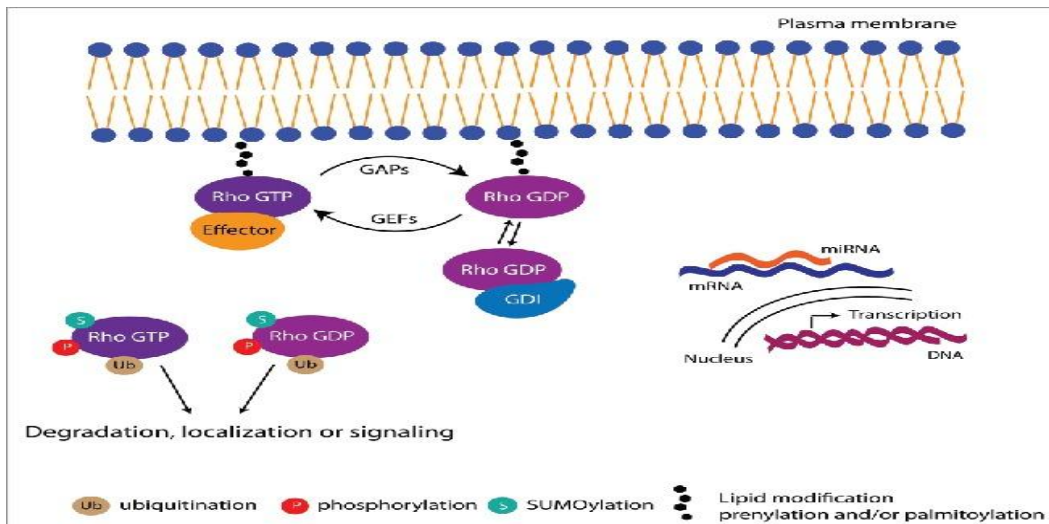


Εικόνα 3. Η οικογένεια των Rho GTPασών. Η οικογένεια των Rho GTPασών αποτελείται από 20 γονίδια στους ανθρώπους. Η οικογένεια υποδιαιρείται σε 8 υποοικογένειες: Rac/RhoG, Rho, Cdc42/RhoQ/RhoJ, RhoF/RhoD, Rnd, RhoBTB, RhoH και RhoU/RhoV. Αυτές οι υποοικογένειες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως τυπικές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

Οι Rho GTPάσες μπορούν να ενεργοποιηθούν μετά από εξωκυττάρια σήματα από μία πληθώρα μεμβρανικών υποδοχέων, όπως αυτούς των κυτοκινών, των κινασών τυροσίνης, των συζευγμένων με G-πρωτεΐνες, καθώς και από σηματοδοτήσεις διαμεσολαβούμενες από ιντεγκρίνες και καντερίνες. Η ενεργοποίησή τους οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση τους, οδηγώντας σε ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω της πρόσδεσης τους με τους καθοδικούς παράγοντες στόχους, που συμπεριλαμβάνουν άμεσους ρυθμιστές της οργάνωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού (π.χ. mDia), κινάσες (π.χ. ROCK, PAKs) και

πρωτεΐνες προσαρμογείς (adaptor proteins) (**Haga and Ridley 2016; Bustelo 2018; Hodge and Ridley 2016**).

Η ανθρώπινη οικογένεια των Rho GTPασών αποτελείται από 20 πρωτεΐνες, διαχωρισμένες σε 8 υποοικογένειες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε τυπικές και άτυπες, ανάλογα με τον τρόπο ρύθμισης τους (Εικόνα 3). Οι υποοικογένειες Rac, Rho, Cdc42 και RhoF/RhoD συμπεριλαμβάνονται στις τυπικές, επειδή λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, καθώς εναλλάσσονται από την ενεργή μορφή (πρόσδεση με GTP) στην ανενεργή μορφή (πρόσδεση με GDP). Η αναλογία μεταξύ των δυο αυτών μορφών ρυθμίζεται από τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), τις πρωτεΐνες ενεργοποίησης GTPασών (GTPase-activating proteins, GAPs) και τους αναστολείς αποσύνδεσης νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs) (Εικόνα 4). Οι άτυπες Rho GTPάσες είναι προσδεμένες κυρίως με GTP, χωρίς να υπάρχουν στοιχεία για τη ρύθμιση τους από GEFs ή GAPs. Οι GEFs ενεργοποιούν τις GTPάσες, επιταχύνοντας την απελευθέρωση του προσδεμένου GDP, αντικαθιστώντας το με GTP, ενώ οι GAPs είναι αρνητικοί ρυθμιστές των GTPασών, αφού επιτελούν την υδρόλυση του προσδεμένου GTP σε αυτές, που οδηγεί στην απενεργοποίησή τους (**Haga and Ridley 2016**). Οι Rho GTPάσες ενεργοποιούνται και σηματοδοτούν κυτταρικά μονοπάτια, συνδεόμενες με τη φωσφολιπιδική κυτταρική μεμβράνη, μετά από μετα-μεταφραστικές λιπιδικές τροποποιήσεις (πρενυλίωση). Ο κύριος ρόλος των GDIs είναι η απενεργοποίηση των Rho GTPασών, μέσω υδροφοβικής σύνδεσης τους με τη πρενυλο-ομάδα τους, αλλά και στις δομές switch I/II των Rho, εμποδίζοντας έτσι την ανταλλαγή GDP/GTP. Έτσι, οι Rho GTPάσες απομακρύνονται από τη μεμβράνη, παραμένοντας προσδεμένες με τους GDIs και συνάμα ανενεργές στο κυτταρόπλασμα. Όταν υπάρξει σηματοδότηση ενεργοποίησης, οι GDIs απελευθερώνουν τις Rho, με τις τελευταίες να συνδέονται στη κυτταρική μεμβράνη για ενεργοποίηση από τους GEFs. Εκτός από την παραπάνω λειτουργία, η σύνδεση των GDIs με τις Rho, προστατεύει τις τελευταίες από την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα (**Fortin Ensign et al. 2013; Jung et al. 2020**).



Εικόνα 4. Ρύθμιση των Rho GTPασών (Haga and Ridley 2016)[50].

Εκτός από τους παραπάνω κύριους ρυθμιστές των Rho, οι εν λόγω GTPάσες ρυθμίζονται μεταγραφικά, μετα-μεταγραφικά (miRNA), αλλά και με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (λιπιδικές τροποποιήσεις, φωσφορυλιώσεις, ουβικουτινιλιώσεις και σουμοϋλιώσεις), οι οποίες τροποποιούν την ενδοκυτταρική τους θέση, την σταθερότητα τους, αλλά και την ικανότητα σηματοδότησης των καθοδικών τελεστών τους (downstream effectors) (Εικόνα 4) (Haga and Ridley 2016).

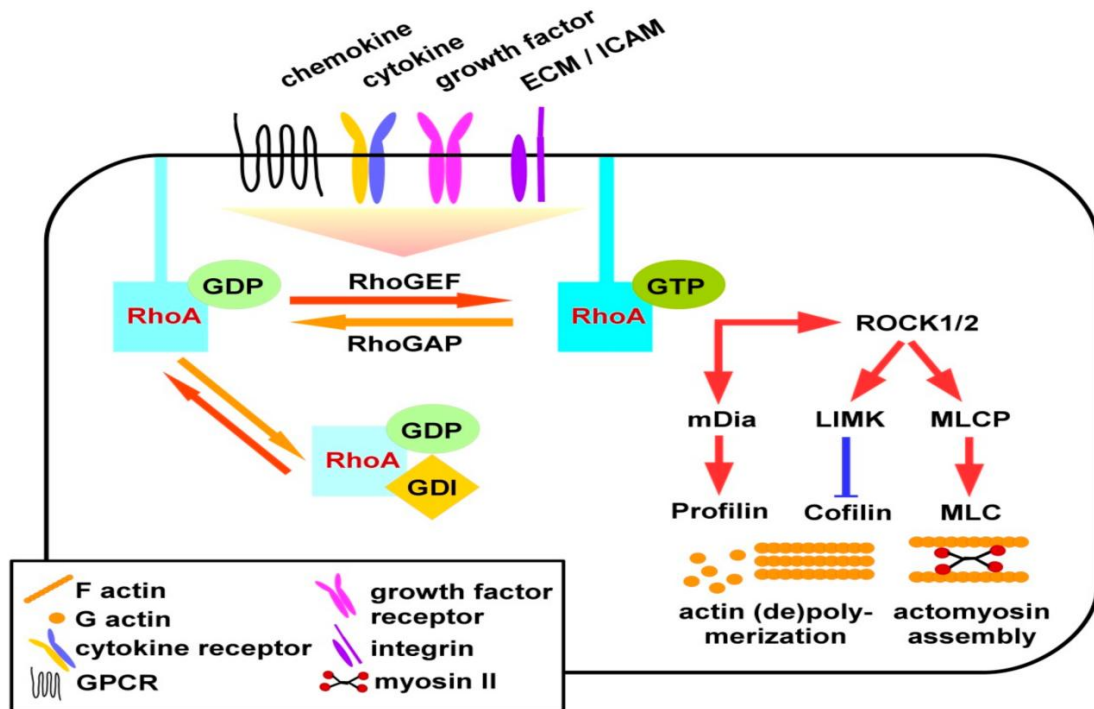
1.4.2 RhoA GTPάση

Η RhoA GTPάση ανήκει στην υποοικογένεια των Rho GTPασών, και κατά συνέπεια στην κατηγορία των τυπικών Rho GTPασών. Έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως στη ρύθμιση του σχηματισμού των ινών τάσης (stress fibers) και των εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions), στην εμπλοκή στη κυτταροκίνηση, στη μεταγραφή, στη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στη μεταφορά μέσω κυστιδίων, στην αξονογένεση, στον χειμειοτακτικισμό, ακόμα και στη μετανάστευση, στη πολικότητα και στη προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων (cell-cell adhesion). Οι περισσότερες από αυτές τις διαδικασίες επηρεάζονται από τη RhoA GTPάση, λόγω της ικανότητας της να ρυθμίζει την οργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού (Thumkeo, Watanabe, and Narumiya 2013). Επίσης, συχνή είναι η απορύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας της συγκεκριμένης GTPάσης στον καρκίνο, με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών που προάγουν την ογκογένεση (κυτταρικός μετασχηματισμός, διήθηση, μετάσταση), αν και πρόσφατα δεδομένα έχουν αναδείξει τον πιθανό ογκοκατασταλτικό της ρόλο σε συγκεκριμένους τύπους όγκων υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Orgaz, Herraiz, and Sanz-Moreno 2014; Bustelo 2018).

Η ενεργότητα της RhoA ρυθμίζεται όπως και των υπόλοιπων τυπικών Rho GTPασών, μέσω GEFs, GAPs και GDIs, καθώς και σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο (Ενότητα 1.4.1), οδηγώντας σε κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια διαμόρφωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού, με σκοπό την επιτέλεση σημαντικών κυτταρικών διεργασιών όπως το σχηματισμό των ινών τάσης (stress fibers) και των εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions).

Η σηματοδότηση της RhoA (Εικόνα 5) ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσης εξωκυτταρικών πρωτεϊνών συνδετήρων (ligands) σε κατάλληλους υποδοχείς, όπως χημειοκινών σε υποδοχείς συνδεδεμένους με G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors, GPCR), κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, παραγόντων του εξωκυττάρου στρώματος (extracellular matrix, ECM) και μορίων διακυτταρικής προσκόλλησης (Intercellular Adhesion Molecules, ICAMs) σε ιντεγκρίνες. Εκτός από την εμπλοκή υποδοχέα, οι τρεις κατηγορίες ρυθμιστικών παραγόντων της RhoA GTPάσης, GEFs, GAPs, GDIs, μπορούν να ενεργοποιηθούν και μέσω ενδοκυτταρικών αλληλεπιδράσεων. Μετά την ενεργοποίηση της RhoA, από τον κατάλληλο GEF, αλληλεπιδρά με καθοδικούς τελεστές όπως ο ROCK 1 (Rho-associated protein kinase 1) και ο ROCK2, οι οποίοι αποτελούν κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Με την ενεργοποίησή τους, ενεργοποιούν μέσω φωσφορυλίωσης την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης II (myosin II light chain, MLC), και συνάμα καταστέλλουν τη δράση της φωσφατάσης (MLCP) της MLC, φωσφορυλιώνοντας το σημείο πρόσδεσης της στη μυοσίνη, με αποτέλεσμα την αποφυγή της αποφωσφορυλίωσης (απενεργοποίησης) της MLC. Η ενεργή MLC μεσολαβεί στη συναρμολόγηση της ακτινο-μυοσίνης, με σκοπό την επαγωγή των ινών τάσης (stress fibers) και των εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions). Η ενεργοποιημένη RhoA, μέσω των ROCK, ενεργοποιεί την κινάση με περιοχή LIM (LIM domain kinase, LIMK), μέσω φωσφορυλίωσης της, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και καταστέλλει την ενεργότητα της κοφιλίνης. Η μη-φωσφορυλιωμένη (ενεργή) κοφιλίνη προάγει τον από-πολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης (F-actin), ενώ η φωσφορυλιωμένη (ανενεργή) οδηγεί στον πολυμερισμό τους. Επιπλέον, το μονοπάτι RhoA/ROCK ρυθμίζει τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθώς και τη γονιδιακή έκφραση, είτε μεσολαβώντας στο πυρηνικό εντοπισμό μεταγραφικών παραγόντων, είτε ρυθμίζοντας άμεσα την ενεργότητα μεταγραφικών ενεργοποιητών μέσω φωσφορυλίωσης τους. Εκτός από την ενεργοποίηση των ROCK, καθοδικά της RhoA ενεργοποιείται και η φορμίνη mDia1 (mammalian diaphanous-related formin 1),

η οποία με τη σειρά της προσδένεται στη πρωτεΐνη προφιλίνη, που επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης (Bros et al. 2019).



Εικόνα 5. Η σηματοδότηση της RhoA. Η σύνδεση εξωγενών πρωτεϊνών συνδετήρων με διαφορετικούς τύπους υποδοχών, καθώς και ενδοκυτταρικές διεργασίες δίνουν το έναυσμα για την ενεργοποίηση του GEF της RhoA, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με τη μεμβρανικά συνδεδεμένη RhoA, ενεργοποιώντας την αλλαγή του GDP σε GTP. Οι GAPs, μέσω υδρόλυσης του GTP της RhoA, οδηγούν σε απενεργοποίηση της. Οι GDIs μετακινούν τη RhoA από τη μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, διατηρώντας τη σε ανενεργή μορφή. Η RhoA, στην ενεργή της μορφή, συμμετέχει στη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Μέσω του ROCK/LIMK μονοπατιού, ρυθμίζει αρνητικά την κοφιλίνη (cofilin), οδηγώντας σε πολυμερισμό της ακτίνης. Επιπλέον, μέσω του ROCK μονοπατιού καταστέλλεται η MLCP και ενεργοποιείται η MLC, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ακτινο-μυοσίνης. Τέλος, η ενεργοποιημένη RhoA, ενεργοποιεί την mDia, η οποία ακολούθως ενεργοποιεί την προφιλίνη (profilin), που συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της ακτίνης (Bros et al. 2019).

1.4.3 RhoA και καρκίνος

Έχει δειχθεί ότι η RhoA εμπλέκεται σχεδόν σε όλα τα στάδια προόδου της καρκινογένεσης, συμμετέχοντας στο κυτταρικό μετασχηματισμό των φυσιολογικών κυττάρων, στη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην αγγειογένεση, και φυσικά στις διαδικασίες της διήθησης και της μετάστασης. Έχει βρεθεί επίσης ότι υπερεκφράζεται σε πληθώρα κακοήθων νεοπλασιών, όπως των όρχεων, του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και πολλών άλλων (Orgaz, Herraiz, and Sanz-Moreno 2014). Βέβαια, η απορύθμιση της RhoA στον καρκίνο μπορεί να επέλθει και μέσω της απορύθμισης των άμεσων ρυθμιστών της GEFs, GAPs, και GDIs. Κατά γενική ομολογία, οι GEFs αποτελούν μόρια που

προάγουν τη καρκινογένεση, καθώς παρατηρείται αυξημένη έκφραση τους στους όγκους, προκαλώντας υπερ-ενεργοποίηση των Rho. Αντίθετα, οι αρνητικοί ρυθμιστές των Rho, οι GAPs, έχουν γενικώς ογκοκατασταλτικό ρόλο, καθώς είναι συχνή η υπο-έκφραση τους στους όγκους. Αναφορικά με τους GDIs, δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος τους, καθώς έχουν βρεθεί είτε να υπερεκφράζονται, είτε να υποεκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους όγκων (**Jung et al. 2020; Porter, Papaioannou, and Malliri 2016**). Επιπροσθέτως, η RhoA μπορεί να απορυθμιστεί και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (π.χ. ουβικουτινιλίωση), αλλά και με μεταλλάξεις του γονιδίου της, πράγμα το οποίο θεωρούνταν πολύ σπάνιο φαινόμενο μέχρι πρότινος (**Porter, Papaioannou, and Malliri 2016**). Πρόσφατα, λόγω των σύγχρονων τεχνικών γονιδιωματικής αλληλούχησης έχουν ανακαλυφθεί αρκετές σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της RhoA, ορισμένες από τις οποίες ενισχύουν τη λειτουργία της RhoA (gain of function mutations), ενώ κάποιες άλλες αποτελούν μεταλλάξεις απώλειας-λειτουργίας (loss of function mutations) ή επικρατείς αρνητικές (dominant negative mutations). Αν και οι μεταλλάξεις ενίσχυσης λειτουργίας της RhoA είναι παρούσες σε ορισμένες περιπτώσεις όγκων, φαίνεται να μην είναι ικανές από μόνες τους να οδηγήσουν σε μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά, πράγμα το οποίο έχει οδηγήσει στη μη θεώρηση της RhoA ως ογκογονίδιο (π.χ. Ras) με τη κλασική έννοια του όρου. Αναφορικά με τις μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την επικρατή-αρνητική μετάλλαξη G17V, η ύπαρξη της οποίας οδηγεί σε ανικανότητα δέσμευσης νουκλεοτιδίου (GTP/GDP) από τη RhoA, προσάπτουν και έναν πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο στην εν λόγω GTPάση στις περιπτώσεις όγκων, όπου βρίσκονται, πράγμα το οποίο αντιτίθεται στη γενική κατηγοριοποίηση των Rho, και συνάμα της RhoA, σε παράγοντες που προάγουν το κακόηθη φαινότυπο του καρκίνου (**Jung et al. 2020; Bustelo 2018**).

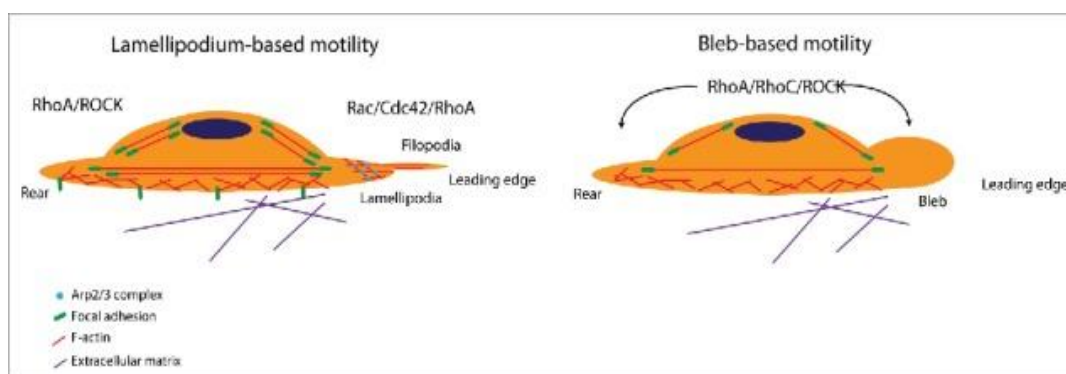
Η RhoA έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στα στάδια της διήθησης και της μετάστασης κατά τη καρκινογένεση, λόγω της εμπλοκής της σε μεγάλο βαθμό στη ρύθμιση της κίνησης των κυττάρων, μέσω της οργάνωσης της ακτίνης του κυτταροσκελετού, με τη συν-εμπλοκή βέβαια και άλλων Rho GTPασών, της Rac1 και της Cdc42 (**Chi et al. 2013; Haga and Ridley 2016**).

Έχει αποδειχθεί ότι η RhoA εμπλέκεται και στους δύο υπάρχοντες τύπους κυτταρικής μετανάστευσης, τόσο στην μετανάστευση με ελασματοπόδια (lamellipodium based motility), όσο και σε αυτή μέσω προεξοχών (bleb based motility) (Εικόνα 6). Γενικά, η κυτταρική μετανάστευση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία, κατά την οποία, αρχικά εκτεταμένες μεμβρανικές προεκβολές (ελασματοπόδια, φιλοπόδια και/ή μεμβρανικές προεξοχές) στο πρόσθιο μέρος του κυττάρου, σχηματίζουν νέες προσκολλήσεις

(adhesions), ενώ σε δεύτερο χρόνο μετά από συστολή του σώματος του κυττάρου επέρχεται αποσύνδεση του πίσω μέρους του **(Haga and Ridley 2016)**.

Αναφορικά με τη μετανάστευση με ελασματοπόδια (μεσεγχυματικού τύπου) (Εικόνα 6, αριστερά), σχηματίζονται στο πρόσθιο άκρο του κυττάρου ελασματοπόδια και φιλοπόδια, μέσω εμπυρήνωσης και πολυμερισμού της ακτίνης, πράγμα το οποίο επιτελείται από το σύμπλοκο Arp2/3, που ενεργοποιείται από τις Rho GTPάσες Rac και Cdc42. Ο πολυμερισμός της ακτίνης μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί από τον καθοδικό στόχο της RhoA, τη φορμίνη mDia. Επιπροσθέτως, στο πρόσθιο άκρο σχηματίζονται, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RhoA/ROCK εστιακές προσκολλήσεις μέσω ιντεγκρινών (integrin-based focal adhesions), οι οποίες σταθεροποιούν τα ελασματοπόδια και συμβάλουν στην επικοινωνία του κυττάρου με το εξωκυττάριο στρώμα. Στο οπίσθιο άκρο του κυττάρου, σημαντικό ρόλο έχει ξανά το σηματοδοτικό μονοπάτι RhoA/ROCK, αφού είναι υπεύθυνο για τη συσταλτικότητα μέσω ακτινο-μυοσίνης και την επακόλουθη αποκόλληση του κυττάρου **(Haga and Ridley 2016)**.

Σχετικά με το δεύτερο τύπο μετανάστευσης, τη μετανάστευση μέσω προεξοχών (αμοιβαδοειδή τύπου) (Εικόνα 6, δεξιά), η συσταλτικότητα μέσω ακτινο-μυοσίνης που οφείλεται στην ενεργοποίηση του ROCK από την RhoA, οδηγεί στην επιμήκυνση των προεξοχών, που αποτελούν προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης, που προκαλούνται από τη συστολή της ακτινο-μυοσίνης του κυτταρικού φλοιού. Στο συγκεκριμένο τύπο μετανάστευσης, δεν εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό οι προσκολλήσεις μέσω ιντεγκρινών, συγκριτικά με τη μετανάστευση με ελασματοπόδια **(Haga and Ridley 2016)**.



Εικόνα 6. Ο ρόλος των Rho GTPασών στη κυτταρική μετανάστευση. Παρουσιάζονται οι δύο τύποι μετανάστευσης: μετανάστευση με ελασματοπόδια (αριστερά) και μετανάστευση με προεξοχές (δεξιά) **(Haga and Ridley 2016)**.

Επιπλέον, η RhoA συμμετέχει και στη διαδικασία της διήθησης των καρκινικών κυττάρων μέσω του σχηματισμού ποδιών διήθησης (invadopodia), τα οποία

αποτελούν μεμβρανικές προεκβολές πλούσιες σε νημάτια ακτίνης (F-actin), μέσω των οποίων επιτελείται η διάτρηση της βασικής μεμβράνης, η αποσύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας, και εν συνεχεία της βασικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ώστε να καταλήξουν εν τέλει τα κακοήγη κύτταρα στη κυκλοφορία του αίματος. Αν και ο αρχικός σχηματισμός των ποδιών διήθησης επιτελείται από τη Cdc42 GTPάση, η RhoA σε συνδυασμό με τη Cdc42 έχει σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα ωρίμανση αυτών **(Beaty and Condeelis 2014)**.

Δεδομένης, λοιπόν, της εμπλοκής των Rho GTPασιών στην πρόοδο του καρκίνου, βρίσκονται σε εξέλιξη αρκετές ερευνητικές προσπάθειες σχετικά με την ανεύρεση στοχευμένων θεραπειών, με σκοπό τη παρεμπόδιση των σηματοδοτικών τους μονοπατιών μέσω διαφορετικών στρατηγικών, που βρίσκονται σε προ-κλινική και κλινική φάση. Μία από αυτές είναι η αναστολή της πρενυλίωσης που επιδέχονται οι Rho για να συνδεθούν με την κυτταρική μεμβράνη, και κατά συνέπεια να μπορούν να είναι λειτουργικές. Αν και έχουν προταθεί τόσο αναστολείς των ενζύμων (τρανσφερασών) που προσθέτουν τις πρενυλο-ομάδες (γερανυλο-γερανύλιο και φαρνέσυλο) στις Rho, όσο και οι στατίνες, αναστέλλοντας την παραγωγή πρενυλιωμένων πρωτεϊνών, φαίνεται ότι οι στρατηγικές αναστολής της πρενυλίωσης εμφανίζουν χαμηλή εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων Rho-στόχων. Όμως περισσότερες προοπτικές έχουν οι αναστολείς που αφορούν την αλληλεπίδραση των GEFs με τις Rho, καθώς και η άμεση στόχευση των καθοδικών τελεστών των Rho. Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με τη RhoA, ο παράγοντας RhoGin έχει σχεδιαστεί να συνδέεται στη RhoA, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση της με μία πληθώρα Rho-GEFs, όπως LARG, Dbp, p115-Rho GEF, και PDZ-Rho GEF. Ακόμα, ο παράγοντας Y16 συνδέεται στον LARG, αναστέλλοντας τη δράση του ως RhoA-GEF. Επίσης, αν και έχουν ανακαλυφθεί πολλοί αναστολείς του καθοδικού ρυθμιστή ROCK (καθοδικός τελεστής της RhoA) με αντι-καρκινική δράση, μόνο ο AT13148 έχει ενσωματωθεί σε μελέτες κλινικής φάσης μέχρι στιγμής. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς προσδένονται στη περιοχή πρόσδεσης-ATP του ROCK αναστέλλοντας τη ενεργότητα του ως κινάση σερίνης-θρεονίνης **(Cardama et al. 2017; Jung et al. 2020; Zandvakili et al. 2017)**.

Παρόλο που υπάρχει μία πρόοδος στην ανάδειξη αναστολέων των σηματοδοτικών μονοπατιών της RhoA, αποτελεί σημαντική προτεραιότητα η περαιτέρω έρευνα γύρω από τον ρόλο που έχει σε επίπεδο οργανισμού, ώστε να γίνει περισσότερο ξεκάθαρος ο ρόλος της σε διαφορετικούς τύπους όγκων, καθώς η πρόσφατη ανάδειξη των μεταλλάξεων απώλειας-λειτουργίας (loss of function) της σε διάφορους όγκους, έχει αναδείξει τον πιθανό ογκοκατασταλτικό της ρόλο, πράγμα το οποίο

πρέπει να ληφθεί υπόψη και στο επίπεδο της στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης που πρέπει να ακολουθηθεί. Εκτός αυτού, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν της Rho παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στην ακτινοθεραπεία και στη χημειοθεραπεία, πράγμα το οποίο μπορεί να αποφευχθεί μέσω συνδυασμού της θεραπείας αναστολής τους με άλλες αντικαρκινικές θεραπείες (**Zandvakili et al. 2017; Bustelo 2018**).

1.4.4 RhoA και γλοιοβλάστωμα

Οι Rho GTPάσες εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή διηθητική ικανότητα που διακατέχει τους όγκους των γλοιομάτων και ειδικότερα του γλοιοβλαστώματος. Τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος διηθούν τους πέριξ ιστούς κυρίως μέσω του μεσεγγυματικού τρόπου διήθησης και έχουν τη δυνατότητα να ακολουθήσουν πολλές διαφορετικές “διαδρομές” διήθησης, χωρίς να περιορίζονται μόνο στο παρέγχυμα του εγκεφάλου, αλλά έχοντας την ικανότητα να διηθούνται στο μεσολόβιο, στο περιαγγειακό και λεπτομηνιγγικό χώρο. Δεδομένης αυτής της πολυπλοκότητας, αλλά και της υψηλής δια-αλληλεπίδρασης (cross-talk) των δράσεων των Rho GTPασών, καθώς και τις δυσκολίες προσομοίωσης του μικροπεριβάλλοντος του όγκου του γλοιοβλαστώματος *in vitro*, δεν είναι ακόμα απολύτως ξεκάθαρος ο ακριβής ρόλος τους όσον αφορά τη συμμετοχή τους στη διηθητική ικανότητα του εν λόγω όγκου. Αν και πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την ανάδειξη του ρόλου των Rho στη διηθητική ικανότητα του γλοιοβλαστώματος, οι περισσότερες έχουν μελετήσει τη κυτταρική μετανάστευση (cell migration) σε *in vitro* δισδιάστατα (2-dimensional) μοντέλα κυτταροκαλλιιεργειών (**de Gooijer et al. 2018; Al-Koussa et al. 2020**).

Με βάση τις μέχρι τώρα υπάρχουσες μελέτες, είναι δύσκολο να παρθεί μία ξεκάθαρη θέση ως προς το ρόλο που έχει η RhoA GTPάση στη διηθητική ικανότητα των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, καθώς από τη μία πλευρά φαίνεται ότι η μειωμένη ενεργότητα της συσχετίζεται με αυξημένη κυτταρική μετανάστευση, ενώ από την άλλη φαίνεται ότι μέσω της κυτταρικής σηματοδότησης που επιτελεί εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες που ευνοούν τη διήθηση των κυττάρων. Δεδομένου ότι τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος ακολουθούν κυρίως μεσεγγυματικού τύπου μετανάστευση (μετανάστευση με ελασματοπόδια), η RhoA δεν έχει τόσο ενεργό ρόλο στη μετανάστευση, σε αντίθεση με τη περίπτωση του αμοιβαδοειδούς τρόπου μετανάστευσης, καθώς είναι υπεύθυνη για τη προσκόλληση των προεκβολών του πρόσθιου άκρου των κυττάρων μέσω του σχηματισμού εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions). Συνεπώς, η RhoA GTPάση ρυθμίζει τη προσκόλληση των ελασματοποδίων του πρόσθιου άκρου, για τα οποία είναι υπεύθυνη η Rac1 GTPάση.

Αν και οι δύο αυτές GTPάσες ενεργοποιούνται στο πρόσθιο άκρο, παρατηρείται μία χωροχρονική διαφορά στην ενεργοποίησή τους, και κάθε μία αναστέλλει την ενεργότητα της άλλης, με τη Rac1 να είναι υπεύθυνη για τη μετανάστευση του κυττάρου, ενώ η RhoA για τη προσκόλληση με την εξωκυττάρια ουσία (ECM). Σε πολλές λοιπόν μελέτες, έχει διαπιστωθεί η αυξημένη κυτταρική μετανάστευση μετά από σίγηση της RhoA ή του καθοδικού τελεστή της ROCK, καθώς και συσχέτιση της αυξημένης ενεργότητας της RhoA με τη στατικότητα των κυττάρων **(de Gooijer et al. 2018; Al-Koussa et al. 2020; Fortin Ensign et al. 2013; Khalil and El-Sibai 2012)**.

Σε αντίθεση με αυτές τις μελέτες, σε μία πρόσφατη μελέτη σε κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος (U373MG), παρατηρήθηκε ότι σε συνθήκες σίγησης της RhoA GTPάσης, υπήρξε μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης και έλλειψη της πολικότητας των κυττάρων κατά την ελεύθερη μετακίνηση τους (free movement). Εκτός αυτού, η σίγηση της RhoA, προκάλεσε τροποποίηση του σχήματος των κυττάρων σε επιμηκυμένα με λεπτές προεκβολές (protrusions) κύτταρα, αλλά και μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό **(Tseliou et al. 2016)**. Επίσης μία άλλη μελέτη χρησιμοποιώντας την ίδια κυτταρική σειρά, έδειξε ότι η σίγηση της RhoA είχε ως αποτέλεσμα τόσο το χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, όσο και το μειωμένο αριθμό αυτών που καταφέρνουν να διαιρεθούν επιτυχώς **(Al-Qahtani et al. 2020)**. Εκτός αυτού, σε άλλες μελέτες έχει δειχθεί ότι η σίγηση των καθοδικών τελεστών της RhoA, ROCK ή mDia αναστέλλει τη κυτταρική μετανάστευση κυττάρων γλοιωμάτων **(Khalil and El-Sibai 2012)**. Ακόμα, έχει δειχθεί ότι σε κύτταρα γλοιώματος η RhoA ρυθμίζει την έκφραση της MT1 διαμεμβρανικής μεταλλοπρωτεΐνωσης, πράγμα το οποίο υποδεικνύει την εμπλοκή της RhoA στη διαδικασία της διήθησης των γλοιωμάτων, καθώς οι μεταλλοπρωτεΐνάσες έχει αποδειχθεί ότι προάγουν τη διήθηση των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος και σε περίπτωση αναστολής της έκφρασης τους επηρεάζεται αρνητικά η διήθηση **(Al-Koussa et al. 2020)**.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η προτίμηση του υποστρώματος στη διαδικασία της διήθησης των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, είναι πολύ πιθανόν να επηρεάζεται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια της RhoA. Έχει δειχθεί ότι μετά από ορθοτοπική έγχυση κυττάρων γλοιοβλαστώματος και μετέπειτα μικροσκοπική παρατήρηση των εγκεφαλικών τομών, στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος που διηθούνται στο εγκεφαλικό παρέγχυμα υπάρχει μικρότερη ενεργότητα της RhoA σε σχέση με τις Rho GTPάσες Rac1 και Cdc42 συγκριτικά με αυτά που διηθούνται στη περιαγγειακή περιοχή, όπου ισχύει ακριβώς το αντίθετο **(Al-Koussa et al. 2020)**.

Βέβαια, για την πιο ολοκληρωμένη κατανόηση του ρόλου των Rho GTPασών, και γενικότερα άλλων παραγόντων, σχετικά με τη εμπλοκή τους στη διηθητική ικανότητα του γλοιοβλαστώματος, απαιτείται η χρησιμοποίηση μοντέλων μελέτης (in vitro 3D, ex vivo, in vivo) που προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο το πραγματικό περιβάλλον του όγκου, πέρα από το δισδιάστατο in vitro μοντέλο μελέτης κυτταρικής μετανάστευσης. Για παράδειγμα, η επιρροή της σύστασης και των βιοφυσικών ιδιοτήτων διαφορετικών εξωκυττάρων μητρών στη διηθητική ικανότητα, μπορεί να εκτιμηθεί πιο έγκυρα μέσω των in vitro 3D μοντέλων. Αντίθετα, η παρατήρηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ όγκου, εξωκυττάριας ουσίας, και στρώματος, απαιτεί τη χρήση ex vivo και in vivo μοντέλων, ώστε να διατηρείται η φυσιολογία του περιβάλλοντος του εγκεφάλου **(Al-Koussa et al. 2020)**.

1.4.5 Η σύνδεση του HCMV με τη RhoA GTPάση

Ο HCMV, είναι ο πιο καλά μελετημένος βήτα-Ερπητοϊός, σχετικά με την επίδραση του στη σηματοδότηση των Rho GTPασών, και ειδικότερα της RhoA GTPάσης. Ο ρόλος της RhoA κατά τη μόλυνση με HCMV έχει μελετηθεί κατά βάση σε κύτταρα ινοβλαστών. Όμως σε δύο πρόσφατες μελέτες ερευνήθηκε και ο ρόλος της συγκεκριμένης GTPάσης σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος **(Van den Broeke and Favoreel 2011; Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020)**.

Σε μία μελέτη μόλυνσης με HCMV ανθρώπινων εμβρυϊκών ινοβλαστών πνεύμονα (HEL, human embryonic lung), δείχθηκε ότι ο παράγοντας EGFR χρησιμεύει ως υποδοχέας του ιού και η ιντεγκρίνη τύπου alpha-vbeta-3 (avb3) ως συν-υποδοχέας. Κατά τη μόλυνση με HCMV, οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες gB και gH προσδένονται ανεξάρτητα στους παράγοντες EGFR και avb3 ιντεγκρίνη, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Ο υποδοχέας EGFR ενεργοποιεί τη κινάση PI3, ενώ η avb3 ιντεγκρίνη αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη Src. Με τη συντονισμένη δράση τους οδηγούν σε περαιτέρω καθοδική σηματοδότηση. Είναι αξιοσημείωτο ότι και τα δύο αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στα μειωμένα επίπεδα έκφρασης, τόσο της συνολικής όσο και της ενεργοποιημένης RhoA, κατόπιν μόλυνσης ινοβλαστών με HCMV. Η είσοδος του HCMV σχετίζεται, επίσης, με τα μειωμένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης κοφιλίνης, μίας πρωτεΐνης που βρίσκεται καθοδικά στο μονοπάτι της RhoA, οδηγώντας σε μία αρκετά μεγάλη μείωση του αριθμού των ινών τάσης (stress fibers). Τόσο η μειωμένη από τον HCMV ενεργότητα της RhoA, όσο και η αποσυναρμολόγηση των ινών τάσης, είναι σημαντικά για τη μεταφορά του HCMV προς τον πυρήνα **(Wang et al. 2005)**.

1.4.5.1 Ο ρόλος της RhoA σε μολυσμένους με HCMV ινοβλάστες

Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε μία πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας (**μη δημοσιευμένα αποτελέσματα**), αποδείχθηκε ότι η RhoA GTPάση έχει σημαντικό ρόλο στο λυτικό κύκλο ζωής του HCMV σε κύτταρα ινοβλαστών, τόσο κατά τα αρχικά, όσο και κατά τα τελικά στάδια της μόλυνσης. Ουσιαστικά, αποδείχθηκε ότι η σίγηση της RhoA, οδηγεί σε επιτάχυνση του κύκλου ζωής του HCMV.

Πρώτον, παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας της RhoA, κατά τη μόλυνση με HCMV, καθώς και μειωμένη ενεργότητα της RhoA σε κύτταρα που είχαν υποστεί σίγηση της RhoA, σε σχέση με αυτά που δεν είχαν, μετά από μόλυνση με HCMV. Επίσης, αυτή η μείωση στην ενεργότητα, αποδείχθηκε ότι επέρχεται μετά από έκφραση ιικών γονιδίων.

Επίσης, αποσιωπώντας τη RhoA, αυξάνεται η ιική πρωτεϊνική έκφραση, η παραγωγή νέων ιοσωματίων, καθώς και η ποσότητα του ιικού DNA στον πυρήνα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δείχνουν ότι η σίγηση της RhoA, διευκολύνοντας τη διέλευση του HCMV προς τον πυρήνα, κατέχει σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της λυτικής μόλυνσης από τον εν λόγω ιό.

Επιπλέον μετά από καταστολή, του καθοδικού παράγοντα στο μονοπάτι της RhoA, ROCK, αποσιωπημένων και μη ως προς τη RhoA κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι τα πρώτα είχαν αυξημένο ιικό DNA στον πυρήνα, καθώς και αυξημένη παραγωγή νέων ιοσωματίων. Αξιοσημείωτα, δεν υπήρξε διαφορά στη παραγωγή νέων ιοσωματίων μεταξύ των αποσιωπημένων μόνο ως προς τη RhoA ινοβλαστών και εκείνων που είχαν υποστεί μόνο καταστολή του ROCK. Αυτό μπορεί και να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η σίγηση της RhoA έχει ως συνέπεια τη μη ενεργοποίηση του καθοδικού στόχου ROCK, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αντίστοιχη επίδραση στην ιική μόλυνση με τη συνθήκη καταστολής απευθείας του ROCK, πράγμα το οποίο υποδεικνύει την πιθανή επίδραση της RhoA στην ιική μόλυνση μέσω της σηματοδότησης του καθοδικού τελεστή της ROCK.

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε επιτάχυνση της συναρμολόγησης της δομής του Assembly Complex και της μετακίνησης των ιοσωματίων προς την έξοδο από το κύτταρο, καταστροφή των ινιδίων ακτίνης μεταξύ του Assembly Complex και των περιοχών εξόδου των ιοσωματίων από το κύτταρο, καθώς και αυξημένη ποσότητα ιοσωματίων που κατευθύνονται προς την έξοδο, σε μολυσμένα κύτταρα ινοβλαστών που υπέστησαν σίγηση της RhoA, σε σχέση με εκείνα που δεν υπέστησαν. Αυτές οι ενδείξεις αποδεικνύουν, λοιπόν, το ρόλο της RhoA GTPάσης στα τελικά στάδια της λυτικής μόλυνσης από τον HCMV.

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη δείχθηκε ότι η RhoA, πέρα από την εμπλοκή της στην αναδιοργάνωση της ακτίνης του κυτταροσκελετού που περιγράφηκε παραπάνω, έχει αρνητικό ρόλο στην επαγόμενη από τον HCMV έκφραση της IL-11 (Interleukin-11) κατά τη λυτική μόλυνση ινοβλαστών, καθώς η σίγηση της RhoA οδήγησε σε περισσότερο αυξημένα επίπεδα μεταγράφων, όσο και πρωτεϊνών της IL-11, σε σχέση με τα μη σιγημένα μολυσμένα κύτταρα ινοβλαστών. Βέβαια, η βιολογική σημασία της επαγόμενης από τον HCMV έκφρασης της IL-11 δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα, και κατά συνέπεια ο ακριβής ρόλος της RhoA σε αυτή. Όμως, αποδεικνύεται με μεγαλύτερη σιγουριά η σημαντικότητα της συγκεκριμένης GTPάσης στο λυτικό κύκλο ζωής του HCMV, μέσω της εμπλοκής της και σε αυτή την επαγόμενη από τον HCMV κυτταρική διαδικασία (**Alarifi et al. 2020**).

1.4.5.2 Ο ρόλος της RhoA σε μολυσμένα με HCMV κύτταρα γλοιοβλαστώματος

Η RhoA, με βάση τα δημοσιευμένα αποτελέσματα δύο πρόσφατων μελετών, συσχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη μορφολογία μολυσμένων και μη με HCMV κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος (U373MG) (**Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020**). Αξιοσημείωτα, στη μία από αυτές εκτός από τη γονική κυτταρική σειρά U373MG, χρησιμοποιήθηκε και η παράγωγη αυτής, U373MG-IE1, που εκφράζει σταθερά την άμεσα-πρώιμα εκφραζόμενη πρωτεΐνη IE1 του HCMV (**Tseliou et al. 2016**), που όπως έχει προαναφερθεί έχει σημαντικό ρόλο στη πρόοδο του κύκλου ζωής του ιού.

Όσον αφορά τη μελέτη που συμπεριλάμβανε και τις δύο κυτταρικές σειρές, παρατηρήθηκε και στις δύο ότι σε συνθήκες σίγησης της RhoA και απουσία μόλυνσης από τον HCMV υπήρξε μείωση της μετανάστευσης και τροποποίηση του σχήματος τους σε μια επιμηκυμένη μορφή με λεπτές προεκβολές, σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί σίγηση (**Tseliou et al. 2016**). Επιπροσθέτως η σίγηση της RhoA, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των U373MG κυττάρων (**Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020**), καθώς και τον αριθμό εκείνων που διαιρούνταν επιτυχώς (**Al-Qahtani et al. 2020**). Ακόμα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μόλυνση με HCMV μη σιγημένων για τη RhoA κυττάρων δεν επηρέασε τις παραπάνω κυτταρικές διεργασίες (**Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020**).

Είναι σημαντικό να γίνει αναφορά στην επίδραση του HCMV στις παραπάνω κυτταρικές διαδικασίες σε συνθήκες σίγησης της RhoA. Όσον αφορά τη κυτταρική μορφολογία, και στις δύο σιγημένες κυτταρικές σειρές η μόλυνση από τον HCMV δεν επηρέασε ιδιαίτερα το σχήμα των κυττάρων που παρατηρήθηκε σε συνθήκες μη

μόλυνσης. Υπήρξε μόνο μία αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, λόγω τη κυτταροπαθητικής επίδρασης του ιού στα κύτταρα. Αναφορικά με τη διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης, υπήρξε διακριτή διαφορά μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών στην επίδραση που είχε ο HCMV στη μειωμένη κυτταρική μετανάστευση που διέκρινε και τις δύο κυτταρικές σειρές σε συνθήκες σίγησης της RhoA. Ενώ στη U373MG κυτταρική σειρά με τη παρουσία του HCMV φαίνεται να διατηρείται η μετανάστευση στα ίδια χαμηλά επίπεδα που είχαν προκληθεί μόνο από τη σίγηση της RhoA, στην U373MG-IE1 κυτταρική σειρά παρατηρείται αυξημένη κυτταρική μετανάστευση, φτάνοντας στα ίδια επίπεδα με αυτά που υπήρχαν σε συνθήκες μη σίγησης. Σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι μολυσμένες, σιγημένες κυτταρικές σειρές εμφάνισαν μία αύξηση στο κυτταρικό τους πολλαπλασιασμό, σε σχέση με τις μη μολυσμένες, σιγημένες ομόλογες τους, χωρίς όμως να φτάνουν τα επίπεδα κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συνθήκες μη σίγησης της RhoA (**Tseliou et al. 2016**). Βέβαια, σε μολυσμένα με HCMV U373MG κύτταρα, η σίγηση της RhoA έχει ως συνέπεια το μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους συγκριτικά με τα μη σιγημένα (**Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020**), με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική μόνο στη μία από τις δύο μελέτες (**Al-Qahtani et al. 2020**). Ακόμα, σε μολυσμένα με HCMV κύτταρα U373MG, η συνθήκη σίγησης της RhoA συνδέεται και με μειωμένο αριθμό κυττάρων που ολοκληρώνουν επιτυχώς τη μίτωση συγκριτικά με τα μη-σιγημένα, μολυσμένα με HCMV κύτταρα (**Al-Qahtani et al. 2020**).

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν σημαντικές ενδείξεις για την εμπλοκή της RhoA στη μορφολογία, τη μίτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση μη μολυσμένων και μολυσμένων με HCMV U373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Ο HCMV φαίνεται να μην επηρεάζει τη μετανάστευση, το πολλαπλασιασμό και τη μορφολογία των κυττάρων γλοιοβλαστώματος σε συνθήκες μη σίγησης της RhoA GTPάσης. Όμως, η μειωμένη έκφραση της RhoA στα μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, έχει ως αποτέλεσμα τον μειωμένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά και την ελαττωμένη ικανότητα μετανάστευσης και ολοκλήρωσης της μίτωσης, “παρεμποδίζοντας” τον HCMV να επιδεινώσει το κακοήθη φαινότυπο του γλοιοβλαστώματος. Βέβαια, το ίδιο δε συμβαίνει αναφορικά με τη κυτταρική μετανάστευση στη περίπτωση της U373MG-IE1 κυτταρικής σειράς, όπου η μόλυνση με HCMV οδήγησε στην πλήρη επαναφορά των επιπέδων μετανάστευσης, που υπήρχαν στις συνθήκες μη σίγησης των εν λόγω κυττάρων για τη RhoA. Συνεπώς, η IE1, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενη ενότητα, λόγω του αξιοσημείωτου ρόλου της στο κύκλο ζωής του HCMV και της εμπλοκής της σε

διαδικασίες που προάγουν τη νόσο του γλοιοβλαστώματος, διευκολύνει με την υπερέκφραση της την ογκοτρόπο δράση του HCMV, που στη προκειμένη περίπτωση σχετίζεται με την κυτταρική μετανάστευση (Tseliou et al. 2016; Al-Qahtani et al. 2020).

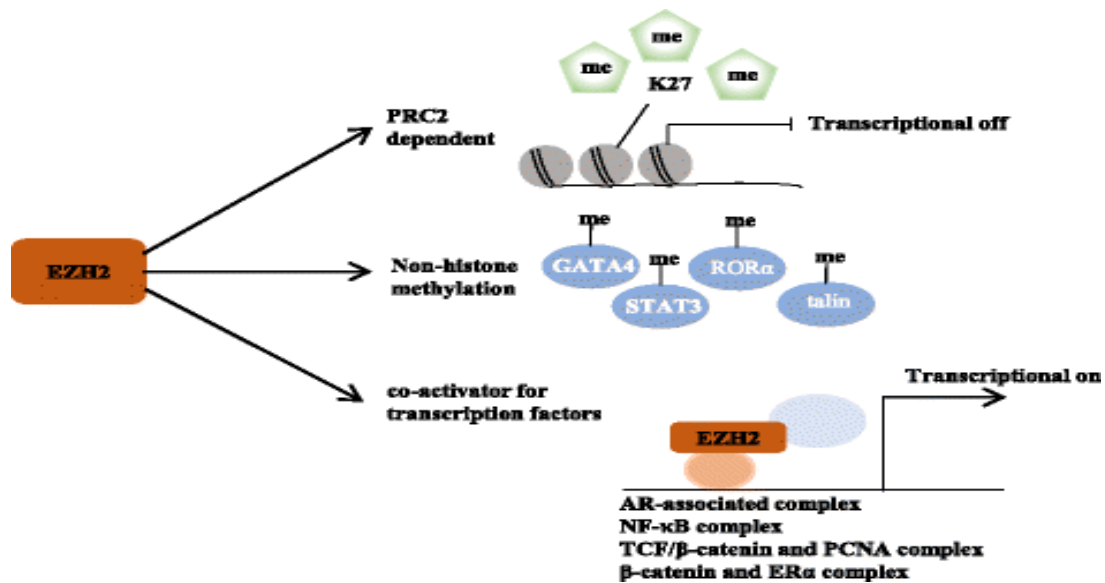
1.5 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)

1.5.1 Γενικές πληροφορίες

Ο επιγενετικός παράγοντας EZH2, είναι μία μεθυλοτρανσφεράση, που αποτελεί καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), το οποίο είναι εξελικτικά συντηρημένο από τη *Drosophila* έως τα θηλαστικά, έχοντας ταυτοποιηθεί σε πολλά είδη. Ο ρόλος του PRC2 είναι η επιγενετική τροποποίηση της χρωματίνης, μέσω της ενζυματικής δράσης του EZH2, ο οποίος ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, διμεθυλιώνει ή τριμεθυλιώνει το 27^ο κατάλοιπο λυσίνης της ιστόνης 3 (H3K27me_{2/3}), οδηγώντας σε μεταγραφική σίγηση των γονιδίων στόχων του (Margueron and Reinberg 2011; Gall Trošelj, Novak Kujundzic, and Ugarkovic 2016). Ο παράγοντας EZH2, εκτός από τον κύριο ρόλο του ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, μπορεί να μεθυλιώσει πρωτεΐνες που δεν αποτελούν ιστόνες, καθώς και να δρα με έναν ανεξάρτητο από το PRC2 τρόπο δράσης, οδηγώντας σε γονιδιακή τρανσενεργοποίηση (gene transactivation) είτε μεθυλιώνοντας πρωτεΐνες που δεν αποτελούν ιστόνες, είτε λειτουργώντας ως συν-ενεργοποιητής μεταγραφικών παραγόντων (Gan et al. 2018; Duan, Du, and Guo 2020). Ο EZH2 εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών, όπως η κυτταρική διαίρεση, η αναδιάπλαση της χρωματίνης, η αντιγραφή του DNA, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η κυτταρική γήρανση (K.-S. Yan et al. 2017; Bracken et al. 2007; Tzatsos et al. 2011; 2009). Επίσης συμμετέχει στη διατήρηση των ιδιοτήτων της πολυδυναμικότητας, της αυτο-ανανέωσης, του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (human embryonic stem cells, hESCs), καθώς και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης τους σε εξειδικευμένα κύτταρα (Collinson et al. 2016). Επιπλέον, έχει σημαντική εμπλοκή στην ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου (Gan et al. 2018), καθώς και στη ρύθμιση τόσο της λανθάνουσας όσο και της λυτικής μόλυνσης με HCMV, έχοντας βέβαια διαφορετικό ρόλο στη κάθε μια από αυτές (Abraham and Kulesza 2013; Sourvinos et al. 2014; Svrlanska et al. 2019; Arbuckle et al. 2017).

1.5.2 Οι βιολογικές λειτουργίες του EZH2

Το ανθρώπινο σύμπλοκο PRC2, πέρα από τον EZH2, αποτελείται από τρεις ακόμα κύριες υπομονάδες: EED (embryonic ectoderm development), SUZ12, και RbAp46/48 [retinoblastoma (Rb)-associated protein 46/48] (**Margueron and Reinberg 2011; Gall Trošelj, Novak Kujundzic, and Ugarkovic 2016**). Ο EZH2, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του PRC2, καθώς μέσω της δομής του SET στο καρβοξυτελικό του άκρο οδηγεί στην H3K27me_{2/3}, που αποτελεί και την κυριότερη λειτουργία του *in vivo* (Εικόνα 7) (**J. Tan et al. 2014**). Η συγκεκριμένη ιστονική μεθυλίωση, οδηγεί σε συμπυκνωμένη δομή χρωματίνης (ετεροχρωματίνη), πιο συγκεκριμένα στην επονομαζόμενη δυνητική ετεροχρωματίνη (facultative heterochromatin) (**Margueron and Reinberg 2011**). Βέβαια, είναι γνωστό ότι, για να αποκτήσει ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης, χρειάζονται απαραίτητα οι δύο μη καταλυτικές PRC2 υπομονάδες, SUZ12, EED, οι οποίες δημιουργώντας σύμπλοκο με τον EZH2, σταθεροποιούν το εν λόγω μόριο, διατηρώντας την ακεραιότητα του PRC2 (**Gall Trošelj, Novak Kujundzic, and Ugarkovic 2016; J. Tan et al. 2014**). Η εναπομένουσα κύρια υπομονάδα RbAp46/48 του PRC2, καθώς και τα πολυπεπτίδια AEBP2, PCLs και JARID2, που μπορούν να συνδεθούν δυναμικά με το σύμπλοκο PRC2 σε συγκεκριμένες κυτταρικές συνθήκες, δεν αποτελούν απαραίτητα συστατικά για την ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης, αν και καθορίζουν τη βέλτιστη λειτουργικότητα αυτού (**Margueron and Reinberg 2011; Gall Trošelj, Novak Kujundzic, and Ugarkovic 2016; J. Tan et al. 2014**). Επίσης, η PRC2-διαμεσολαβούμενη τρι-μεθυλίωση της H3K27 λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης ενός άλλου PRC συμπλόκου, του PRC1, το οποίο οδηγεί σε ακόμα πιο συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης, μέσω της ουβικουιτινίωσης της λυσίνης 119 της ιστόνης 2A. Δηλαδή το PRC2 και το PRC1 συνεργάζονται για τη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της τροποποίησης της χρωματίνης (**J. Tan et al. 2014**). Ακόμα, ο EZH2 «συνεργάζεται» και με άλλα επιγενετικά ένζυμα που σχετίζονται με την καταστολή της μεταγραφής, όπως DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs) και απόακετυλάσες ιστονών (histone deacetylases, HDACs). Όσον αφορά τις HDACs, αποακετυλιώνουν ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης, όπως της λυσίνης 27 της ιστόνης 3, με αποτέλεσμα να είναι ελεύθερα να υποστούν μεθυλίωση από τον EZH2. Εκτός αυτού ο EZH2 συνεργάζεται και με DNMTs, με αποτέλεσμα ορισμένα γονίδια των οποίων η χρωματίνη έχει μεθυλιωθεί από τον EZH2, να υπόκεινται σε περεταίρω μεταγραφική καταστολή μέσω της υπερμεθυλίωσης των νησίδων CpG του DNA τους, μετά από τη στρατολόγηση και δράση των DNMTs (**J. Tan et al. 2014**).



Εικόνα 7. Οι λειτουργίες του EZH2. (1) Ο EZH2 καταλύει τη δι/τρι-μεθυλίωση H3K27, με εξαρτώμενο από το PRC2 τρόπο, οδηγώντας σε μεταγραφική σίγηση. (2) Ο EZH2 είναι υπεύθυνος για τη μεθυλίωση πρωτεϊνών που δεν είναι ιστόνες (π.χ. STAT3, GATA4, talin, και RORα), οι οποίες εμπλέκονται είτε σε μεταγραφική σίγηση, είτε σε μεταγραφική ενεργοποίηση. (3) Ο EZH2 μπορεί να οδηγήσει επίσης στη μεταγραφική ενεργοποίηση, μέσω ενός τρόπου μη εξαρτώμενου από το PRC2, λειτουργώντας ως συν-ενεργοποιητής για μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το AR-σχετιζόμενο σύμπλοκο, τη σηματοδότηση NF-κΒ, τους παράγοντες TCF/β-κατενίνη και PCNA, β-κατενίνη και ERα) (Gan et al. 2018).

Εκτός από την επίτευξη μεταγραφικής καταστολής μέσω της H3K27me3, ο EZH2, μπορεί να οδηγήσει σε αυτή μέσω της μεθυλίωσης πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος που δεν αποτελούν ιστόνες, μέσω πάλι ενός εξαρτώμενου από το PRC2 τρόπου (Εικόνα 7). Αντίθετα, ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας, λειτουργώντας ανεξάρτητα από το σύμπλοκο PRC2, μπορεί να οδηγήσει, είτε μέσω μεθυλίωσης πρωτεϊνών που δεν αποτελούν ιστόνες είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες, σε μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων (Εικόνα 7) (Gan et al. 2018).

1.5.3 Ο ρόλος του EZH2 στον καρκίνο

Είναι πλέον γνωστό ότι ο επιγενετικός παράγοντας EZH2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στη πρόοδο πολλών τύπων καρκίνου. Πολλές μελέτες έχουν δείξει υπερέκφραση του EZH2 σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού, του ήπατος, του παγκρέατος, του στομάχου, του προστάτη, του ενδομητρίου, του γλοιοβλαστώματος και άλλων, και ότι έχει μεγάλη σημασία αναφορικά με τη πρόγνωση ενός μεγάλου αριθμού όγκων. Η υπερέκφραση του EZH2 έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο νόσου και κακή πρόγνωση τόσο στη περίπτωση του καρκίνου του προστάτη, όσο και σε αυτή του

στομάχου και του νεφρού (**Gan et al. 2018; Duan, Du, and Guo 2020**). Η απορύθμιση της λειτουργίας του EZH2, είτε λόγω μεταλλάξεων, είτε λόγω μη φυσιολογικών επιπέδων έκφρασης του (υπερέκφραση, υποέκφραση, απώλεια έκφρασης), σχετίζεται με την επαγωγή της καρκινογένεσης, την πρόοδο και τη μετάσταση του καρκίνου. Οπότε, ο EZH2, ως ογκογόνος παράγοντας μπορεί να οδηγήσει τόσο στην καταστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων μέσω της PRC2- εξαρτώμενης μεθυλίωσης, αλλά και στην υπερέκφραση ογκογονιδίων, μέσω της PRC2-ανεξάρτητης μεταγραφικής ενεργοποίησης τους (**Gan et al. 2018; J. Tan et al. 2014; Duan, Du, and Guo 2020**). Εκτός από τον ογκογόνο ρόλο του EZH2, έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένους τύπους καρκίνου, όπως στις περιπτώσεις μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων και σε έναν περιορισμένο αριθμό λευχαιμιών των Τ-κυττάρων, έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο, καθώς η καταστολή του οδηγεί σε πρόοδο της ογκογένεσης στους όγκους αυτούς (**Eich et al. 2020**). Επιπλέον, ο EZH2 έχει συσχετισθεί με την απόκτηση ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία, αλλά και σε περιπτώσεις στοχευμένης θεραπείας (**Gan et al. 2018; Duan, Du, and Guo 2020**).

Η δυσλειτουργία του EZH2 σχετίζεται με πολλές διαδικασίες που αφορούν την ογκογένεση. Πρώτον, ο EZH2 εμπλέκεται στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου και η δυσλειτουργία του μπορεί να επιταχύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να προάγει την κυτταρική επιβίωση, οδηγώντας στην ανάπτυξη καρκίνου. Επίσης, η υπερέκφραση του ενδέχεται να προάγει σε καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα Επιθηλιακή-Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), που αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο της διήθησης και της μετάστασης. Εκτός αυτού η μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης και διήθησης συγκεκριμένων κυτταρικών σειρών καρκίνου πνεύμονα, μετά από σίγηση της έκφρασης του EZH2, προτάσσει την εμπλοκή του εν λόγω παράγοντα στις διαδικασίες της διήθησης και της μετάστασης. Επιπροσθέτως, η έκφραση του EZH2, τόσο στα καρκινικά κύτταρα, όσο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου, έχει δειχθεί ότι επηρεάζει την ανοσολογική απάντηση έναντι του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του EZH2 στα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να οδηγεί στη καταστολή της ανοσολογικής απάντησης έναντι αυτών, πράγμα το οποίο φαίνεται να ισχύει και στις περιπτώσεις των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων (T-regulatory cells, T-regs), των Τ-βοηθητικών κυττάρων (T-helper cells, Th), καθώς και των κυττάρων φυσικών φονιάδων (natural killer cells, NK). Αντίθετα, αναφορικά με τα δραστικά Τ-κύτταρα (effector T cells) και τα δενδριτικά κύτταρα, η έκφραση του EZH2 φαίνεται να ευνοεί την ανοσολογική απάντηση έναντι του καρκίνου. Ακόμα, ο EZH2 φαίνεται να παίζει ρόλο στη πρόοδο του καρκίνου μέσω

της εμπλοκής του στη διαδικασία της αγγειογένεσης, αλλά και στη ρύθμιση μεταβολικών μονοπατιών **(Gan et al. 2018; Duan, Du, and Guo 2020)**.

Η έκφραση και η ενεργότητα του EZH2 στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ρυθμιστεί σε γενετικό, μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, αλλά και μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Λόγω της δυνατότητας ρύθμισης σε πολλά επίπεδα, μπορεί να εξηγηθούν οι ποικίλες διαφορετικές λειτουργίες του EZH2, σε διαφορετικούς τύπους όγκων. Όσον αφορά τη ρύθμιση σε γενετικό επίπεδο, έχουν βρεθεί σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο του EZH2 σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Όσες από αυτές τις μεταλλάξεις οδηγούν σε υπερέκφραση (gain of function mutations) του EZH2, οδηγούν συνήθως σε αυξημένη μεθυσία, και κατά συνέπεια σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και γονιδίων που αφορούν τη διαφοροποίηση, κυρίως σε περιπτώσεις λεμφωμάτων, με την σωματική σημειακή μετάλλαξη Y641 στη δομή SET του EZH2 να εμφανίζεται συχνότερα **(Eich et al. 2020; Gan et al. 2018)**. Στις περιπτώσεις που εντοπίζονται μεταλλάξεις που οδηγούν σε υποέκφραση (loss of function) του γονιδίου του EZH2, ο εν λόγω παράγοντας έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο, πράγμα το οποίο συμβαίνει κυρίως σε κακοήθειες του μυελού των οστών **(Eich et al. 2020)**. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η υπερέκφραση του EZH2 σε πολλούς τύπους καρκίνου οφείλεται στη μεταγραφική ρύθμιση του από ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια, προάγοντας ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και πρόοδο της νόσου. Οι E2F, ELK1, HIF1a, NF-κB είναι ορισμένοι από τους μεταγραφικούς παράγοντες, που ενεργοποιούν τη μεταγραφή του EZH2 **(Gan et al. 2018; Eich et al. 2020)**. Η μετα-μεταγραφική ρύθμιση του EZH2 γίνεται μέσω miRNAs, όπως το miR-101 και το miR-26a. Αυτά τα miRNAs δεσμεύονται στο mRNA του EZH2, καθορίζοντας τα επίπεδα της πρωτεΐνης του EZH2. Σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, η μειωμένη λειτουργία αυτών των miRNAs, οδηγεί σε υπερέκφραση του EZH2, και κατά συνέπεια αυξημένα επίπεδα H3K27me3, προάγοντας την ογκογένεση **(Gan et al. 2018; Eich et al. 2020)**. Σχετικά με τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση του EZH2, μπορεί να γίνει μέσω φωσφορυλιώσεων, ουβικουιλιώσεων και παλμιτιλιώσεων **(Gan et al. 2018)**.

Ο σημαντικός ρόλος του EZH2 στην καρκινογένεση, τον καθιστά στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Για αυτό το λόγο πολλά μικρά μόρια έχουν προταθεί ως εν δυνάμει θεραπευτικές επιλογές έναντι του EZH2, βρισκόμενα επί το πλείστον σε προ-κλινικές και κλινικές δοκιμές, καθώς μόνο το Tametostat (TAZVERIK, Epizyme) έχει εγκριθεί από τον FDA για χορήγηση σε ενήλικες και παιδιατρικούς ασθενείς 16 ετών και άνω με μεταστατικό ή τοπικά-προχωρημένο επιθηλιοειδές σάρκωμα, που δε ενδείκνυται για πλήρη εκτομή **(Duan, Du, and Guo 2020)**.

Ο πρώτος αναστολέας που προτάθηκε έναντι του EZH2 ήταν ο 3-Deazaneplanocin A (DZNep), που πιο συγκεκριμένα αποτελεί αναστολέα της S-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase, οδηγώντας σε έμμεση αναστολή του EZH2 μέσω της αύξησης της της SAH. Η SAH αποτελεί παραπροϊόν, που παράγεται μετά τη μεταφορά μεθυλίου από την S-adenosyl-methionine (SAM), που αποτελεί τον δότη μεθυλίου, ώστε να επιτευχθεί η μεθυλίωση της H3K27me3, καθώς και άλλων τόπων μεθυλίωσης. Η συσσώρευση του συγκεκριμένου παραπροϊόντος οδηγεί σε καταστολή της εξαρτώμενης από τη SAM ικανότητας του EZH2 να μεθυλιώνει την H3K27me3. Όμως, επειδή και άλλες μεθυλοτρανσφεράσες εξαρτώνται από τη SAM ως δότη μεθυλίου, η χρήση του DZNep αναστέλλει ολικά την μεθυλίωση ιστονών, χωρίς να είναι ειδική για την H3K27, που αφορά την περίπτωση του EZH2 (**Eich et al. 2020; Duan, Du, and Guo 2020**). Από το 2012 έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα από αναστολείς του EZH2, στοχεύοντας την αναστολή της ενεργότητας του ως μεθυλοτρανσφεράση, με πιο ειδικό τρόπο σε σχέση με τον DZNep, καθώς αποτελούν ανταγωνιστικούς αναστολείς της SAM. Ο αναστολέας Tametostat αποτελεί τον περισσότερο υποσχόμενο από τους ανταγωνιστικούς αναστολείς της SAM, καθώς δοκιμάζεται σε μεγάλο αριθμό κλινικών μελετών, είτε για χορήγηση ως μονοθεραπεία σε λεμφώματα Β-κυττάρων, προχωρημένου σταδίου συμπαγείς όγκους, κακοήθη μεσοθηλιώματα, ραβδοειδείς όγκους και σαρκώματα, είτε συνδυαζόμενος με θεραπεία αντι-ανδρογόνων, με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (anti-PD1, anti-PDL1), με χημειοθεραπεία, είτε με στοχευμένες θεραπείες όπως τη χορήγηση της δραστικής ουσίας rituximab. Επιπροσθέτως, ένας σημαντικός αριθμός αναστολέων που στοχεύουν τόσο τον παράγοντα EZH2 όσο και τον ομόλογο του, EZH1, δοκιμάζονται σε κλινικές μελέτες, καθώς ο δεύτερος συμπληρώνει τη δράση του πρώτου ως προς την ικανότητα μεθυλίωσης της H3K27, με αποτέλεσμα η συνδυαστική αναστολή και των δύο να ενδέχεται να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Πρόσφατα, ο DS-3201b αναστολέας EZH1/2 εισήχθη σε αρκετές κλινικές δοκιμές για ασθενείς με λευχαιμία, λέμφωμα ή μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Εκτός από τους αναστολείς που αφορούν την απευθείας στόχευση του EZH2, έχουν προταθεί αναστολείς που στοχεύουν τις υπομονάδες EED και SUZ12 του PRC2, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η εξαρτώμενη από το PRC2 δράση του EZH2. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο αναστολέας της EED, MAK683, ο οποίος συνδέεται στη δομή της EED που αλληλεπιδρά με τη H3K27me3, με συνέπεια να διαταράσσει την αλληλεπίδραση με τον EZH2, μειώνοντας την ικανότητα μεθυλίωσης. Ο συγκεκριμένος αναστολέας βρίσκεται σε κλινικές μελέτες για ασθενείς προχωρημένου σταδίου ρινοφαρυγγικού καρκινώματος, διάχυτου λεμφώματος από

μεγάλα κύτταρα (Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL), σαρκώματος, και καρκίνων στομάχου, προστάτη και ωοθηκών. Ακόμα, επειδή ο EZH2 εμπλέκεται σε πολλούς τύπους καρκίνου με έναν ανεξάρτητο-μεθυλίωσης/PRC2 τρόπο δράσης, με αποτέλεσμα να μην ανταποκρίνονται σε αναστολείς που στοχεύουν την ενζυματική ενεργότητα του, υπάρχει ερευνητική προσπάθεια με κατεύθυνση την ανακάλυψη μεθόδων που οδηγούν στην αναστολή της δράσης μέσω της αποδόμησης του. Ο θεραπευτικός συνδυασμός αναστολέων του EZH2 με άλλες θεραπευτικές επιλογές όπως η ανοσοθεραπεία, η συμβατική χημειοθεραπεία, και η στοχευμένη θεραπεία έχει εισαχθεί σε πολλές περιπτώσεις στο στάδιο των κλινικών δοκιμών, καθώς αυξάνει την αποτελεσματικότητα που προσφέρει η μονοθεραπεία με αναστολείς EZH2. Τέλος, η προσπάθεια για εύρεση όλο και περισσότερων προβλεπτικών βιοδεικτών, όπως συγκεκριμένων μεταλλάξεων στο γονιδίου του EZH2 ή υπερέκφραση αυτού, θα ευνοήσει στη κατηγοριοποίηση των ασθενών για επιλογή κατάλληλης θεραπείας έναντι του EZH2, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της (Eich et al. 2020; Duan, Du, and Guo 2020).

1.5.4 Ο ρόλος του EZH2 στο γλοιοβλάστωμα

Στη περίπτωση του γλοιοβλαστώματος, όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις διαφορετικών τύπων όγκου, ο EZH2 υπερεκφράζεται (Yin, Qiu, and Peng 2016). Εκτός από το γεγονός ότι η έκφραση του είναι αυξημένη στα γλοιώματα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, η έκφραση του EZH2 είναι αυξημένη στη περίπτωση του γλοιοβλαστώματος, που ανήκει στον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας (grade IV), συγκριτικά με τα γλοιώματα χαμηλότερων βαθμών κακοήθειας (I-III) (Zhang et al. 2015; Y. Chen et al. 2021). Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση του EZH2, σχετίζεται με το μειωμένο χρόνο ζωής των ασθενών, αποτελώντας ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα αναφορικά με την ολική επιβίωση (overall survival) των ασθενών με γλοιοβλάστωμα (Zhang et al. 2015; Y. Chen et al. 2021). Επιπροσθέτως, η σίγηση της έκφρασης του EZH2 τόσο σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος (U87, U251), όσο και σε κύτταρα προερχόμενα από όγκους ασθενών με γλοιοβλάστωμα, οδήγησε σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εκτός αυτού, η μετέπειτα έγχυση των παραπάνω σιγημένων κυττάρων σε xenograft μοντέλα, οδήγησε και σε μειωμένο μέγεθος όγκου, σε σχέση με τα μη σιγημένα για τον EZH2 κύτταρα γλοιοβλαστώματος, αποδεικνύοντας την εμπλοκή του συγκεκριμένου παράγοντα στη πρόοδο της ογκογένεσης στη νόσο του γλοιοβλαστώματος (Zhang et al. 2015; Cheng and Xu 2018). Ακόμα, η θετική συσχέτιση της έκφρασης του EZH2 με την πρόοδο της νόσου του γλοιοβλαστώματος, ενισχύεται από το γεγονός ότι εμφανίζει θετική συσχέτιση

έκφρασης με την έκφραση γονιδίων (AIFM3, LDHD, LYNX1, SCN2B or TMEM56) που σχετίζονται θετικά με την πρόοδο του γλοιοβλαστώματος (**Y. Chen et al. 2021**), καθώς και από την καταστολή της έκφρασης συγκεκριμένων ογκογονιδίων (c-Myc, Akt) όταν επαχθεί η σίγηση της έκφρασης του σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος (**Cheng and Xu 2018**).

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι ο EZH2 εμπλέκεται σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες που αφορούν τα γλοιώματα. Συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη διήθηση, στη «διατήρηση» (maintenance) των βλαστικών κυττάρων των γλοιωμάτων, στην ανθεκτικότητα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση και στις ακτινοθεραπείες, στη διαδικασία της απόπτωσης, καθώς και με την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου (**Yin, Qiu, and Peng 2016; Y. Chen et al. 2021**). Έχει παρατηρηθεί ότι η καταστολή της έκφρασης του EZH2, μπορεί να οδηγήσει σε σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 μέσω μείωσης της έκφρασης κυκλινοεξααρτώμενων κινασών και κυκλινών του κυτταρικού κύκλου, και κατά συνέπεια στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο γλοιοβλάστωμα. Επίσης, ο συγκεκριμένος παράγοντας ενδέχεται να είναι υπεύθυνος για τη διαδικασία της διήθησης στο γλοιοβλάστωμα, καθώς έχει βρεθεί ότι σε περίπτωση σίγησης του, μειώθηκε η διηθητική ικανότητα των κυττάρων της U87MG κυτταρικής σειράς γλοιοβλαστώματος. Επιπλέον η καταστολή της έκφρασης του EZH2, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και διατήρησης των βλαστικών κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, πράγμα το οποίο αποδεικνύει τη συμμετοχή αυτού του παράγοντα στις διαδικασίες αυτές των βλαστικών κυττάρων του γλοιοβλαστώματος. Ακόμα, σημαντικός είναι ο ρόλος του EZH2 όσον αφορά την αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι όγκοι γλοιοβλαστώματος στις φαρμακευτικές θεραπείες και στις ακτινοθεραπείες, καθώς καταστέλλοντας την έκφραση του, μειώνεται αυτή η ικανότητα ανθεκτικότητας. Επιπρόσθετα, ο εν λόγω επιγενετικός παράγοντας εμπλέκεται στη διαδικασία της απόπτωσης στο γλοιοβλάστωμα, αφού η καταστολή της έκφρασης του έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί στην επιτάχυνση της (**Yin, Qiu, and Peng 2016**). Σημαντική, επίσης, φαίνεται να είναι η θετική συσχέτιση της έκφρασης του EZH2 με την καταστολή της ανοσολογικής απάντησης έναντι του γλοιοβλαστώματος, καθώς η έκφραση του φαίνεται να σχετίζεται αρνητικά με τη διεισδυτικότητα των ανοσο-κυττάρων (immune-cells infiltration) πέριξ του όγκου (**Y. Chen et al. 2021**).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του EZH2 στη περίπτωση του γλοιοβλαστώματος φαίνεται να έχουν ορισμένα miRNAs, τα οποία φυσιολογικά καταστέλλουν σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση του EZH2. Όμως,

παρατηρείται απορύθμιση της λειτουργίας τους σε όγκους γλοιοβλαστώματος, με συνέπεια να υπερεκφράζεται ο EZH2. Αυτό μπορεί να διαπιστωθεί και από το γεγονός ότι σε περιπτώσεις αύξησης της υπάρχουσας μειωμένης ποσότητας των μεταγράφων αυτών των miRNAs, παρατηρήθηκε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διήθησης των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, καθώς και επιτάχυνση της απόπτωσης και σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου, λόγω της καταστολής της έκφρασης του EZH2 από αυτά. Οπότε τα συγκεκριμένα miRNAs έχουν ογκοκατασταλτικό ρόλο στην πρόοδο της νόσου του γλοιοβλαστώματος, λόγω της ικανότητάς τους να καταστέλλουν τον EZH2, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόοδο της συγκεκριμένης νόσου (Yin, Qiu, and Peng 2016).

Η εμπλοκή του EZH2 στην πρόοδο του όγκου του γλοιοβλαστώματος, εκτός από προγνωστικό δείκτη, καθιστά τον εν λόγω παράγοντα σημαντικό θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση της νόσου, παρόλο που μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κάποιο μόριο αναστολέας του EZH2 που να βρίσκεται στη φάση των κλινικών δοκιμών όσον αφορά την περίπτωση του γλοιοβλαστώματος (Suter, Rodriguez-Blanco, and Ayad 2020).

1.5.5 Η επίδραση του HCMV στον EZH2 σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος

Εκτός από το γεγονός ότι τόσο ο HCMV όσο και ο EZH2 εμπλέκονται στη πρόοδο της νόσου του γλοιοβλαστώματος, συγκεκριμένα στοιχεία αποδεικνύουν την πιθανή αλληλεπίδραση τους στη περίπτωση της νόσου αυτής. Σε μία έρευνα κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ποσότητας μεταγράφων του γονιδίου του EZH2, μεταξύ δειγμάτων από όγκους γλοιοβλαστώματος που είτε είχαν μολυνθεί από HCMV είτε όχι, και δειγμάτων από φυσιολογικούς ιστούς του εγκεφάλου, διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα μεταγράφων του EZH2 σε συνθήκες μόλυνσης από τον HCMV ήταν μεγαλύτερη, σε σχέση με τις δύο άλλες κατηγορίες. Επιπλέον η ποσότητα μεταγράφων στη περίπτωση των δειγμάτων που αφορούσαν όγκους γλοιοβλαστώματος χωρίς την ύπαρξη του HCMV, ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα που προέρχονταν από φυσιολογικούς εγκεφαλικούς ιστούς. Η υψηλότερη έκφραση του γονιδίου του EZH2 μετά από μόλυνση με HCMV στο γλοιοβλάστωμα, ίσως να οφείλεται στην πιθανή επίδραση του συγκεκριμένου ιού στον παράγοντα EZH2, οδηγώντας στην υπερέκφραση του. Οπότε, ενδέχεται ο HCMV να επηρεάζει την έκφραση του EZH2, με σκοπό να ολοκληρώσει το κύκλο ζωής του στο γλοιοβλάστωμα, εκδηλώνοντας συγχρόνως την ογκοτρόπο δράση του (Ahani et al. 2014).

1.5.6 Ο ρόλος του EZH2 στο λυτικό κύκλο ζωής του HCMV

Ο επιγενετικός παράγοντας EZH2 έχει δειχθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στη πρόοδο της λυτικής μόλυνσης από τον HCMV. Συγκεκριμένα, έχει αποκαλυφθεί ότι σε περίπτωση μόλυνσης ινοβλαστών από τον HCMV ο EZH2 ευνοεί τα αρχικά στάδια της μόλυνσης μέσω του κλασσικού τρόπου δράσης του ως μεθυλοτρανσφεράση (**Sourvinos et al. 2014**). Όμως, μία πρόσφατη ερευνητική μελέτη έδειξε ότι η επιρροή των παραγόντων, συμπεριλαμβάνοντας και τον EZH2, των συμπλόκων PRC1 και PRC2 διευκολύνει τη πρόοδο της μόλυνσης από τον HCMV σε κύτταρα ινοβλαστών, με ένα μη-κανονικό ενζυματικά ανεξάρτητο τρόπο δράσης τους, τόσο στα αρχικά, όσο και στα μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης (**Svrlanska et al. 2019**).

Αναφορικά με τη πρώτη περίπτωση, η μεταγραφή των άμεσα-πρώιμων (IE) εκφραζόμενων γονιδίων του HCMV εξαρτάται από τη τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K27, η οποία επιτελείται από τη συνεργατική δράση του EZH2 και του επιγενετικού παράγοντα KDM2B/NDY1 (**Sourvinos et al. 2014**). Όσον αφορά τον δεύτερο, αποτελεί μία απομεθυλάση ιστονών, η οποία συγκεκριμένα έχει την ικανότητα να απομακρύνει μεθυλικές ομάδες από τα κατάλοιπα λυσίνης 36 και 4 της ιστόνης 3 (H3K36me2 και H3K4me3), οδηγώντας σε αλλαγή της δομής της χρωματίνης σε ετεροχρωματίνη, και κατά συνέπεια σε μεταγραφική καταστολή. Ανήκει στην JmjC οικογένεια απομεθυλασών και αποτελείται από πολλές λειτουργικές δομές, από τις οποίες η JmjC είναι υπεύθυνη για την απομεθυλίωση. Ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική γήρανση και η διαφοροποίηση, αλλά και η αυτό-ανανέωση των βλαστικών κυττάρων. Όμως, έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Επιπλέον η εν λόγω απομεθυλάση φαίνεται να αποτελεί ρυθμιστή του προαναφερθέντα επιγενετικού παράγοντα EZH2, συμμετέχοντας από κοινού στις διαδικασίες καταστολής της μεταγραφής τόσο σε φυσιολογικές διεργασίες των κυττάρων, όσο και σε διεργασίες που σχετίζονται με την καρκινογένεση (**M. Yan et al. 2018**). Στο πλαίσιο της λυτικής μόλυνσης ινοβλαστών από τον HCMV, ο άξονας KDM2B-EZH2 οδηγεί μέσω της τριμεθυλίωσης H3K27, στη μεταγραφική καταστολή του μεταγραφικού καταστολέα GF11 (Growth factor independence 1) του υποκινητή των IE γονιδίων MIEP (major immediate-early promoter), με αποτέλεσμα να “επιτρέπεται” η μεταγραφή των IE γονιδίων, που είναι απαραίτητα για τα επόμενα στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Σε συνθήκες επαγωγής της καταστολής του εν λόγω άξονα, αυξάνεται η έκφραση του GF11, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η ενεργοποίηση του MIEP και κατά συνέπεια η πρόοδος της

μόλυνσης από τον HCMV. Αμέσως μετά τη μόλυνση των ινοβλαστών με HCMV, ο ιός προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιτελεί τη μείωση της έκφρασης του GF11 τόσο σε κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί σίγηση των επιγενετικών παραγόντων, όσο και σε εκείνα που δεν είχαν υποστεί. Όμως, στα κύτταρα που είχαν υποστεί σίγηση, η μείωση της έκφρασης του GF11 από τον HCMV δεν ήταν ικανή για να οδηγήσει στην ενεργοποίηση του MIEP σε τέτοιο βαθμό ώστε να υπάρξει ικανοποιητική ποσότητα μεταγράφων των ΙΕ γονιδίων, που αντίθετα παρατηρήθηκε σε συνθήκες μη σίγησης, επηρεάζοντας έτσι τη πρόοδο της μόλυνσης. Εκτός από την άμεση μείωση της έκφρασης του GF11, ο HCMV σε επόμενο στάδιο της μόλυνσης καταστέλλει τον συγκεκριμένο παράγοντα μέσω της αύξησης της έκφρασης των προαναφερθέντων επιγενετικών παραγόντων. Επιπλέον, επάγει, τόσο την αυξημένη έκφραση του παράγοντα JARID2, ο οποίος ρυθμίζει τη λειτουργία του EZH2 ως μεθυλοτρανσφεράση, λειτουργώντας ως σύμπλοκο με αυτόν, όσο και τη μειωμένη έκφρασης της απομεθυλάσης JMJD3, η οποία οδηγεί σε απομεθυλίωση της H3K27me3, έχοντας ακριβώς αντίθετη δράση από τον EZH2. Επιπροσθέτως, ο EZH2 φαίνεται να επιδρά και άμεσα στον MIEP στα πολύ πρώιμα στάδια της μόλυνσης, μέσω των τροποποιήσεων ιστονών που μπορεί να επάγει. Συγκεκριμένα σε συνθήκες επαγωγής σίγησης του EZH2, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα τριμεθυλίωσης H3K27, σε σχέση με τις συνθήκες μη σίγησης. Αντίθετα όσον αφορά τα επίπεδα τριμεθυλίωσης της H3K4, που οδηγεί γενικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, παρατηρήθηκε μείωση στις συνθήκες σίγησης του επιγενετικού παράγοντα. Συνεπώς, ο EZH2 ίσως επηρεάζει μέσω των συγκεκριμένων ιστονικών τροποποιήσεων στο γενετικό τόπο του MIEP, τη μεταγραφική ρύθμιση των ΙΕ γονιδίων. Συνοψίζοντας, ο HCMV αλληλεπιδρά με τους επιγενετικούς παράγοντες EZH2 και KDM2B σε αρχικά στάδια της μόλυνσης, με σκοπό να αποφύγει τους κυτταρικούς μηχανισμούς που αποτρέπουν την έκφραση των ΙΕ γονιδίων του, τα οποία θεωρούνται καθοριστικά για τον πολλαπλασιασμό του. Συνεπώς, το μονοπάτι KDM2B-EZH2 μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο, με σκοπό τη καταστολή της μόλυνσης από τον HCMV (**Sourvinos et al. 2014**).

Σχετικά με την επιρροή του EZH2 στην πρόοδο του κύκλου ζωής του HCMV κατά τη λυτική μόλυνση σε ινοβλάστες, προτάθηκε από μία άλλη ερευνητική ομάδα ότι τόσο ο συγκεκριμένος επιγενετικός παράγοντας, όσο και οι υπόλοιποι παράγοντες που απαρτίζουν τα PRC1 και PRC2 σύμπλοκα, εμπλέκονται στη πρόοδο της μόλυνσης μέσω ενός μη-κανονικού, ανεξάρτητου από την ενζυμική δράση, τρόπου δράσης των συγκεκριμένων συμπλόκων. Πρώτον, η έκφραση του EZH2 ήταν αυξημένη σε επίπεδο mRNA και σε επίπεδο πρωτεΐνης κατά τη μόλυνση με HCMV σε σχέση με

τις συνθήκες μη μόλυνσης μία μέρα μετά τη μόλυνση και μετέπειτα. Αύξηση, επίσης, παρατηρήθηκε και στην τριμεθυλίωση της H3K27. Επιπλέον, ο EZH2 μετά από μόλυνση των ινοβλαστών δε βρίσκεται ισοκατανεμημένος στον πυρήνα, αλλά στα σημεία στα οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του ιικού DNA (viral replication compartments, VRCs), χωρίς όμως να συμβαίνει το ίδιο και για τη τριμεθυλιωμένη H3K27, η οποία αποκλειόταν από τις δομές αυτές σε συνθήκες μόλυνσης. Επιπρόσθετα η σίγηση του EZH2, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού. Βρέθηκε, ακόμη ότι ο EZH2 είναι συνδεδεμένος με τα νεοσυντιθέμενα από την αντιγραφή ιικά γονιδιώματα στις περιοχές του ιικού γονιδιώματος που πραγματοποιείται η αντιγραφή του. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο οι αναστολείς που έχουν την ικανότητα να αποσταθεροποιούν τα PRC σύμπλοκα μειώνοντας τη ποσότητα των πρωτεϊνών που τα αποτελούν, χωρίς να επηρεάζουν μόνο την ενζυμική ενεργότητα των συμπλόκων, οδηγούν σε μικρότερο αριθμό νεοσυντιθέμενων αντιγράφων ιικού γονιδιώματος, καθώς και παραγόμενων ιοσωματίων. Αντίθετα οι αναστολείς των PRC που στοχεύουν μόνο στην ενζυμική τους δράση δεν επηρεάζουν τη πρόοδο της μόλυνσης από τον HCMV. Όλες οι παραπάνω ενδείξεις αποκαλύπτουν ότι ο EZH2, ως μέλος του PRC2 συμπλόκου συμμετέχει στη διαδικασία της αντιγραφής του ιικού DNA μέσω μίας ανεξάρτητης από την ενζυμική του δράση ως μεθυλοτρανσφεράση, μη κανονικής, λειτουργίας του. Συνεπώς, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την πρόοδο της μόλυνσης του HCMV, διευκολύνοντας τον να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του, με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο για την καταστολή της μόλυνσης από αυτόν (Svrlanska et al. 2019).

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Ο HCMV είναι ευρέως αποδεδειγμένο ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της κακοήθειας του καρκίνου του γλοιοβλαστώματος μέσω της ογκοτρόπου δράσης του (**Joseph et al. 2017**). Όπως, ο κάθε ιός, έτσι και ο HCMV χρησιμοποιεί κυτταρικούς μηχανισμούς των κυττάρων που μολύνει, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την εξάπλωση του (**Mocarski et al. 2013**). Αναφορικά με τον HCMV, ορισμένα από τα κυτταρικά μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά με σκοπό την πρόοδο της μόλυνσης του σε κύτταρα ινοβλαστών, είναι ο επιγενετικός παράγοντας EZH2 (**Sourvinos et al. 2014; Svrlanska et al. 2019**) και η πρωτεΐνη ρύθμισης του κυτταροσκελετού, RhoA GTPάση (**Wang et al. 2005**). Επιπροσθέτως, τόσο ο EZH2, όσο και η RhoA GTPάση εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται με την εξέλιξη της κακοήθειας της νόσου του γλοιοβλαστώματος (**Yin, Qiu, and Peng 2016; Y. Chen et al. 2021; Al-Koussa et al. 2020; Al-Qahtani et al. 2020; Tseliou et al. 2016**). Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, η συγκεκριμένη μελέτη έχει σκοπό να αναδείξει την επίδραση προκαλεί ο HCMV στην πρωτεϊνική έκφραση του EZH2 και της RhoA κατά τη διάρκεια της λυτικής πορείας μόλυνσης του στα U373MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Εκτός αυτού, ερευνήθηκε και η ικανότητα του ιού να οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των U373MG κυττάρων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Κύτταρα και ιός

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες της ακροποσθίας (Primary Human Foreskin Fibroblasts, HFF) καθώς και την ανθρώπινη κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U373MG. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose, Biosera, Cat. N. LMD1110/500), εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό βόειο ορό [fetal bovine serum, FBS (Biosera, Cat. N. FB-1001/500)] αδραντοποιημένο με θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά και με 1% πενικιλίνη (100 U/ml) και 1% στρεπτομυκίνη (100mg/ml) (Penicillin-Streptomycin Solution 100X, Biosera, Cat. N. XC-A4122/100). Τα κύτταρα διατηρούνταν στους 37°C, σε 5% CO₂ σε επωαστικό κλίβανο. Οι πειραματικές διαδικασίες που αφορούσαν τις κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνταν σε κατάλληλο χώρο (Class II Cabinet), ώστε να υπάρχουν οι απαραίτητες ασηπτικές συνθήκες. Όσον αφορά τον ιό, χρησιμοποιήθηκε το αγρίου τύπου (wild-type) εργαστηριακό στέλεχος HCMV AD169.

2.1.1 Χειρισμός κυτταροκαλλιεργειών

Οι παραπάνω κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε μονοστιβάδες και καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές φλάσκες των 25cm², 75cm², 175cm², καθώς και σε πιάτα 6, 12, και 24 πηγαδιών (6, 12, 24 well plates), ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων που εκτελέστηκαν. Σχετικά με την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, όταν τα κύτταρα έφταναν πληρότητα που ισούταν με το 90% της επιφάνειας της φλάσκας, προστίθεντο σε αυτά ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS) (PBS Tablets, TaKaRa, Cat. N. T900) με σκοπό την αφαίρεση του εναπομείναντος όγκου ορού, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού. Αυτό γίνεται διότι η δράση του διαλύματος Trypsin/EDTA (Biosera, Cat. N. XC-T1717/100) 1x σε PBS, αναστέλλεται από τον ορό, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων. Αφού, λοιπόν, προστεθεί το εν λόγω διάλυμα για μερικά λεπτά, μέχρι να αρχίζουν να αποκολλώνται τα κύτταρα, αφαιρείται, και εν συνεχεία τοποθετείται η φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο μέχρι τα κύτταρα να αρχίζουν να αποκολλώνται πλήρως. Μετέπειτα, το ¼ περίπου του αριθμού των κυττάρων συλλέγεται με το θρεπτικό καλλιέργειας και προστίθεται σε νέα φλάσκα στην οποία έχει ήδη προστεθεί φρέσκο θρεπτικό. Αναφορικά με το πάγωμα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το BAMBAKER (Nippon Genetics Europe GmbH, Cat. N. BB02) freezing medium.

2.2 Δημιουργία ιικού αποθέματος (stock)

Το αγρίου-τύπου εργαστηριακό στέλεχος AD169 του HCMV πολλαπλασιάστηκε (propagated) σε κύτταρα HFFs, τα οποία αφού στρώθηκαν σε πλαστική φλάσκα επιφάνειας 175 cm² σε αριθμό 3,5x10⁶, και εν συνεχεία επωάστηκαν για μία μέρα, και ακολούθως μολύνθηκαν με το εν λόγω στέλεχος του HCMV με MOI (Multiplicity of infection) = 0,5. Μετέπειτα, οι HFFs επωάστηκαν μέχρι που άρχισαν να αυξάνονται σε μέγεθος, και να αποκολλούνται από την επιφάνεια της φλάσκας, πράγμα το οποίο αποτελεί ένδειξη ενεργής μόλυνσης από τον ιό, επονομαζόμενη ως κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα (cytopathic effect, CPE). Όταν το κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα είναι εμφανές στη πλειονότητα των κυττάρων, τότε τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια ειδικού ξέστρου και τοποθετούνται μαζί με το θρεπτικό της καλλιέργειας σε falcon των 50ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 15 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση περιέχει τα ιοσωμάτια που έχουν απελευθερωθεί από τα κύτταρα (Cell Releasing Virus ή CRV), και μεταφέρεται σε ένα άλλο falcon, ώστε να φυγοκεντρηθεί για 2 ώρες στις 13000 rpm στους 4° C. Έτσι, μετά τη φυγοκέντρηση των 2 ωρών τα ιοσωμάτια συγκεντρώνονται υπό τη μορφή πελέτας. Εν συνεχεία, προστίθεται στη πελέτα 1 ml θρεπτικό απουσία ορού, αφήνοντας την ολονυχτίως στους 4° C, ώστε να επαναδιαλυθεί ομαλά. Μετά την επαναδιάλυση της πελέτας την επόμενη μέρα, το προκύπτον ιικό απόθεμα (stock) φυλάσσεται στους -80° C.

2.3 Τιτλοποίηση του ιού και μέθοδος ιικών μολύνσεων

Ο ιικός τίτλος (virus titer) του HCMV-stock (φυλάσσεται στους -80°C) εκτιμήθηκε μέσω της πειραματικής διαδικασίας μέτρησης ιικών πλακών (plaque assay), η οποία πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HFFs, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε 6-πηγαδιών πιάτα (6-well plates) κυτταροκαλλιέργειών. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν περίπου το 90% της επιφάνειας των πηγαδιών πραγματοποιήθηκε μόλυνση με το υπό εξέταση ιικό-stock. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (10⁻² έως 10⁻⁶) του stock, και εν συνέχεια, 200 μl από την κάθε αραιώση, προστέθηκαν σε διαφορετικό πηγάδι του πιάτου, αφού αφαιρέθηκε πρώτα το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων, ώστε να καλύπτονται οριακά από αυτό. Το πιάτο ανακινούνταν κάθε 10 λεπτά για περίπου 2 ώρες ενώ παράλληλα επωαζόταν στον κλίβανο. Μετά το πέρας των 2 ωρών αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο που περιείχε το ιικό ενοφθάλμισμα και προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό στα κύτταρα, στο οποίο είχε προστεθεί ανθρωπίνος ορός που περιείχε αντισώματα IgG έναντι του ιού HCMV σε συγκέντρωση 1/100 (30μl) του τελικού όγκου (3ml) για κάθε πηγάδι. Τα κύτταρα

επώαστηκαν στον κλίβανο για περίπου 10 ημέρες, μέχρι να εμφανιστούν οι ιικές πλάκες λόγω του κυτταροπαθητικού αποτελέσματος. Για να είναι περισσότερο διακριτές οι ιικές πλάκες, πραγματοποιήθηκε χρώση με την ουσία Giemsa, προσθέτοντας 200μl στο υπάρχον θρεπτικό μέσο του κάθε πηγαδιού. Το πιάτο επώαστηκε χωρίς ανακίνηση αυτή τη φορά και εκτός κλιβάνου για περίπου 2 ώρες. Μετέπειτα, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με νερό προσεκτικά από τη χρωστική και αφέθηκε το πιάτο να στεγνώσει στον αέρα. Στη συνέχεια οι πλάκες μετρήθηκαν με τη χρήση στερεοσκοπίου και υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος βάσει του αριθμού των πλακών, που σχηματίσθηκαν στο πηγάδι που αντιστοιχεί στην αραίωση με τις λιγότερες πλάκες. Συνεπώς, ο τίτλος του ιού υπολογίζεται ως εξής: αριθμός πλακών x 5 x αραίωση που παρατηρήθηκαν, και εκφράζεται σε μονάδες PFU/ml [Plaque Forming Units (Μονάδες Σχηματισμού Πλακών)/ml].

Σχετικά με τη μέθοδο ιικών μολύνσεων των HFFs και των U373MG κυττάρων με τον ιό HCMV, τα κύτταρα μολύνθηκαν με την αναφερόμενη σε κάθε πειραματική διαδικασία ποσότητα ιού εκφραζόμενη σε μονάδες MOI (Multiplicity of infection), που εκφράζονται ως PFU/κύτταρο. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 3 ώρες με το ενοφθάλμισμα (DMEM-1% FBS- 1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη), που εμπεριείχε τον ιό, το οποίο μετέπειτα αντικαθιστούνταν από φρέσκο θρεπτικό μέσο.

2.4 Ανοσοφθορισμός

Αναφορικά με τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού, στρώθηκαν 10^5 U373MG κύτταρα και $0,8 \times 10^5$ HFFs σε καλυπτρίδες, οι οποίες είχαν τοποθετηθεί σε πιάτα 24-πηγαδιών (24 well-plates). Μετά από μία μέρα επώασης τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό είτε με $MOI=1$ PFU/ml. Τα κύτταρα επώαστηκαν για μία μέρα και μετά αφού πλύθηκαν με PBS (phosphate buffered saline), μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα μονιμοποίησης (4% παρα-φορμαλδεΐδη σε PBS) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού πλύθηκαν εκ νέου με PBS, προστίθεται το διάλυμα διαπερατοποίησης (permeabilization solution) [0,5 % Triton X-100 (Research Organics, Cat. N. 3103T) σε PBS]. Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, και στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα (blocking buffer) 2% w/v αλβουμίνης βόειου ορού (bovine serum albumin, BSA, Research Organics, Cat. N. 1328A) σε PBS, ώστε να καλυφθούν οι θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων. Μετέπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με το πρωτογενές (primary) ειδικό για την ιική πρωτεΐνη IE1 μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού, BS500 (Plachter et al. 1993) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφότου, πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις με το blocking buffer, τα κύτταρα επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα: CF 555 donkey anti-

mouse IgG (H+L) (Sigma-Aldrich, SAB4600060) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, αραιωμένο 1/500 σε 2% w/v BSA σε PBS. Ακολούθησαν εκ νέου πλύσεις με blocking buffer, και εν συνεχεία η χρώση των πυρήνων με DAPI (Invitrogen, Cat. N. T3605) σε αραιώση 1:1000 σε PBS. Αφού γίνουν πλύσεις με blocking buffer αρχικά, και με PBS μετέπειτα, τα κύτταρα αφήνονται να στεγνώσουν με τον αέρα και εν τέλει τοποθετούνταν σε γυάλινα πλακάκια μικροσκοπίου με τη χρήση mounting medium (ibidi, Cat. N. 50001). Τα πλακάκια παρατηρήθηκαν με τη χρήση ενός Leica DMIRE2 ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού και τραβήχτηκαν εικόνες με μια Leica DFC300 FX ψηφιακή κάμερα. Οι εικόνες εξάγονταν ως TIFF αρχεία και τέλος επεξεργάζονταν με Adobe Photoshop CC 2019.

2.5 Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης μετά από ανοσο-αποτύπωση (Western blot)

2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Αρχικά, τα U373MG κύτταρα στρώνονταν σε πιάτα 12-πηγαδιών σε αριθμό 2×10^5 . Για τη απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών, είτε τα εν λόγω κύτταρα ήταν μολυσμένα από τον ιό για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, είτε όχι, ξεπλένονταν με PBS μία φορά και μετέπειτα προστίθεντο σε αυτά το διάλυμα λύσης, το οποίο αποτελείται από το M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, 78501), εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών (PromoCell, Cat. N. PK-MB577-K271) σε αραιώση 1/500. Ενώ βρίσκονται στο διάλυμα λύσης, τα κύτταρα αποκολλώνται με τη βοήθεια ειδικού ξέστρου και παραμένουν στον πάγο για 15 λεπτά, με παράλληλη συχνή ανάδευση τους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 15000 rcf για 15 λεπτά στους 4°C , και εν συνεχεία συλλέγεται το υπερκείμενο, που περιέχει τις ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων, το οποίο φυλάσσεται στους -80°C .

2.5.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Αρχικά, απαιτείται ο σχεδιασμός μίας πρότυπης καμπύλης απορρόφησης, με βάση την οποία θα υπολογιστεί εν τέλει η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου ορού αλβουμίνης (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων: 125, 250, 500, 1000, $\mu\text{g/ml}$, αφού προστέθηκαν 5 μl από κάθε αραιώση και 295 μl Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (BIO-RAD, Cat. N. 5000205) σε πιάτα των 96 πηγαδιών (96-well-plates). Αντίστοιχες ήταν και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη

μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm (A_{595}) των πρωτεϊνικών δειγμάτων, για τα οποία η ποσότητα των 5 μ l προστέθηκε μετά από αραίωση 1/5 του αρχικού δείγματος. Εκτός αυτών, προστέθηκε με αντίστοιχο τρόπο και δείγμα διπλά αποσταγμένου νερού (ddH₂O), επονομαζόμενο ως τυφλό δείγμα. Ακολουθεί, ελαφριά ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή του πιάτου για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι προαναφερθείσες αραιώσεις έγιναν με ddH₂O ως διαλύτη και το κάθε δείγμα προστέθηκε εις διπλούν στο 96άρι πιάτο, ώστε να χρησιμοποιηθεί εν τέλει ο μέσος όρος των δύο τιμών απορρόφησης που προέκυπταν. Από την τιμή απορρόφησης του μέσου όρου, είτε των πρότυπων διαλυμάτων είτε των δειγμάτων άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, αφαιρέθηκε ο μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του τυφλού δείγματος. Αφού υπολογισθούν, μετά τη φωτομέτρηση στο μηχάνημα Multiscan FC (Thermo Scientific), οι τελικές τιμές απορρόφησης τόσο των προτύπων διαλυμάτων BSA, όσο και των πρωτεϊνών άγνωστης συγκέντρωσης, υπολογίζεται η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης, η οποία είναι της μορφής $y=ax+\beta$ (y: τελική τιμή A_{595} , x: συγκέντρωση σε μ g/ml), με βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των δειγμάτων ενδιαφέροντος αφού πολλαπλασιαστεί επί 5, λόγω του ότι τα πρωτεϊνικά δείγματα είχαν αραιωθεί κατά 5 φορές.

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία-SDS (SDS-PAGE)

Ο όγκος των πρωτεϊνικών δειγμάτων, που φορτώθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης [πήκτωμα επιστοιίβαξης (stacking gel): 5%, πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel): 10%], ήταν τέτοιος, ώστε η ποσότητα ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος, που φορτώνεται να είναι 20 μ g. Πριν φορτωθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα στο πήκτωμα, προστίθενται σε αυτά διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης 3x (loading buffer 3x) όγκου που ισοδυναμεί με το 1/2 του όγκου φόρτωσης του εκάστοτε πρωτεϊνικού δείγματος, και ακολουθεί θέρμανση στους 90° C για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί μετουσίωση των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα το loading buffer, περιέχει μερκαπτοαιθανόλη και SDS, που αποδιάτουν τις πρωτεΐνες, με το δεύτερο να τις φορτίζει και αρνητικά, με αποτέλεσμα το κριτήριο διαχωρισμού τους να είναι το μοριακό τους βάρος. Εκτός αυτού, το κυανό της βρωμοφαινόλης (χρωστική), που περιέχεται στο loading buffer, κάνει ορατό το σημείο στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες στο πήκτωμα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Μετά το φόρτωμα των δειγμάτων, το πήκτωμα, αφού εισαχθεί σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (BIO-RAD), ηλεκτροφορείται σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (running buffer 1x), με την τάση να ρυθμίζεται στα 80 V, κατά τη διάρκεια που οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο πήκτωμα επιστοιίβαξης, του οποίου ο ρόλος είναι η ομαλή εισαγωγή των πρωτεϊνών στο

πήκτωμα διαχωρισμού, όπου όταν εισαχθούν σε αυτό η τάση ρυθμίζεται στα 100 V, μέχρι η χρωστική να φτάσει στο κάτω άκρο του πήκτωματος. Έπειτα, το πήκτωμα επιστοιβάξης απομακρύνεται, και το πήκτωμα διαχωρισμού υφίσταται ανοσο-αποτύπωση (Western blot).

2.5.4 Ανοσο-αποτύπωση (Western blot)

Η διαδικασία της ανοσο-αποτύπωσης περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη PVDF (BIORAD, Cat. N. 1620177) με τη βοήθεια ειδικής συσκευής (BIO-RAD), σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, συναρμολογείται το επονομαζόμενο “sandwich”, καθώς το πήκτωμα και η μεμβράνη τοποθετούνται μεταξύ δύο σφουγγαριών, εσωτερικά των οποίων τοποθετούνται δύο χαρτιά Whatman. Πριν όλα τα παραπάνω χρησιμοποιηθούν για τη συναρμολόγηση του “sandwich”, εμβαπτίζονται σε διάλυμα μεταφοράς, με τη μεμβράνη PVDF, να εμβαπτίζεται πριν από αυτό το βήμα σε μεθανόλη για 2 λεπτά. Μετέπειτα το “sandwich” τοποθετείται στην ειδική συσκευή, όπου προστίθεται το transfer buffer. Εν συνεχεία, παροχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα 350 mA για 2 ώρες στους 4° C, με σκοπό τη μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη.

2.5.4 Ανοσο-ανίχνευση

Στόχος της ανοσο-ανίχνευσης είναι η ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, η οποία βρίσκεται ακινητοποιημένη στη μεμβράνη. Αρχικά μπλοκάρονται οι θέσεις πρόσδεσης της μεμβράνης, ώστε το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος να μην προσδεθεί μη-ειδικά σε αυτές. Το μπλοκάρισμα της μεμβράνης επιτυγχάνεται με επώαση της σε blocking buffer (5% w/v αφυδατωμένου-αποβουτυρωμένου γάλακτος ή BSA σε TBS-T) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού ακολουθήσουν 3 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μία με TBS-T (1x Tris Buffer Saline-0,1% Tween-20) , η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα για 15-20 ώρες στους 4° C, που στοχεύει τη πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Παρακάτω αναφέρονται τα πρωτογενή αντισώματα, και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν:

1. Anti-EZH2 rabbit (Cell Signaling, 5246S), 1:1000 αραιωμένο σε διάλυμα 5% BSA σε TBS-T
2. Anti-RhoA rabbit (Cell Signaling, 2117S), 1:1000 αραιωμένο σε διάλυμα 5% BSA σε TBS-T
3. Anti-β-Actin mouse (Santa Cruz, sc-47778), 1:1000 αραιωμένο σε διάλυμα 3% BSA σε TBS-T

4. Anti-HCMV IE1 mouse (BS500), χρησιμοποιήθηκε χωρίς αραιώση (**Plachter et al. 1993**)

Πρέπει να αναφερθεί ότι η επιλογή της χρήση γάλακτος ή BSA στο blocking buffer των παραπάνω αντισωμάτων σχετιζόταν αντίστοιχα με το αν το διάλυμα αραιώσης τους περιείχε γάλα ή BSA. Αντίστοιχα έγινε και η επιλογή όσον αφορά το διάλυμα αραιώσης των δευτερογενών αντισωμάτων. Αναφορικά με το αντίσωμα BS500, χρησιμοποιήθηκε γάλα. Όταν τελειώσει ο χρόνος επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα, και ακολουθήσουν 3 πλύσεις με TBS-T διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα για διάρκεια μίας ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody) συνδέεται με το πρωτογενές αντίσωμα, καθώς αναγνωρίζει την F_c περιοχή όλων των αντισωμάτων του ζώου από το οποίο παράχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα. Παρακάτω αναφέρονται τα δευτερογενή αντισώματα, στις αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Goat Anti-mouse IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L (Chemicon®, Cat. N. AP124P), αραιωμένο 1:10000 σε 1% διάλυμα αφυδατωμένου-αποβουτυρωμένου γάλακτος ή BSA σε TBS-T
2. Goat Anti-rabbit IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L (Chemicon®, Cat. N. AP132P), αραιωμένο 1:10000 σε 1% διάλυμα BSA σε TBS-T

Μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, ακολούθησαν 3 πλύσεις με TBS-T διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, και εν συνεχεία η μεμβράνη επώαστηκε με το αντιδραστήριο Immobilon® Forte Western HRP Substrate (Cat. N. WBLUF0100), το οποίο περιέχει υπόστρωμα του ενζύμου της υπεροξειδάσης (horseradish peroxidase, HRP), η οποία είναι συνδεδεμένη με τα χρησιμοποιούμενα δευτερογενή αντισώματα. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης του υποστρώματος με την υπεροξειδάση, είναι η παραγωγή χημειοφωταύγειας (chemiluminescence), η οποία ανιχνεύτηκε μέσω του μηχανήματος ChemiDoc™ MP System (Cat. No 170-8280, Bio-Rad) και του λογισμικού Image Lab software (Bio-Rad).

2.5.5 Ποσοτικοποίηση, κανονικοποίηση και στατιστική ανάλυση

Αφού πραγματοποιήθηκε η λήψη των εικόνων με τη βοήθεια του Image Lab software, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση των απεικονιζόμενων ζωνών που αφορούσαν τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος (RhoA, EZH2), αλλά και της b-Actin, που χρησιμοποιήθηκε ως loading control. Η ποσοτικοποίηση τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού ψηφιακής επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνας ImageJ, το οποίο χρησιμοποιεί ως ποσοτική παράμετρο την πυκνότητα των απεικονιζόμενων ζωνών. Οι αριθμητική τιμή που προέκυπτε για κάθε ζώνη που αφορούσε την

εκάστοτε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος σε μία συγκεκριμένη συνθήκη μελέτης, διαιρούνταν με την τιμή που προέκυπτε από τη ζώνη που αφορούσε τη β-Actin στην ίδια συνθήκη μελέτης, ώστε να κανονικοποιηθούν οι προκύπτουσες αριθμητικές τιμές. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι συνθήκες μελέτης αφορούσαν U373MG κύτταρα, τα οποία είτε δεν είχαν μολυνθεί με τον HCMV, είτε είχαν μολυνθεί με τη πορεία της μόλυνσης να διακόπτεται στα χρονικά διαστήματα των 6, 12, 24, 48, 72 ωρών. Επίσης, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά τρεις φορές. Η σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης των ενδιαφερόμενων πρωτεϊνών (RhoA, EZH2) στις διαφορετικές συνθήκες μελέτης και η διαπίστωση της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών στη πρωτεϊνική έκφραση, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 8.0.1. Λόγω του ότι οι τρεις προκύπτουσες, μετά την κανονικοποίηση, τιμές για κάθε συνθήκη δεν ήταν βέβαιο ότι ακολουθούσαν την κανονική κατανομή (normal distribution), η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών έγινε μη-παραμετρικά με paired-Friedman test.

2.5.6 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσο-αποτύπωση

1. Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών (loading buffer) 3×: 0.2 M Tris-HCl, 6% SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0.03 % κυανού της βρωμοφαινόλης
2. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating or resolving gel buffer): 1.5 M Tris-HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
3. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοιβαξης πρωτεϊνών (stacking gel buffer): 1M Tris-HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
4. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) πρωτεϊνών 10×: 0.25mM Tris-base, 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8.3
5. Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη (transfer buffer) 1×: 0.025mM Tris-base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH 8.3
6. Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης (TBS-T): TBS 1x (20mM Tris base, 137mM NaCl, pH 7,6), 0.1% Tween (v/v)

2.6 Παρατήρηση σχηματισμού συσσωματωμάτων

Αρχικά, τα U373MG κύτταρα στρώνονταν σε πιάτα 12-πηγαδιών σε αριθμό 2×10^5 , και την επόμενη μέρα, είτε μολύνονταν με τον HCMV με MOI=1 PFU/κύτταρο με τη μόλυνση να διακόπτεται σε χρονικά διαστήματα των 6, 12, 24, 48, 72 ωρών μετά την έκθεση των κυττάρων στον ιό (hours post infection, hpi), είτε στρώθηκαν για διάστημα 72 ωρών χωρίς να μολυνθούν (MOCK). Μετέπειτα, παρατηρήθηκε η

μορφολογία των U373MG κυττάρων στα παραπάνω χρονικά σημεία της μόλυνσης, αλλά και στη συνθήκη μη μόλυνσης τους μέσω ενός Leica DMIRE2 ανάστροφου μικροσκοπίου φθορισμού. Συνολικά τραβήχτηκαν 10 εικόνες για κάθε συνθήκη με μια Leica DFC300 FX ψηφιακή κάμερα, χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό μεγεθυντικής ισχύος 10x. Οι λήψεις των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκαν ενώ τα κύτταρα βρίσκονταν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Οι εικόνες εξάγονταν ως TIFF αρχεία και τέλος επεξεργάζονταν με Adobe Photoshop CC 2019. Τέλος, παρατηρήθηκε και αναλύθηκε ποιοτικά σε κάθε συνθήκη η μορφολογία των U373MG, και ειδικότερα η ικανότητα τους να συσσωματώνονται σε “σφαίρες”.

2.7 Υλικά

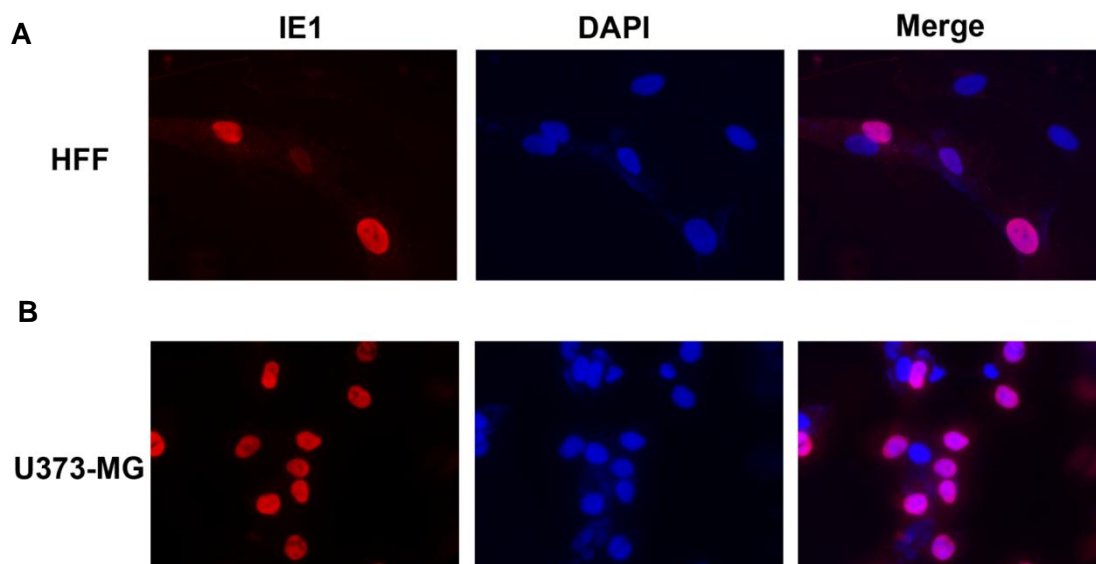
Παρακάτω καταγράφονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία με την εταιρεία προέλευσης τους, με εξαίρεση εκείνα που αναγράφονται στο περιεχόμενο του παραπάνω κειμένου.

- OmniPur[®] Acrylamide Bis-acrylamide, 29:1, 40% Solution (Calbiochem)
- Ammonium sulphate (APOLLO SCIENTIFIC, IN1084)
- TEMED (SIGMA-ALDRICH, T9281)
- Tris-HCL (Scharlau, TR04251000)
- SDS (SIGMA-ALDRICH, L4509)
- β-mercaptoethanol ≥99.0% (SIGMA-ALDRICH, M6250)
- Glycerol (SIGMA-ALDRICH, G7757)
- Bromophenol blue (Merck, 8122)
- Tris-Base (Calbiochem, 648310)
- Glycine (APOLLO SCIENTIFIC, BIG0709)
- Methanol (Honeywell, 32213)
- NaCl (Iach-ner)
- Tween 20 (Research Organics)
- BlueEasy Prestained Protein Marker (Nippon Genetics, MWP06)

3. Αποτελέσματα

3.1 Διαπίστωση επιτυχούς μόλυνσης των U373MG κυττάρων

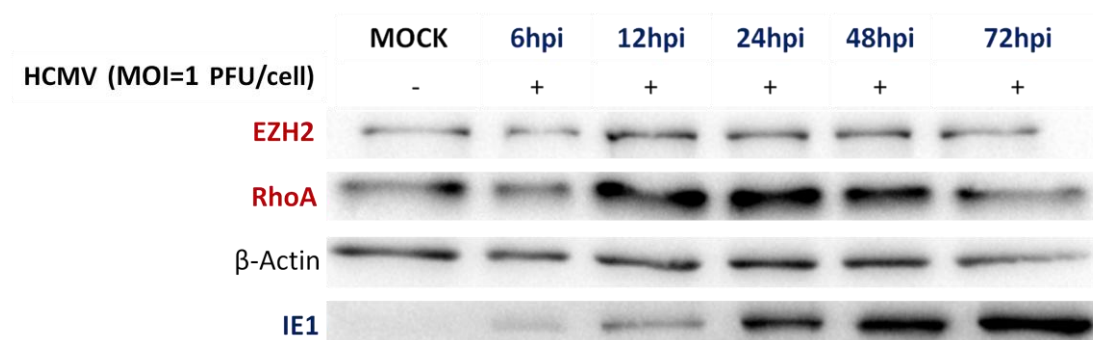
Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα U373MG μολύνονται επιτυχώς από τον HCMV, τα εν λόγω κύτταρα αφού στρώθηκαν σε καλυπτρίδες, που βρίσκονταν σε 24-well plates, μολύνθηκαν με MOI=1 PFU/κύτταρο. Μία μέρα μετά τη μόλυνση τους (1 day post infection, 1dpi), τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και μετέπειτα έγινε χρώση τους για την ιική πρωτεΐνη IE1 (Immediate Early 1 protein) του HCMV, η οποία εκφράζεται γενικώς στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων στο άμεσο-πρώιμο στάδιο της μόλυνσης, με την έκφραση της να είναι απαραίτητη, ώστε ο ιός να ακολουθήσει λυτική πορεία μόλυνσης (Εικόνα 8B). Μετέπειτα, μετά από παρατήρηση 10 διαφορετικών πεδίων της καλυπτρίδας με αντικειμενικό φακό μεγεθυντικής ισχύος 10x, μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που είχαν χρωσθεί για την IE1 σε κάθε πεδίο, και μετέπειτα υπολογίσθηκε ο μέσος όρος για τα 10 πεδία, διαπιστώνοντας ότι περίπου το 40% των U373MG κυττάρων είχαν χρωσθεί για την IE1, πράγμα το οποίο απέδειξε την επιτυχή μόλυνση τους από τον HCMV, αλλά και την ικανότητα του ιού να ακολουθεί λυτική πορεία μόλυνσης σε αυτά. Εκτός αυτού, η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για HFFs (Εικόνα 8A), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό control, καθώς αποτελούν το καταλληλότερο σύστημα για τη μελέτη της λυτικής μόλυνσης του HCMV.



Εικόνα 8. Ένα σημαντικό ποσοστό των HFFs και U373MG κυττάρων μολύνθηκε επιτυχώς (μωβ χρώμα) από τον HCMV. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό HCMV AD169 με MOI=1 PFU/ml. Χρώσθηκαν για την ιική πρωτεΐνη IE1 (κόκκινο) μία μέρα μετά τη μόλυνση τους. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI (μπλε). Οι παραπάνω εικόνες λήφθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό μεγεθυντικής ισχύος 63x.

3.2 Η μόλυνση με HCMV μεταβάλλει την πρωτεϊνική έκφραση της RhoA GTPάσης και του EZH2 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG κυττάρων.

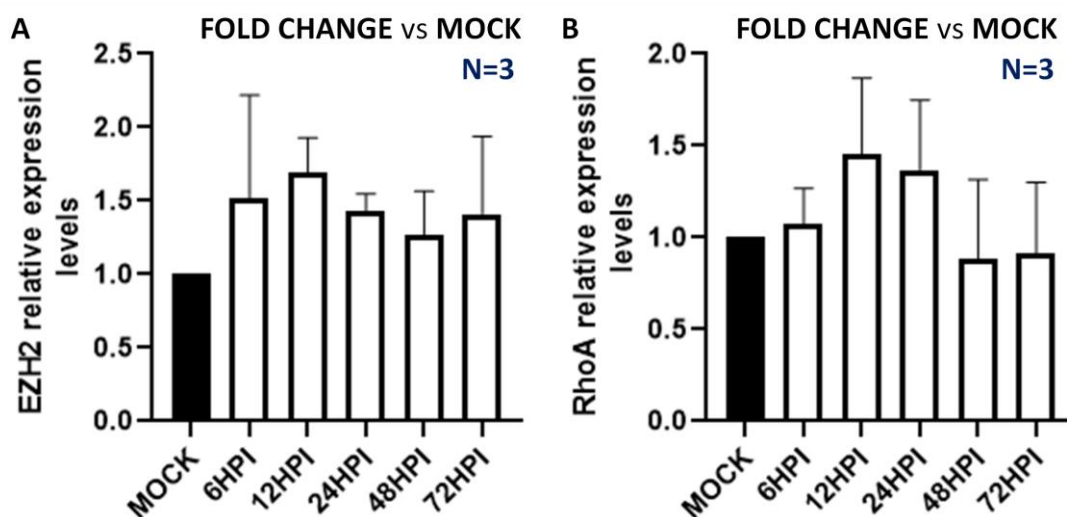
Αφού διαπιστώθηκε ότι ο HCMV μολύνει επιτυχώς τα U373MG κύτταρα, ερευνήθηκε η επίδραση της μόλυνσης των συγκεκριμένων κυττάρων στη πρωτεϊνική έκφραση τόσο της RhoA GTPάσης, όσο και του επιγενετικού παράγοντα EZH2. Οπότε, αφού τα U373MG μολύνθηκαν με τον HCMV με MOI=1 PFU/κύτταρο για χρονικά διαστήματα που αφορούσαν 6, 12, 24, 48, και 72 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων στον ιό (hours post infection, hpi), ανιχνεύτηκε η πρωτεϊνική έκφραση των ενδιαφερόμενων πρωτεϊνών μετά από Western blot (Εικόνα 9), και ως control χρησιμοποιήθηκαν μη μολυσμένα U373MG κύτταρα (MOCK). Επίσης ως control για τη διαπίστωση της χρονικά επιτυχούς προόδου της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκε η προαναφερθείσα ιική πρωτεΐνη IE1, της οποίας η έκφραση όντως αυξανόταν, όσο αυξανόταν και το χρονικό σημείο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η μόλυνση με HCMV των U373MG κυττάρων οδήγησε σε μεταβολή της πρωτεϊνικής έκφρασης του EZH2 και της RhoA στα διαφορετικά χρονικά σημεία της μόλυνσης. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό HCMV AD169 με MOI=1 PFU/κύτταρο και η μόλυνση διακόπηκε στα χρονικά σημεία των 6, 12, 24, 48, 72 ωρών μετά από την έκθεση των κυττάρων στον ιό. Ως control χρησιμοποιήθηκαν μη μολυσμένα U373MG (MOCK). Η πρωτεϊνική έκφραση των EZH2 και RhoA ανιχνεύθηκε μετά από Western blot. Ως loading control χρησιμοποιήθηκε η β-Actin και ως control για τη διαπίστωση της χρονικά επιτυχούς προόδου της μόλυνσης χρησιμοποιήθηκε η ιική πρωτεΐνη IE1.

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές, οι οποίες ήταν ανεξάρτητες μεταξύ τους. Μετά την οπτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των ενδιαφερόμενων πρωτεϊνών (EZH2, RhoA) για τις διαφορετικές συνθήκες μελέτης, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση τους, χρησιμοποιώντας ως παράμετρο τη πυκνότητα των απεικονιζόμενων ζωνών του Western blot, με τις

προκύπτουσες τιμές να κανονικοποιούνται, μετά από διαίρεση της κάθε μίας με την τιμή που αφορούσε τη β -Actin (loading control) για την αντίστοιχη συνθήκη μελέτης. Εν συνεχεία, ελέγχθηκε αν οι 3 προκύπτουσες τιμές για κάθε συνθήκη μελέτης ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, πράγμα το οποίο δεν μπορούσε να επιβεβαιωθεί με βεβαιότητα. Συνεπώς, η διερεύνηση για το αν οι μέσοι όροι των τιμών που προέκυπταν για κάθε συνθήκη είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ελέγχθηκε μη-παραμετρικά με paired Friedman-test, χωρίς να αποδειχθεί ότι υπάρχει στατιστική σημαντικότητα στις διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών μελέτης. Τέλος η πρωτεϊνική έκφραση, τόσο του EZH2, όσο και της RhoA στα διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG, απεικονίζεται (Εικόνα 9) ως η σχετική διαφορά της έκφρασης τους στο εκάστοτε χρονικό σημείο ως προς την έκφραση τους στη συνθήκη μη μόλυνσης (MOCK).



Εικόνα 9. Η σχετική διαφορά της πρωτεϊνικής έκφρασης του EZH2 (αριστερά) και της RhoA (δεξιά) στα διαφορετικά χρονικά σημεία της μόλυνσης των U373MG κυττάρων συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα (MOCK). Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό HCMV AD169 με MOI=1 PFU/κύτταρο για χρονικά σημεία που αντιστοιχούν σε 6, 12, 24, 48, 72 ώρες μετά την έκθεση τους στον ιό (hours post infection, hpi). Η πρωτεϊνική έκφραση ανιχνεύθηκε μετά από Western blot. **(A)** Η έκφραση του EZH2 είναι αυξημένη σε όλα τα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μόλυνσης συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα. **(B)** Η έκφραση της RhoA GTPάσης μεταβάλλεται δυναμικά κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Τα δεδομένα στο γράφημα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος των τιμών από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα για την κάθε συνθήκη μόλυνσης \pm την τυπική απόκλιση (standard deviation, SD)

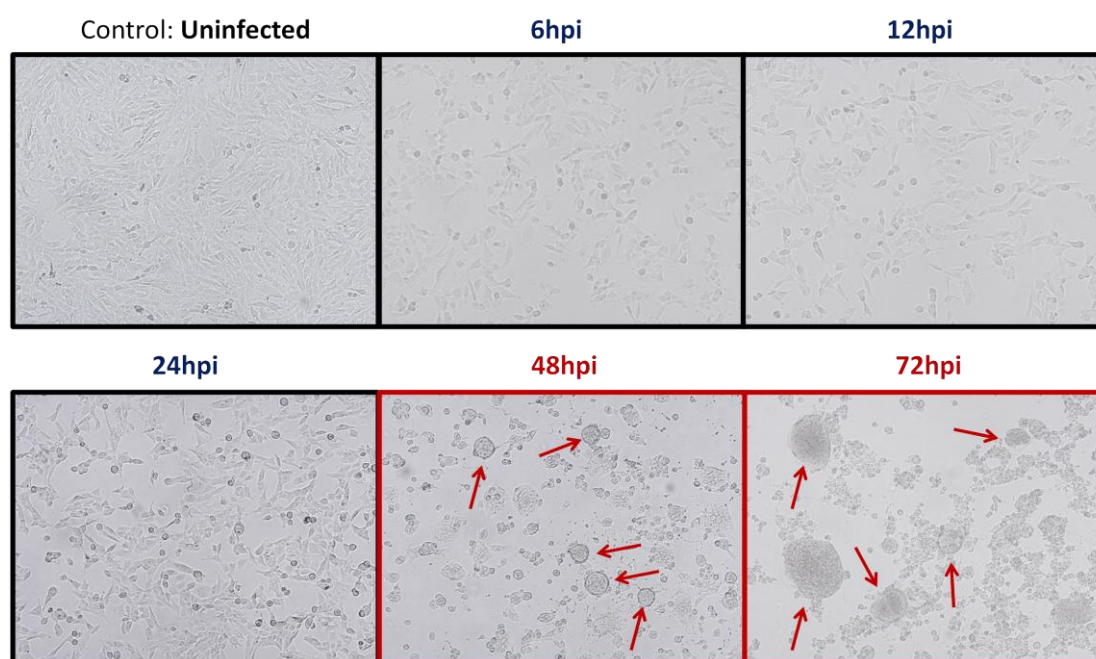
Αναφορικά με τη πρωτεϊνική έκφραση του EZH2, παρατηρείται ότι είναι αυξημένη σε όλα τα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG κυττάρων συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα. Βέβαια, ενώ η έκφραση του είναι αρκετά αυξημένη στα αρχικά χρονικά σημεία της μόλυνσης (6 hpi, 12 hpi), εμφανίζει μία τάση μείωσης στα μεταγενέστερα χρονικά σημεία της μόλυνσης, χωρίς όμως να μειώνεται στα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται στη περίπτωση των μη μολυσμένων κυττάρων. Συνεπώς, η μόλυνση με HCMV οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του EZH2 κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG, με τη μεγαλύτερη διαφορά να εμφανίζεται στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση των συγκεκριμένων κυττάρων από τον ιό (Εικόνα 9A).

Σχετικά με τη RhoA, η μόλυνση των κυττάρων με τον HCMV δε φαίνεται να οδηγεί σε αισθητή μεταβολή της έκφρασης της στο πολύ πρώιμο στάδιο των 6 ωρών μετά τη μόλυνση. Όμως η έκφραση της μεταβάλλεται δυναμικά στα επόμενα στάδια της μόλυνσης, καθώς στα μεταγενέστερα χρονικά σημεία των 12 και 24 ωρών είναι αρκετά αυξημένη, ενώ στο ακόλουθο χρονικό σημεία των 48 ωρών μετά τη μόλυνση (48 hpi) μειώνεται απότομα, με τα ίδια επίπεδα έκφρασης της να διατηρούνται και στο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά τη μόλυνση (72 hpi). Τα επίπεδα έκφρασης της στις 48 hpi, 72 hpi ήταν ελάχιστα χαμηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνταν στα μη μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 9B).

3.3 Η μόλυνση με HCMV οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των U373MG κυττάρων

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης του HCMV στη μορφολογία των U373MG κυττάρων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, αρχικά, τα εν λόγω κύτταρα είτε μολύνθηκαν με MOI=1 PFU/κύτταρο για τα χρονικά σημεία των 6, 12, 24, 48, 72 ωρών, είτε παρέμειναν χωρίς την παρουσία ιού (uninfected) για 72 ώρες στο πηγάδι καλλιέργειας. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο, και επίσης έγινε λήψη εικόνων από 10 πεδία του πηγαδιού καλλιέργειας, σε κάθε ένα από τα προαναφερθέντα χρονικά σημεία της μόλυνσης, και από τη συνθήκη μη-μόλυνσης, ενώ τα κύτταρα επωάζονταν στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Όπως φαίνεται και στις ενδεικτικές εικόνες, που παρουσιάζονται στην εικόνα 10, η μόλυνση δε φαίνεται να οδηγεί σε αλλαγή του φαινοτύπου των U373MG στα χρονικά σημεία που αφορούν 6, 12, 24 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων στον ιό συγκριτικά με τα μη-μολυσμένα κύτταρα, με τη μόνη διαφορά να είναι ότι τα μη-μολυσμένα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί στο διάστημα των 72 ωρών καλλιέργειας τους, με αποτέλεσμα να έχουν καλύψει εξ ολοκλήρου τον πυθμένα της φλάσκας (100% confluency). Όμως,

στο χρονικό σημείο των 48 ωρών μετά τη μόλυνση, έχει αρχίσει να διαταράσσεται ο φαινότυπος των U373MG κυττάρων, καθώς συσσωματώνονται σε “σφαίρες” (Εικόνα 10) , χάνοντας παράλληλα την ικανότητα προσκόλλησης τους στον πυθμένα της φλάσκας. Επιπλέον, στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά τη μόλυνση, τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου φαινοτύπου φαίνεται ότι επιδεινώνονται, καθώς παρατηρήθηκε τόσο αύξηση του μεγέθους των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων (Εικόνα 10), όσο και αυξημένη τάση αποκόλλησης τους από τον πυθμένα της φλάσκας.



Εικόνα 10. Τα U373MG κύτταρα συσσωματώνονται σε “σφαίρες” μετά από μόλυνση με HCMV. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό HCMV AD169 με MOI=1 PFU/κύτταρο, και οι εικόνες λήφθηκαν στα χρονικά σημεία που αντιστοιχούν σε 6, 12, 24, 48, 72 ώρες από την έκθεση τους στον ιό (hours post infection, hpi). Η εικόνα που αφορά τα μη-μολυσμένα (uninfected) U373MG λήφθηκε μετά από 72 ώρες επώασης τους. Τα U373MG κύτταρα συσσωματώνονται σε “σφαίρες” στο χρονικό σημείο των 48 ωρών μετά τη μόλυνση (48 hpi), με το μέγεθος τους να αυξάνεται στο μεταγενέστερο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά τη μόλυνση (72 hpi). Οι παραπάνω εικόνες λήφθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό μεγεθυντικής ισχύος 10x. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα σχηματιζόμενα συσσωματώματα.

4. Συζήτηση

Ο HCMV είναι ευρέως αποδεδειγμένο ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της κακοήθειας του καρκίνου του γλοιοβλαστώματος μέσω της ογκοτρόπου δράσης του (Joseph et al. 2017). Όπως, ο κάθε ιός, έτσι και ο HCMV χρησιμοποιεί κυτταρικούς μηχανισμούς των κυττάρων που μολύνει, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό και κατά συνέπεια την εξάπλωση του (Mocarski et al. 2013). Αναφορικά με τον HCMV, ορισμένα από τα κυτταρικά μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά με σκοπό την πρόοδο της μόλυνσης του σε κύτταρα ινοβλαστών, είναι ο επιγενετικός παράγοντας EZH2 (Sourvinos et al. 2014; Svrlanska et al. 2019) και η πρωτεΐνη ρύθμισης του κυτταροσκελετού, RhoA GTPάση (Wang et al. 2005). Επιπροσθέτως, τόσο ο EZH2, όσο και η RhoA GTPάση εμπλέκονται σε κυτταρικές διεργασίες που σχετίζονται με την εξέλιξη της κακοήθειας της νόσου του γλοιοβλαστώματος (Yin, Qiu, and Peng 2016; Y. Chen et al. 2021; Al-Koussa et al. 2020; Al-Qahtani et al. 2020; Tseliou et al. 2016). Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, η συγκεκριμένη μελέτη έχει σκοπό να αναδείξει την επίδραση προκαλεί ο HCMV στην πρωτεϊνική έκφραση του EZH2 και της RhoA κατά τη διάρκεια της λυτικής πορείας μόλυνσης του στα U373MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Εκτός αυτού, ερευνήθηκε και η ικανότητα του ιού να οδηγεί σε αλλαγή της μορφολογίας των U373MG κυττάρων.

Όπως προαναφέρθηκε ο HCMV οδηγεί σε φαινοτυπική αλλαγή των U373MG κυττάρων, καθώς δύο ημέρες μετά τη μόλυνση των συγκεκριμένων κυττάρων, είχε αρχίσει να χάνεται η ικανότητα τους να συντάσσονται ως μονοστιβάδα κυττάρων, και εκτός αυτού συσσωματώνονταν σε “σφαίρες” χάνοντας παράλληλα την ικανότητα προσκόλλησης τους στον πυθμένα της φλάσκας (Εικόνα 10). Οι συγκεκριμένες φαινοτυπικές αλλαγές αποτελούν χαρακτηριστικά του φαινοτύπου των glioblastoma stem cells. Επίσης, έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες, ότι σε προερχόμενα από ιστούς γλοιοβλαστώματος κύτταρα γλοιοβλαστώματος (primary glioblastoma cells) συν-εκφράζονται οι άμεσα-πρώιμα εκφραζόμενες (IE) πρωτεΐνες, IE1 και IE2 του HCMV με μόρια που αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες των glioblastoma stem cells (GSCs), όπως ο CD133, Nestin, και Sox-2 (Soroceanu et al. 2015; Fornara et al. 2016). Επιπλέον, ασθενείς με μεγαλύτερο ποσοστό συν-έκφρασης των IE1 και IE2 και του δείκτη CD133, εμφανίζουν λιγότερο χρόνο ολικής επιβίωσης (Fornara et al. 2016). Επίσης, η μόλυνση primary κυττάρων γλοιοβλαστώματος in vitro, οδηγεί σε αύξηση δεικτών που αφορούν τα GSCs, όπως CD133, Notch1, Sox2, Oct4, Nestin, στην ικανότητα τους να σχηματίζουν “σφαίρες”, που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των GSCs, καθώς και στην απόκτηση ανθεκτικότητας έναντι του

χημειοθεραπευτικού φαρμάκου της Τεμοζολομίδης, με την ευαισθησία έναντι αυτής να ανακτάται μετά από έκθεση των κυττάρων στο αντι-ϊικό φάρμακο Ganciclovir (GCV) (Liu et al. 2017; Fornara et al. 2016). Επιπροσθέτως, μία μελέτη ανέδειξε το σημαντικό ρόλο των IE1 και IE2 πρωτεϊνών του HCMV στη ρύθμιση του GSC φαινοτύπου (Soroceanu et al. 2015). Βέβαια, μέχρι στιγμής, δε μπορεί να διαπιστωθεί εάν ο HCMV οδηγεί ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα να αποκτήσουν cancer stem-cell φαινότυπο, ή απλώς ευνοεί τη διατήρηση των ήδη υπαρχόντων χαρακτηριστικών των cancer stem-cells, τα οποία μολύνει. Δεδομένης της εμπλοκής του HCMV στη ρύθμιση των ιδιοτήτων των glioblastoma-stem-cell, όπως της ικανότητα τους να σχηματίζουν “σφαίρες”, είναι πιθανό η απόκτηση της ικανότητας των μελετώμενων στη συγκεκριμένη εργασία U373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος να συσσωματώνονται σε “σφαίρες” μετά από μόλυνση με τον HCMV να αποτελεί ακόμα μία ένδειξη της ικανότητας του συγκεκριμένου ιού να επάγει το συγκεκριμένο φαινότυπο. Βέβαια, για να μπορέσει να υποστηριχθεί αυτό με βεβαιότητα, θα πρέπει να ακολουθήσει περαιτέρω διερεύνηση ως προς το αν η μόλυνση με HCMV των U373MG οδηγεί σε αύξηση δεικτών που αφορούν τα GSCs (π.χ. CD133), σε μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ή και σε επαγωγή της ικανότητα αυτό-ανανέωσης των συγκριμένων κυττάρων, καθώς οι παραπάνω ιδιότητες αποτελούν χαρακτηριστικά των GSCs.

Σχετικά με την επίδραση της μόλυνσης με HCMV των U373MG κυττάρων στην πρωτεϊνική έκφραση του επιγενετικού παράγοντα EZH2 και της RhoA GTPάσης, παρατηρήθηκε ότι υπάρχει διακύμανση της έκφρασης τους στα διαφορετικά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, χωρίς βέβαια κάτι τέτοιο να μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα, λόγω του ότι δεν αποδείχθηκε ότι οι συγκεκριμένες διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές. Παρόλα αυτά, οι προκύπτουσες μεταβολές στη πρωτεϊνική έκφραση, μπορούν να αποτελέσουν σημαντικές ενδείξεις για μελλοντική περαιτέρω διερεύνηση.

Όσον αφορά τον EZH2, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ήταν αυξημένη σε όλα τα χρονικά σημεία (6 hpi έως 72 hpi) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG, συγκριτικά με τα μη μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 9A). Το γεγονός ότι ο HCMV οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του EZH2 συνάδει και με τη περίπτωση των ινοβλαστών, όπου η μόλυνση με το συγκεκριμένο ιό, οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου παράγοντα τόσο σε άμεσα-πρώιμο (IE) (Sourvinos et al. 2014), όσο και σε ενδιάμεσο στάδιο (E) της μόλυνσης (Svrlanska et al. 2019), με τον EZH2 να ευνοεί έμμεσα την έκφραση των απαραίτητων για τη πορεία του λυτικού κύκλου ζωής άμεσα-πρώιμων (IE) γονιδίων του ιού (Sourvinos et al. 2014), αλλά

και να εμπλέκεται στην επιτέλεση της διαδικασίας της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος (**Svrlanska et al. 2019**). Συνεπώς, ο EZH2 ενδέχεται να έχει αντίστοιχο ρόλο και στη περίπτωση των U373MG κυττάρων, ευνοώντας την πρόοδο της μόλυνσης του HCMV στα συγκεκριμένα κύτταρα. Βέβαια, ενώ στο αρχικό χρονικό σημείο (6 hpi, 12 hpi) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG αυξάνεται απότομα η έκφραση του EZH2, ακολουθεί μία τάση μείωσης της στα μεταγενέστερα χρονικά σημεία (24 hpi, 48 hpi, 72 hpi), χωρίς βέβαια να μειώνεται σε βαθμό που να αγγίζει τα επίπεδα των μη-μολυσμένων κυττάρων. Αποτελεί, συνεπώς, σημαντικό ερευνητικό στόχο η αντιστοίχιση του κάθε χρονικού σημείου με το ακριβές σημείο στη πορεία του κύκλου ζωής του ιού στα συγκεκριμένα κύτταρα, αλλά και η διερεύνηση του τρόπου εμπλοκής του EZH2 σε αυτόν.

Η πρωτεϊνική έκφραση της RhoA GTPάσης μεταβάλλεται δυναμικά κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των U373MG κυττάρων με τον HCMV (Εικόνα 9B). Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η έκφραση της ολικής RhoA, και όχι της ενεργοποιημένης, δηλαδή της RhoA που είναι συνδεδεμένη με GTP. Αν και στο πολύ πρώιμο χρονικό σημείο της μόλυνσης των 6 ωρών μετά τη μόλυνση η έκφραση της ολικής RhoA δε μεταβάλλεται αισθητά συγκριτικά με τη συνθήκη μη-μόλυνσης, η έκφραση της είναι αρκετά αυξημένη στα μεταγενέστερα χρονικά σημεία των 12 και 24 ωρών μετά τη μόλυνση (hpi), ενώ ακολουθεί απότομη μείωση της στο χρονικό σημείο των 48 ωρών μετά τη μόλυνση, με τα επίπεδα έκφρασης να διατηρούνται στα ίδια επίπεδα και 72 ώρες μετά τη μόλυνση. Ίσως, η απότομη μείωση της RhoA, που επέρχεται κατά το χρονικό διάστημα των 48 ωρών, και διατηρείται και στο μεταγενέστερο στάδιο των 72 ωρών μετά τη μόλυνση, να συνδέεται με το γεγονός ότι στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα παρατηρείται και η “επιλογή” των U373MG κυττάρων να συσσωματώνονται σε “σφαίρες” (Εικόνα 10) και να χάνουν την ικανότητα προσκόλλησης στο πυθμένα της φλάσκας, καθώς η απόκτηση της συγκεκριμένης μορφολογίας προϋποθέτει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, που αποτελεί γενικώς μία από τις κύριες λειτουργίες της RhoA. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι η μόλυνση με HCMV δεν οδήγησε σε μείωση της ολικής RhoA GTPάσης, όπως έχει παρατηρηθεί στη περίπτωση ινοβλαστών (**Wang et al. 2005**). Βέβαια, ενδέχεται ο HCMV να οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα της RhoA στα U373MG κύτταρα, όπως έχει διαπιστωθεί στη περίπτωση των ινοβλαστών σε άλλες μελέτες (**μη δημοσιευμένα αποτελέσματα**) (**Wang et al. 2005**), πράγμα το οποίο αξίζει να ερευνηθεί μελλοντικά. Εκτός αυτού, όπως και στη περίπτωση του EZH2, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί σε ποιο σημείο στη πορεία του κύκλου ζωής του HCMV στα U373MG κύτταρα αντιστοιχεί το κάθε χρονικό σημείο μελέτης κατά τη

διάρκεια της μόλυνσης, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω και ο ακριβής τρόπος εμπλοκής της RhoA σε κάθε ένα από αυτά.

Συνοψίζοντας, η αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης τόσο του EZH2 όσο και η δυναμική μεταβολή της έκφρασης της RhoA GTPάσης κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με HCMV των U373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος, αποτελούν σημαντικές ενδείξεις για τη πιθανή εμπλοκή των συγκεκριμένων παραγόντων στον κύκλο ζωής του ιού στο γλοιοβλάστωμα. Απαιτείται, βέβαια, περαιτέρω διερεύνηση όσον αφορά τον ακριβή τρόπο εμπλοκής των συγκεκριμένων παραγόντων στο κύκλο ζωής του ιού σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Ακόμα, ισχυρό είναι το ενδεχόμενο, ο HCMV να επάγει τον glioblastoma stem cell φαινότυπο στα U373MG κύτταρα, καθώς η μόλυνση με αυτόν οδήγησε τα συγκεκριμένα κύτταρα να συσσωματώνονται σε “σφαίρες”, πράγμα το οποίο αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα των GSCs. Το συγκεκριμένο εύρημα, καθώς και οι προϋπάρχουσες ερευνητικές ανακαλύψεις γύρω από την ικανότητα του HCMV να ευνοεί την ανάπτυξη και τη διατήρηση του GSC φαινότυπο, μπορούν να εμπλουτιστούν με τη διερεύνηση περισσότερων στοιχείων που να διαλευκάνουν την πιθανή ιδιότητα του ιού να επάγει την απόκτηση συγκεκριμένου φαινοτύπου από ήδη διαφοροποιημένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, και όχι απλά να ευνοεί την ανάπτυξη και τη διατήρηση αυτού στα GSCs που μολύνει. Επιπροσθέτως, είναι σημαντικό να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή τόσο του EZH2, όσο και της RhoA GTPάσης στην ιδιότητα των U373MG να σχηματίζουν “σφαίρες”, και γενικότερα να αποκτούν φαινότυπο glioblastoma stem cell, κατά τη μόλυνση από τον HCMV. Τέλος, η απόκτηση περισσότερων δεδομένων που συνδέουν τον HCMV με το να ευνοεί την εξέλιξη της νόσου του γλοιοβλαστώματος, όπως η σύνδεση του με τον GSC φαινότυπο, θα δώσει περισσότερες πληροφορίες αναφορικά με τη θεραπευτική στόχευση των HCMV (+) γλοιοβλαστωμάτων, είτε μέσω χρήσης αντι-ιικής θεραπείας, είτε μέσω στόχευσης κυτταρικών παραγόντων που επηρεάζονται από τον εν λόγω ιό, όπως οι μελετώμενοι στη συγκεκριμένη εργασία, EZH2 και RhoA.

5. Βιβλιογραφία

- Abraham, Christopher G., and Caroline A. Kulesza. 2013. "Polycomb Repressive Complex 2 Silences Human Cytomegalovirus Transcription in Quiescent Infection Models." *Journal of Virology* 87 (24): 13193–205. <https://doi.org/10.1128/JVI.02420-13>.
- Adler, Barbara, Christine Sattler, and Heiko Adler. 2017. "Herpesviruses and Their Host Cells: A Successful Liaison." *Trends in Microbiology* 25 (3): 229–41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.009>.
- Ahani, Narges, Reza Shirkoohi, Mohammad Rokouei, Majid Alipour Eskandani, and Abbas Nikraves. 2014. "Overexpression of Enhancer of Zeste Human Homolog 2 (EZH2) Gene in Human Cytomegalovirus Positive Glioblastoma Multiforme Tissues." *Medical Oncology* 31 (11): 252. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0252-9>.
- Al-Koussa, Houssam, Oula El Atat, Leila Jaafar, Hagop Tashjian, and Mirvat El-Sibai. 2020. "The Role of Rho GTPases in Motility and Invasion of Glioblastoma Cells." *Analytical Cellular Pathology* 2020: 9274016. <https://doi.org/10.1155/2020/9274016>.
- Al-Qahtani, Ahmed, Saud Alarifi, Saad Alkahtani, Christos Stournaras, and George Sourvinos. 2020. "Efficient Proliferation and Mitosis of Glioblastoma Cells Infected with Human Cytomegalovirus Is Mediated by RhoA GTPase." *Molecular Medicine Reports* 22 (4): 3066–72. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11434>.
- Alarifi, Saud, Saad Alkahtani, Ahmed A. Al-Qahtani, Christos Stournaras, and George Sourvinos. 2020. "Induction of Interleukin-11 Mediated by RhoA GTPase during Human Cytomegalovirus Lytic Infection." *Cellular Signalling* 70: 109599. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109599>.
- Arbuckle, Jesse H., Paul J. Gardina, David N. Gordon, Heather D. Hickman, Jonathan W. Yewdell, Theodore C. Pierson, Timothy G. Myers, and Thomas M. Kristie. 2017. "Inhibitors of the Histone Methyltransferases EZH2/1 Induce a Potent Antiviral State and Suppress Infection by Diverse Viral Pathogens." Edited by Michael J. Imperiale. *MBio* 8 (4): e01141-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01141-17>.
- Bate, Sheri Lewis, Sheila C. Dollard, and Michael J. Cannon. 2010. "Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States: The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1988–2004." *Clinical Infectious Diseases* 50 (11): 1439–47. <https://doi.org/10.1086/652438>.
- Beaty, Brian T., and John Condeelis. 2014. "Digging a Little Deeper: The Stages of Invadopodium Formation and Maturation." *European Journal of Cell Biology* 93 (10–12): 438–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.003>.
- Bracken, Adrian P., Daniela Kleine-Kohlbrecher, Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Gaetano Gargiulo, Chantal Beekman, K. Theilgaard-Monch, et al. 2007. "The Polycomb Group Proteins Bind throughout the INK4A-ARF Locus and Are Disassociated in Senescent Cells." *Genes & Development* 21 (5): 525–30. <https://doi.org/10.1101/gad.415507>.
- Britt, William J., and Mark N. Prichard. 2018. "New Therapies for Human Cytomegalovirus Infections." *Antiviral Research* 159: 153–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.003>.

- Broeke, Céline Van den, and Herman W. Favoreel. 2011. "Actin' up: Herpesvirus Interactions with Rho GTPase Signaling." *Viruses* 3 (4): 278–92. <https://doi.org/10.3390/v3040278>.
- Bros, Haas, Moll, and Grabbe. 2019. "RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity." *Cells* 8 (7): 733. <https://doi.org/10.3390/cells8070733>.
- Bustelo, Xosé R. 2018. "RHO GTPases in Cancer: Known Facts, Open Questions, and Therapeutic Challenges." *Biochemical Society Transactions* 46 (3): 741–60. <https://doi.org/10.1042/BST20170531>.
- Cardama, G.A., N. Gonzalez, J. Maggio, P. Lorenzano Menna, and D.E. Gomez. 2017. "Rho GTPases as Therapeutic Targets in Cancer (Review)." *International Journal of Oncology* 51 (4): 1025–34. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4093>.
- Chen, Shiu-Jau, Shao-Cheng Wang, and Yuan-Chuan Chen. 2019. "Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against Cytomegalovirus Infections." *Viruses* 12 (1): 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>.
- Chen, Yi- nan, Shi- qiang Hou, Rui Jiang, Jun- long Sun, Chuan- dong Cheng, and Zhong- run Qian. 2021. "EZH2 Is a Potential Prognostic Predictor of Glioma." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25 (2): 925–36. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16149>.
- Cheng, Tianci, and Yinghui Xu. 2018. "Effects of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) Expression on Brain Glioma Cell Proliferation and Tumorigenesis." *Medical Science Monitor* 24: 7249–55. <https://doi.org/10.12659/MSM.909814>.
- Chi, Xiaojuan, Song Wang, Yifan Huang, Mark Stamnes, and Ji-Long Chen. 2013. "Roles of Rho GTPases in Intracellular Transport and Cellular Transformation." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (4): 7089–7108. <https://doi.org/10.3390/ijms14047089>.
- Collinson, Adam, Amanda J. Collier, Natasha P. Morgan, Arnold R. Sienerth, Tamir Chandra, Simon Andrews, and Peter J. Rugg-Gunn. 2016. "Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells." *Cell Reports* 17 (10): 2700–2714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.032>.
- Cui, Xinle, and Clifford M. Snapper. 2019. "Development of Novel Vaccines against Human Cytomegalovirus." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 15 (11): 2673–83. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1593729>.
- Davison, A J. 2014. "Herpesviruses : General Features." In *Reference Module in Biomedical Research*, 1–7. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04812-1>.
- Davison, Andrew J. 2007. "Overview of Classification." In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, edited by Ann Arvin, Gabriella Campadelli-Fiume, Edward Mocarski, Patrick S. Moore, Bernard Roizman, Richard Whitley, and Koichi Yamanishi, 3–9. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545313.002>.
- Ding, Daling, Sheng Han, Zixun Wang, Zongze Guo, and Anhua Wu. 2014. "Does the Existence of HCMV Components Predict Poor Prognosis in Glioma?" *Journal of Neuro-Oncology* 116 (3): 515–22. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1350-9>.
- Duan, Ran, Wenfang Du, and Weijian Guo. 2020. "EZH2: A Novel Target for Cancer Treatment." *Journal of Hematology & Oncology* 13 (1): 104. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00937-8>.

- Dziurzynski, Kristine, Susan M. Chang, Amy B. Heimberger, Robert F. Kalejta, S. R. McGregor Dallas, Martine Smit, Liliana Soroceanu, and Charles S. Cobbs. 2012. "Consensus on the Role of Human Cytomegalovirus in Glioblastoma." *Neuro-Oncology* 14 (3): 246–55. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor227>.
- Eich, Marie-Lisa, Mohammad Athar, James E. Ferguson, and Sooryanarayana Varambally. 2020. "EZH2-Targeted Therapies in Cancer: Hype or a Reality." *Cancer Research* 80 (24): 5449–58. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2147>.
- Elder, Elizabeth, and John Sinclair. 2019. "HCMV Latency: What Regulates the Regulators?" *Medical Microbiology and Immunology* 208 (3–4): 431–38. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00581-1>.
- Ferguson, Sherise D., Visish M. Srinivasan, Michael GZ Ghali, and Amy B. Heimberger. 2016. "Cytomegalovirus-Targeted Immunotherapy and Glioblastoma: Hype or Hope?" *Immunotherapy* 8 (4): 413–23. <https://doi.org/10.2217/imt.16.2>.
- Fornara, O., J Bartek Jr, A. Rahbar, J. Odeberg, Z. Khan, I. Peredo, P. Hamerlik, et al. 2016. "Cytomegalovirus Infection Induces a Stem Cell Phenotype in Human Primary Glioblastoma Cells: Prognostic Significance and Biological Impact." *Cell Death & Differentiation* 23 (2): 261–69. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.91>.
- Fortin Ensign, Shannon Patricia, Ian T. Mathews, Marc H. Symons, Michael E. Berens, and Nhan L. Tran. 2013. "Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression." *Frontiers in Oncology* 3: 241. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00241>.
- Foster, Haidn, Ilya V. Ulasov, and Charles S. Cobbs. 2017. "Human Cytomegalovirus-Mediated Immunomodulation: Effects on Glioblastoma Progression." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1868 (1): 273–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.05.006>.
- Fulkerson, Heather L., Maciej T. Nogalski, Donna Collins-McMillen, and Andrew D. Yurochko. 2021. "Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis." In *Human Cytomegaloviruses: Methods and Protocols*, edited by Andrew D. Yurochko, 2nd ed., 1–18. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1111-1_1.
- Gall Trošelj, Koraljka, Renata Novak Kujundzic, and Djurdjica Ugarkovic. 2016. "Polycomb Repressive Complex's Evolutionary Conserved Function: The Role of EZH2 Status and Cellular Background." *Clinical Epigenetics* 8: 55. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0226-1>.
- Gan, Lu, Yanan Yang, Qian Li, Yi Feng, Tianshu Liu, and Weijian Guo. 2018. "Epigenetic Regulation of Cancer Progression by EZH2: From Biological Insights to Therapeutic Potential." *Biomarker Research* 6: 10. <https://doi.org/10.1186/s40364-018-0122-2>.
- Gibson, W. 2008. "Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion." In *Human Cytomegalovirus*, edited by Thomas E. Shenk and Mark F. Stinski, 187–204. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_11.
- Goodrum, Felicia. 2016. "Human Cytomegalovirus Latency: Approaching the Gordian Knot." *Annual Review of Virology* 3 (1): 333–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042422>.

- Gooijer, Mark C. de, Miriam Guillén Navarro, Rene Bernards, Thomas Wurdinger, and Olaf van Tellingen. 2018. "An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways." *Trends in Molecular Medicine* 24 (9): 763–80. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.07.003>.
- Gugliesi, Francesca, Alessandra Coscia, Gloria Griffante, Ganna Galitska, Selina Pasquero, Camilla Albano, and Matteo Biolatti. 2020. "Where Do We Stand after Decades of Studying Human Cytomegalovirus?" *Microorganisms* 8 (5): 685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050685>.
- Haga, Raquel B., and Anne J. Ridley. 2016. "Rho GTPases: Regulation and Roles in Cancer Cell Biology." *Small GTPases* 7 (4): 207–21. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
- Herbein, Georges. 2018. "The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis." *Viruses* 10 (8): 408. <https://doi.org/10.3390/v10080408>.
- Hodge, Richard G., and Anne J. Ridley. 2016. "Regulating Rho GTPases and Their Regulators." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (8): 496–510. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.67>.
- Jean Beltran, Pierre M, and Ileana M Cristea. 2014. "The Life Cycle and Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection: Lessons from Proteomics." *Expert Review of Proteomics* 11 (6): 697–711. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.971116>.
- Joseph, Gabriel P., Ryan McDermott, Maria A. Baryshnikova, Charles S. Cobbs, and Ilya V. Ulasov. 2017. "Cytomegalovirus as an Oncomodulatory Agent in the Progression of Glioma." *Cancer Letters* 384: 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.022>.
- Jung, Haiyoung, Suk Ran Yoon, Jeewon Lim, Hee Jun Cho, and Hee Gu Lee. 2020. "Dysregulation of Rho GTPases in Human Cancers." *Cancers* 12 (5): 1179. <https://doi.org/10.3390/cancers12051179>.
- Khalil, Bassem D., and Mirvat El-Sibai. 2012. "Rho GTPases in Primary Brain Tumor Malignancy and Invasion." *Journal of Neuro-Oncology* 108 (3): 333–39. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0866-8>.
- Krishna, B. A., M. R. Wills, and J. H. Sinclair. 2019. "Advances in the Treatment of Cytomegalovirus." *British Medical Bulletin* 131 (1): 5–17. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz031>.
- Landolfo, Santo, Marisa Gariglio, Giorgio Gribaudo, and David Lembo. 2003. "The Human Cytomegalovirus." *Pharmacology & Therapeutics* 98 (3): 269–97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00034-2).
- Liu, Che, Paul A. Clark, John S. Kuo, and Robert F. Kalejta. 2017. "Human Cytomegalovirus-Infected Glioblastoma Cells Display Stem Cell-Like Phenotypes." Edited by Felicia Goodrum. *MSphere* 2 (3): e00137-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00137-17>.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, and David W. Ellison. 2016. "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary." *Acta Neuropathologica* 131 (6): 803–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- Margueron, Raphaël, and Danny Reinberg. 2011. "The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life." *Nature* 469 (7330): 343–49. <https://doi.org/10.1038/nature09784>.

- McFaline-Figueroa, J. Ricardo, and Eudocia Q. Lee. 2018. "Brain Tumors." *The American Journal of Medicine* 131 (8): 874–82. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.12.039>.
- McFaline-Figueroa, J. Ricardo, and Patrick Y. Wen. 2017. "The Viral Connection to Glioblastoma." *Current Infectious Disease Reports* 19 (2): 5. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0563-z>.
- Mocarski, E.S., Jr.T. Shenk, P.D. Griffiths, and R.F. Pass. 2013. "Cytomegaloviruses." In *Fields Virology*, edited by David M. Knipe and Peter Howley, 6th ed., 1960–2014. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Murphy, E., and Thomas E. Shenk. 2008. "Human Cytomegalovirus Genome." In *Human Cytomegalovirus*, edited by Thomas E. Shenk and Mark F. Stinski, 1–19. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_1.
- Nauc ler, Cecilia S oderberg, J rgen Geisler, and Katja Vetvik. 2019. "The Emerging Role of Human Cytomegalovirus Infection in Human Carcinogenesis: A Review of Current Evidence and Potential Therapeutic Implications." *Oncotarget* 10 (42): 4333–47. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27016>.
- Orgaz, Jose L, Cecilia Herraiz, and Victoria Sanz-Moreno. 2014. "Rho GTPases Modulate Malignant Transformation of Tumor Cells." *Small GTPases* 5 (4): e983867. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29019>.
- Plachter, Bodo, William Britt, Rolf Vornhagen, Thomas Stamminger, and Gerhard Jahn. 1993. "Analysis of Proteins Encoded by IE Regions 1 and 2 of Human Cytomegalovirus Using Monoclonal Antibodies Generated against Recombinant Antigens." *Virology* 193 (2): 642–52. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1172>.
- Poole, Emma, and John Sinclair. 2015. "Sleepless Latency of Human Cytomegalovirus." *Medical Microbiology and Immunology* 204 (3): 421–29. <https://doi.org/10.1007/s00430-015-0401-6>.
- . 2020. "Understanding HCMV Latency Using Unbiased Proteomic Analyses." *Pathogens* 9 (7): 590. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070590>.
- Porter, Andrew P., Alexandra Papaioannou, and Angeliki Malliri. 2016. "Deregulation of Rho GTPases in Cancer." *Small GTPases* 7 (3): 123–38. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1173767>.
- Rahbar, Afsar, Abiel Orrego, Inti Peredo, Mensur Dzabic, Nina Wolmer-Solberg, Klas Str aat, Giuseppe Stragliotto, and Cecilia S oderberg-Nauc ler. 2013. "Human Cytomegalovirus Infection Levels in Glioblastoma Multiforme Are of Prognostic Value for Survival." *Journal of Clinical Virology* 57 (1): 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.12.018>.
- Rahman, Maryam, Farhad Dastmalchi, Aida Karachi, and Duane Mitchell. 2019. "The Role of CMV in Glioblastoma and Implications for Immunotherapeutic Strategies." *Oncolmmunology* 8 (1): e1514921. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1514921>.
- Rajaratnam, Vilashini, Mohammad Mohiminul Islam, Maixee Yang, Rachel Slaby, Hilda Martinez Ramirez, and Shama Parveen Mirza. 2020. "Glioblastoma : Pathogenesis and Current Status Of." *Cancers* 12 (937): 1–28.
- Reeves, M., and J. Sinclair. 2008. "Aspects of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation." In *Human Cytomegalovirus*, edited by Thomas E. Shenk and Mark F. Stinski, 297–313. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_17.

- Riddell, Anna, Anna Jeffery-Smith, and Cheuk Yan William Tong. 2017. "Herpesviruses." *Medicine* 45 (12): 767–71. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.09.006>.
- Santos, Claudia Januário dos, Fabiane Lucy Ferreira Castro, Rodrigo Barbosa de Aguiar, Isabela Godoy Menezes, Ana Carolina Santos, Christina Paulus, Michael Nevels, and Maria Cristina Carlan da Silva. 2018. "Impact of Human Cytomegalovirus on Glioblastoma Cell Viability and Chemotherapy Treatment." *Journal of General Virology* 99 (9): 1274–85. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001118>.
- Silantsev, Artemiy, Luca Falzone, Massimo Libra, Olga Gurina, Karina Kardashova, Taxiarchis Nikolouzakis, Alexander Nosyrev, Christopher Sutton, Panayiotis Mitsias, and Aristides Tsatsakis. 2019. "Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics." *Cells* 8 (8): 863. <https://doi.org/10.3390/cells8080863>.
- Singh, Pankaj, and Donna M. Neumann. 2020. "Persistent HCMV Infection of a Glioblastoma Cell Line Contributes to the Development of Resistance to Temozolomide." *Virus Research* 276: 197829. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197829>.
- Sinzger, C., M. Digel, and G. Jahn. 2008. "Cytomegalovirus Cell Tropism." In *Human Cytomegalovirus*, edited by Thomas E. Shenk and Mark F. Stinski, 63–83. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_4.
- Soroceanu, Liliana, and Charles S. Cobbs. 2011. "Is HCMV a Tumor Promoter?" *Virus Research* 157 (2): 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.026>.
- Soroceanu, Liliana, Lisa Matlaf, Sabeena Khan, Armin Akhavan, Eric Singer, Vladimir Bezrookove, Stacy Decker, et al. 2015. "Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins Promote Stemness Properties in Glioblastoma." *Cancer Research* 75 (15): 3065–76. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3307>.
- Sourvinos, George, Antigoni Morou, Ioannis Sanidas, Ignea Codruta, Scott A. Ezell, Christina Doxaki, Sotirios C. Kampranis, Filippos Kottakis, and Philip N. Tsihliis. 2014. "The Downregulation of GF11 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." Edited by Paul M. Lieberman. *PLoS Pathogens* 10 (5): e1004136. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004136>.
- Stern-Ginossar, Noam, Ben Weisburd, Annette Michalski, Vu Thuy Khanh Le, Marco Y. Hein, S.-X. Huang, Ming Ma, et al. 2012. "Decoding Human Cytomegalovirus." *Science* 338 (6110): 1088–93. <https://doi.org/10.1126/science.1227919>.
- Stragliotto, Giuseppe, Mattia Russel Pantalone, Afsar Rahbar, Jiri Bartek, and Cecilia Söderberg-Naucler. 2020. "Valganciclovir as Add-on to Standard Therapy in Glioblastoma Patients." *Clinical Cancer Research* 26 (15): 4031–39. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0369>.
- Suter, Robert K., Jezabel Rodriguez-Blanco, and Nagi G. Ayad. 2020. "Epigenetic Pathways and Plasticity in Brain Tumors." *Neurobiology of Disease* 145: 105060. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105060>.

- Svrlanska, Adriana, Anna Reichel, Eva-Maria Schilling, Myriam Scherer, Thomas Stamminger, and Nina Reuter. 2019. "A Noncanonical Function of Polycomb Repressive Complexes Promotes Human Cytomegalovirus Lytic DNA Replication and Serves as a Novel Cellular Target for Antiviral Intervention." Edited by Rozanne M. Sandri-Goldin. *Journal of Virology* 93 (9): e02143-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02143-18>.
- Tan, Aaron C., David M. Ashley, Giselle Y. López, Michael Malinzak, Henry S. Friedman, and Mustafa Khasraw. 2020. "Management of Glioblastoma: State of the Art and Future Directions." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70 (4): 299–312. <https://doi.org/10.3322/caac.21613>.
- Tan, Jin-zhi, Yan Yan, Xiao-xi Wang, Yi Jiang, and H. Eric Xu. 2014. "EZH2: Biology, Disease, and Structure-Based Drug Discovery." *Acta Pharmacologica Sinica* 35 (2): 161–74. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.161>.
- Tandon, Ritesh, and Edward S Mocarski. 2012. "Viral and Host Control of Cytomegalovirus Maturation." *Trends in Microbiology* 20 (8): 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.008>.
- Thumkeo, Dean, Sadanori Watanabe, and Shuh Narumiya. 2013. "Physiological Roles of Rho and Rho Effectors in Mammals." *European Journal of Cell Biology* 92 (10–11): 303–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.09.002>.
- Tomtishen III, John Paul. 2012. "Human Cytomegalovirus Tegument Proteins (Pp65, Pp71, Pp150, Pp28)." *Virology Journal* 9 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-22>.
- Tseliou, Melpomeni, Ahmed Al-Qahtani, Saud Alarifi, Saad H. Alkahtani, Christos Stournaras, and George Sourvinos. 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): 94–109. <https://doi.org/10.1159/000438612>.
- Tzatsos, Alexandros, Polina Paskaleva, Stephania Lymperi, Gianmarco Contino, Svetlana Stoykova, Zhao Chen, Kwok-Kin Wong, and Nabeel Bardeesy. 2011. "Lysine-Specific Demethylase 2B (KDM2B)-Let-7-Enhancer of Zester Homolog 2 (EZH2) Pathway Regulates Cell Cycle Progression and Senescence in Primary Cells." *Journal of Biological Chemistry* 286 (38): 33061–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257667>.
- Tzatsos, Alexandros, Raymond Pfau, Sotirios C Kampranis, and Philip N Tschlis. 2009. "Ndy1/KDM2B Immortalizes Mouse Embryonic Fibroblasts by Repressing the Ink4a / Arf Locus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (8): 2641–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813139106>.
- Urbańska, Kaja, Justyna Sokołowska, Maciej Szmidt, and Paweł Sysa. 2014. "Review Glioblastoma Multiforme – an Overview." *Contemporary Oncology* 18 (5): 307–12. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>.
- Wang, Xin, David Y Huang, Shu-Mei Huong, and Eng-Shang Huang. 2005. "Integrin Avβ3 Is a Coreceptor for Human Cytomegalovirus." *Nature Medicine* 11 (5): 515–21. <https://doi.org/10.1038/nm1236>.
- Wesseling, P., and D. Capper. 2018. "WHO 2016 Classification of Gliomas." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 44 (2): 139–50. <https://doi.org/10.1111/nan.12432>.

- Yan, Ke-Sin, Chia-Yuan Lin, Tan-Wei Liao, Cheng-Ming Peng, Shou-Chun Lee, Yi-Jui Liu, Wing Chan, and Ruey-Hwang Chou. 2017. "EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe?" *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6): 1172. <https://doi.org/10.3390/ijms18061172>.
- Yan, Meina, Xinxin Yang, Hui Wang, and Qixiang Shao. 2018. "The Critical Role of Histone Lysine Demethylase KDM2B in Cancer." *American Journal of Translational Research* 10 (8): 2222–33.
- Ye, Lele, Yunyun Qian, Weijie Yu, Gangqiang Guo, Hong Wang, and Xiangyang Xue. 2020. "Functional Profile of Human Cytomegalovirus Genes and Their Associated Diseases: A Review." *Frontiers in Microbiology* 11: 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02104>.
- Yin, Yatao, Shuwei Qiu, and Ying Peng. 2016. "Functional Roles of Enhancer of Zeste Homolog 2 in Gliomas." *Gene* 576 (1): 189–94. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.080>.
- Zandvakili, I., Y. Lin, J. C. Morris, and Y. Zheng. 2017. "Rho GTPases: Anti- or pro-Neoplastic Targets?" *Oncogene* 36 (23): 3213–22. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.473>.
- Zhang, Junxia, Luyue Chen, Lei Han, Zhendong Shi, Jianning Zhang, Peiyu Pu, and Chunsheng Kang. 2015. "EZH2 Is a Negative Prognostic Factor and Exhibits Pro-Oncogenic Activity in Glioblastoma." *Cancer Letters* 356 (2): 929–36. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.003>.
- Zuhair, Mohamed, G. Suzanne A. Smit, Gabriel Wallis, Faiz Jabbar, Colette Smith, Brecht Devleeschauwer, and Paul Griffiths. 2019. "Estimation of the Worldwide Seroprevalence of Cytomegalovirus: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Reviews in Medical Virology* 29 (3): e2034. <https://doi.org/10.1002/rmv.2034>.