



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
Ογκολογία:
Από την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ MIR-144 ΣΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΤΗ
ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΜΗ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΜΕ
ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟ (HCMV) ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΟΥΡΒΙΝΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ,
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΘΩΜΑΪΔΟΥ ΑΡΣΙΝΟΗ ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗ
Α.Μ. 1140049

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2023



UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE
STUDIES IN ONCOLOGY



MASTER THESIS

THE ROLE OF MIR-144 IN THE PROLIFERATION AND
MIGRATION OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)
INFECTED AND NON-INFECTED GLIOBLASTOMA CELLS

SUPERVISOR: SOURVINOS GEORGE, PROFESSOR OF
CLINICAL VIROLOGY

THOMAIDOU ARSINOE CHRYSOVALANTI
1140049

HERAKLION, 2023

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

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

Σουρβίνος Γεώργιος

Ζουμπουρλής Βασίλειος

Αγγελάκη Σοφία

ΒΑΘΜΙΔΑ

Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας

Διευθυντής Ερευνών Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας

Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση του παρόντος ερευνητικού έργου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση του. Πρωτίστως, τον κύριο Σουρβίνο Γεώργιο, καθηγητή Κλινικής Ιολογίας του τμήματος Ιατρικής, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου. Την τεχνικό Κοκκινάκη Χρύσα για τη βοήθεια της και ιδιαίτερος τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Τσέλιου Μελίνα, καθώς χωρίς τη συνεχή καθοδήγηση και συμπαράσταση της, η πραγματοποίηση της εργασίας αυτής δε θα ήταν εφικτή. Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια μου, που συνεχώς ήταν δίπλα μου και με στήριζε για να φτάσω ως εδώ.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Γλοιοβλάστωμα	9
1.2. Ερπητοϊοί.....	9
1.3. HCMV - Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός	10
1.3.1. Επιδημιολογία και συμπτωματολογία του HCMV	11
1.3.2. Θεραπεία για τον HCMV	13
1.3.3. Κύκλος ζωής του HCMV	13
1.3.4. Η σύνδεση του HCMV με τον καρκίνο	16
1.3.5. Ο ρόλος του HCMV στο γλοιοβλάστωμα.....	18
1.4. Μικρο-RNAs (miRNAs).....	20
1.4.1. Ο ρόλος του miR-144 στον καρκίνο	21
1.4.2. Ο ρόλος του miR-144 στο γλοιοβλάστωμα.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1. Κύτταρα και Ιοί	23
2.1.1. Καλλιέργεια HCMV	23
2.1.2. Τιτλοποίηση Ιού (Plaque Assay)	24
2.2. miRNA διαμόλυνση (miRNA transfection)	26
2.3. Αντίστροφη Μεταγραφή RNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (RT-qPCR)	27
2.4. Δοκιμασία Μεταβολικής Δραστηριότητας (MTT Assay).....	29
2.5. Δοκιμασία Επούλωσης Τραύματος In Vitro (In Vitro Wound Healing Assay).....	29
2.7. Στατιστική Ανάλυση	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1. Έλεγχος κυτταροτοξικότητας και βελτιστοποίηση της διαδικασίας διαμόλυνσης των U373MG κυτάρων γλοιοβλαστώματος με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς.....	31

3.2. Έλεγχος ενδογενών επιπέδων miR-144 σε U373MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος και πειράματα διαμόλυνσης με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς.....	32
3.3. Επιβεβαίωση της μόλυνσης των κυττάρων με HCMV	33
3.4. Η επίδραση του miR-144 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV	34
3.5. Η επίδραση του miR-144 στην κυτταρική μετανάστευση σε συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV	36
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	40
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γλοιοβλάστωμα (GBM) είναι ένας από τους πιο συχνούς και θανατηφόρους όγκους του εγκεφάλου. Εξαιτίας της άκρως επιθετικής φύσης του, είναι έως και σήμερα κλινικά ανίατος, ακόμη και μετά από ισχυρές καρκινικές θεραπείες, ενώ παράλληλα ο μέσος όρος επιβίωσης των ασθενών μετά τη διάγνωση σπάνια ξεπερνά τους 14 μήνες. Στενή συσχέτιση έχει δειχθεί ανάμεσα στον ανθρωπίνο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV) και το γλοιοβλάστωμα, καθώς το DNA και η έκφραση γονιδιακών προϊόντων του ιού έχουν εντοπιστεί σε μεγάλο ποσοστό δειγμάτων όγκων ασθενών. Ο HCMV εμφανίζεται να δρα ως ογκορυθμιστής στο γλοιοβλάστωμα, καθώς πολλαπλά μονοπάτια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη και την πρόοδο του καρκίνου αποτελούν στόχους ρύθμισης για τον ιό, συμβάλλοντας έτσι στην ενίσχυση της κακοήθειας των κυττάρων. Τα μικρο-RNAs (miRNAs) αποτελούν σημαντικά μόρια-ρυθμιστές της ογκογενετικής διαδικασίας, αναστέλλοντας ή προάγοντας τις καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων ανάλογα με τα γονίδια-στόχους τους. Το miR-144, μέλος της συστάδας miR-144/451, έχει επίσης βρεθεί να σχετίζεται με την καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, η έκφραση του έχει εμφανιστεί μειωμένη στο μεγαλύτερο ποσοστό των καρκινικών τύπων όπου έχει μελετηθεί, ενώ έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκαταστολέας στο γλοιοβλάστωμα. Ωστόσο, παρότι τόσο η επίδραση του miR-144, όσο και του HCMV έχουν διερευνηθεί προηγουμένως σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, δεν υπάρχει αντίστοιχος αριθμός αναφορών στη βιβλιογραφία που να εξετάζει συνδυαστικά τους δύο αυτούς παράγοντες, οι οποίοι εμφανίζονται να στοχεύουν τις ίδιες κυτταρικές ιδιότητες, ασκώντας όμως αντίθετη ρυθμιστική δράση.

ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση τα παραπάνω γνωστά δεδομένα, στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η διερεύνηση του πιθανού ρόλου του miR-144 στη ρύθμιση δύο βασικών καρκινικών ιδιοτήτων, αυτών του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης, σε μη μολυσμένα και μολυσμένα με HCMV καρκινικά κύτταρα γλοιοβλαστώματος της σειράς U373MG. Πειράματα υπερέκφρασης των επιπέδων του miR-144 μέσω διαμόλυνσης (miRNA transfection) στα κύτταρα, οδήγησαν σε σημαντική αναστολή του ρυθμού της κυτταρικής αύξησης και της μετανάστευσης σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, τόσο σε περιβάλλον μόλυνσης, αλλά και μη, από τον HCMV. Ταυτόχρονα, μείωση της έκφρασης του miR-144 επέτρεψε στα κύτταρα τη διατήρηση της πολλαπλασιαστικής και μεταναστευτικής τους ιδιότητας. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του miR-144, η έκφραση του οποίου φαίνεται να αναστέλλει σημαντικά το πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων γλοιοβλαστώματος, σε συνθήκες μόλυνσης και μη, από τον HCMV.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: γλοιοβλάστωμα, HCMV, miR-144, πολλαπλασιασμός, μετανάστευση.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is one of the most common and deadly malignant brain tumors. Due to its highly aggressive nature, it remains an incurable disease with very poor prognosis and a median survival rate of less than 14 months after diagnosis. It has been reported that human cytomegalovirus (HCMV) and glioblastoma are often closely associated, as HCMV DNA and viral gene products have been discovered in the majority of tumor tissue samples of GBM patients. HCMV appears to play an oncomodulatory role in glioblastoma, promoting the malignant properties of cells through the regulation of several cellular pathways involved in cancer development and progression. Micro-RNAs are important regulators of the oncogenetic process, either suppressing or promoting the malignant properties of cancer cells depending on their target-genes. miR-144 is a member of the cluster miR-144/451 and has also been found to be related to tumorigenesis. Several studies have shown that miR-144 is significantly down-regulated in a number of different cancer types, while it is widely considered to act as a tumor suppressor in glioblastoma. While the roles of miR-144 and HCMV in glioblastoma have been investigated separately, the effects of miR-144 have not been explored as intently in HCMV-positive glioblastoma cells.

PURPOSE OF THE STUDY

Taking the previously mentioned facts into consideration, this study aimed to investigate the possible role of miR-144 in regulating the proliferation and migration of HCMV-negative and HCMV-positive U373MG glioblastoma cells. Over-expression of miR-144, through miRNA transfection experiments, led to significant suppression of cell growth and migration in both infected and non-infected cells, while miR-144 inhibition allowed cells to maintain their standard proliferative and migratory capacity. These results indicate that miR-144 does indeed act as a tumor suppressor in glioblastoma, by inhibiting cell proliferation and migration in both HCMV-negative and HCMV-positive U373MG cells.

KEYWORDS: glioblastoma, HCMV, miR-144, proliferation, migration.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γλοιοβλάστωμα

Το γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma multiforme, GBM) είναι μια από τις πιο κοινές και επιθετικές μορφές πρωτοπαθών εγκεφαλικών όγκων. Χαρακτηρίζεται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως κακοήθες αστροκύτωμα βαθμού IV (που αποτελεί και την πιο επιθετική κατηγορία εγκεφαλικών όγκων), με μέσο όρο ζωής 14 μήνες μετά τη διάγνωση και λιγότερο από 3% των ασθενών να επιβιώνουν έως τα 5 έτη. Στο 90% των περιπτώσεων το γλοιοβλάστωμα είναι πρωτοπαθές, δηλαδή προκύπτει από φυσιολογικά κύτταρα της γλοίας που έχουν περάσει από πολλαπλά ογκογενετικά στάδια. Το 10% είναι δευτερογενή γλοιοβλαστώματα, τα οποία προκύπτουν από όγκους χαμηλότερων βαθμίδων [1]. Παρόλο που οι δύο τύποι γλοιοβλαστώματος προέρχονται από απορρύθμιση διαφορετικών μονοπατιών, μορφολογικά δεν διαφέρουν, ενώ είναι και οι δύο τύποι πρακτικά ανίατοι. Το γλοιοβλάστωμα σπάνια κάνει μεταστάσεις έξω από ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος, παρόλα αυτά είναι ιδιαίτερα διεισδυτικό στο εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η υψηλή αυτή διεισδυτικότητα του είναι πιθανόν ένας από τους λόγους που οι υπάρχουσες θεραπείες κατά του γλοιοβλαστώματος δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές, και ο τύπος αυτός γλοιώματος είναι τόσο θανατηφόρος [1].

Η συνήθης μέθοδος θεραπείας (golden standard) που ακολουθείται σε ασθενείς που διαγιγνώσκονται με γλοιοβλάστωμα είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου και στη συνέχεια ακτινοθεραπείες [2]. Παράλληλα μπορεί να χορηγηθεί και το χημειοθεραπευτικό φάρμακο τεμολοζαμίδη (temozolomide), το οποίο παρουσιάζει ωστόσο μειωμένη αποτελεσματικότητα και μεγάλα ποσοστά ανθεκτικότητας στη θεραπεία από τους ασθενείς, ενώ αποτελεί εδώ και 20 έτη τη μόνη εγκεκριμένη από τον FDA (Food and Drug Administration) χημειοθεραπευτική προσέγγιση πρώτης γραμμής για το γλοιοβλάστωμα [3]. Επιπλέον, αρκετά πρόσφατα, μετά τη γενική παραδοχή της ογκορρυθμιστικής επίδρασης του HCMV στο γλοιοβλάστωμα, στις μεθόδους αντιμετώπισης έχουν προστεθεί αντιικά φάρμακα, όπως τα valganciclovir και cidofovir, καθώς και οι ανοσοθεραπείες. Οι δύο αυτές καινοτόμες προσεγγίσεις παρουσιάζονται ως ιδιαίτερα υποσχόμενες μέθοδοι θεραπείας για τη βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών και η αποτελεσματικότητά τους μένει να κριθεί στις σύγχρονες κλινικές δοκιμές [4].

1.2. Ερπητοϊοί

Οι ερπητοϊοί (Herpesviruses) είναι δίκλωνοι-DNA (dsDNA) ιοί, οι οποίοι ανήκουν στη τάξη των Herpesvirales [5]. Η τάξη αποτελείται από μεγάλο αριθμό ιών ζώων, καθώς πάνω από 150 ερπητοϊοί έχουν εντοπιστεί σε όλα σχεδόν τα σπονδυλωτά, από τα ψάρια μέχρι και τον άνθρωπο, καθώς και σε κάποια ασπόνδυλα (στα δίθυρα και τα γαστρόποδα) [5, 6]. Οι ερπητοϊοί παρουσιάζουν μοναδική δομή, η οποία περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά επίπεδα: τον πυρήνα (ο οποίος περικλείει το δίκλωνο γραμμικό DNA), ένα εικοσαεδρικό καψίδιο (το οποίο αποτελείται από καψομερίδια και περικλύει τον πυρήνα), το tegument (μια άμορφη πρωτεϊνική στιβάδα, η οποία

καλύπτει το καψίδιο) και έναν εξωτερικό φάκελο (ο οποίος αποτελείται από λιπιδική διπλοστιβάδα με ενσωματωμένες γλυκοπρωτείνες και με τη σειρά του περικλείει το tegument) [5, 7]. Επιπλέον, οι ερπητοϊοί εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος παθογόνων ιδιοτήτων, που μπορούν να προκαλέσουν από ασυμπτωματικές έως και θανατηφόρες καταστάσεις (συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου), ενώ παράλληλα έχουν τη δυνατότητα εγκαθίδρυσης λανθάνουσας μόλυνσης με δυνατότητα σποραδικής επανενεργοποίησης [6]. Η εγκαθίδρυση της λανθάνουσας κατάστασης αποτελεί κεντρικό σημείο για την επιτυχία των ερπητοϊών ως παθογόνα, καθώς επιτρέπει τη χρόνια εφ' όρου ζωής μόλυνση, ακόμη και υπό συνθήκες ενεργοποίησης πλήρους ανοσολογικής απόκρισης [5]. Η τάξη των Herpesvirales χωρίζεται σε τρεις οικογένειες: τους Alloherpesviridae (ερπητοϊούς των φαριών και των αμφιβίων), τους Herpesviridae (ερπητοϊούς των θηλαστικών, των πτηνών και των ερπετών) και τους Malacoherpesviridae (ερπητοϊούς των ασπόνδυλων). Η οικογένεια Herpesviridae, στην οποία ανήκουν και οι ανθρώπινοι ερπητοϊοί, αποτελεί την καλύτερα μελετημένη από τις τρεις και χωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες: τους Α-Ερπητοϊούς (Alphaherpesvirinae), οι οποίοι περιλαμβάνουν πέντε γένη (Illonvirus, Mardivirus, Scutavirus, Simplexvirus και Varicellovirus), τους Β-Ερπητοϊούς (Betaherpesvirinae), οι οποίοι περιλαμβάνουν τέσσερα γένη (Cytomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus και Roseolovirus) και τους Γ-Ερπητοϊούς (Gammaherpesvirinae), οι οποίοι περιλαμβάνουν τέσσερα γένη (Lymphocryptovirus, Macavirus, Percavirus και Rhadinovirus) [6].

Μέχρι και σήμερα, από όλους του γνωστούς ερπητοϊούς, έχει δειχτεί πως οχτώ μολύνουν τον άνθρωπο: ο Έρπης Τύπου 1 (Herpes Simplex Virus Type 1), ο Έρπης Τύπου 2 (Herpes Simplex Virus Type 2), ο Έρπης Ζωστήρας (Varicella-Zoster Virus), ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (Human Cytomegalovirus), ο ιός Epstein-Barr, ο Ανθρώπινος Ερπητοϊός Τύπου 6 (Human Herpesvirus 6 - variants A and B), ο Ανθρώπινος Ερπητοϊός Τύπου 7 και ο Ανθρώπινος Ερπητοϊός Τύπου 8 (Kaposi's Sarcoma Virus). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως ο Έρπης-B (Herpes Virus B / Macacine Alphaherpesvirus 1), φυσικοί φορείς του οποίου είναι οι μαϊμούδες μακάκοι, μπορεί επίσης να μολύνει τον άνθρωπο [6, 7]. Οι ανθρώπινοι ερπητοϊοί είναι λυτικοί εκ φύσεως και η παραγωγή νέων μολυσματικών ισωματίων οδηγεί τελικώς στη λύση και τον κυτταρικό θάνατο [6].

1.3. HCMV - Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός

Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (HCMV), συχνά αναφερόμενος ως Ανθρώπινος Ερπητοϊός Τύπου 5 (Human Herpes Virus 5, HHV-5), ανήκει στην υποοικογένεια των β-Ερπητοϊών, στην οικογένεια Herpesviridae [8]. Είναι ένα παγκοσμίως διαδεδομένο παθογόνο και εντοπίζεται κυρίως στις αναπτυσσόμενες αλλά και στις αναπτυγμένες χώρες, καθώς και σε γεωγραφικά απομονωμένες ομάδες. Υπολογίζεται ότι προσβάλλει σήμερα από το 40% έως το 100% του ενήλικου παγκόσμιου πληθυσμού [9, 10].

Ο HCMV, όπως και όλοι οι ερπητοϊοί, μπορεί να ακολουθήσει δύο μονοπάτια: 1) το λυτικό κύκλο, είτε 2) τη λανθάνουσα κατάσταση, παραμένοντας ανενεργός στον οργανισμό, προκαλώντας χρόνια λοίμωξη και πιθανή επανενεργοποίηση υπό

συγκεκριμένες συνθήκες [8]. Βασικά χαρακτηριστικά του HCMV, είναι η υψηλή ειδικότητα για τον ξενιστή και ο μεγάλος κύκλος ζωής. Ο HCMV μπορεί επίσης να διατηρηθεί και να πολλαπλασιαστεί σε κυτταρικές καλλιέργειες [8]. Ο HCMV μολύνει και πολλαπλασιάζεται επιτυχώς σε μεγάλο εύρος κυτταρικών τύπων, όπως επιθηλιακά κύτταρα του αδενικού ιστού και του βλεννογόνου, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ηπατοκύτταρα [7]. Γενικά, ο ιός περνά σε λανθάνουσα κατάσταση κυρίως σε μυελοειδή κύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα), οδηγώντας σε χρόνια μόλυνση με σποραδικές επανενεργοποιήσεις [10]. Σε συνθήκες καλλιέργειας, ωστόσο, τα μόνα κύτταρα τα οποία επιτρέπουν τη μόλυνση και επιτυχή ολοκλήρωση του κύκλου ζωής των εργαστηριακών στελεχών του ιού είναι οι ινοβλάστες από ανθρώπινο δέρμα ή πνεύμονα, ενώ τα κλινικά στελέχη καλλιεργούνται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Υπάρχουν, επιπλέον, ορισμένες μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές, όπως η κυτταρική σειρά U373MG (Glioblastoma Cell Line), προερχόμενες από κύτταρα γλοιοβλαστώματος, οι οποίες επιτρέπουν την αποτελεσματική μόλυνση (productive infection), σε χαμηλότερα πάντα επίπεδα συγκριτικά με αυτά των ινοβλαστών [9].

Το μεγάλο εύρος των κυττάρων που μολύνει ο ιός διευκολύνει την εξάπλωση του σε όλο το ανθρώπινο σώμα. Η εμφάνιση των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων είναι χαρακτηριστικά μεγάλα διογκωμένα στρογγυλά κύτταρα, με πολλαπλούς πυρήνες και κοκκίωδη κυτταρικά σώματα. Ο HCMV έχει το μεγαλύτερο κύκλο αναπαραγωγής από όλους τους γνωστούς ερπητοϊούς και η χρόνια λοίμωξη (persistent infection) οδηγεί σε χρόνια έκκριση του ιού από το προσβεβλημένο όργανο [7].

1.3.1. Επιδημιολογία και συμπτωματολογία του HCMV

Ο ιός προσβάλλει άτομα όλων των ηλικιών: έμβρυα, νεογέννητα, νήπια, παιδιά και ενήλικες [8]. Το ποσοστό των οροθετικών ατόμων στον πληθυσμό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις κοινωνικές και οικονομικές συνθήκες της γεωγραφικής περιοχής που εξετάζεται [8]. Ανοσοσφαιρίνες Γ (αντισώματα IgG), οι οποίες αποτελούν δείκτη παλαιάς μόλυνσης, εντοπίζονται σε ποσοστό 60% των ενηλίκων στις αναπτυσσόμενες και σε ποσοστό 100% στις αναπτυσσόμενες χώρες [11]. Γενικά, άτομα τα οποία γεννιούνται σε υποβαθμισμένες κοινωνικοοικονομικές συνθήκες προσβάλλονται από τον ιό σε πολύ μικρότερη ηλικία από άλλα. Αυτό σημαίνει πως ένα σημαντικό ποσοστό ατόμων παραμένει υγιές μέχρι να συμβεί η πρωτογενής μόλυνση σε μεταγενέστερο ιατρικά σημαντικό χρόνο. Επιπλέον, επανενεργοποίηση του ιού από τη λανθάνουσα κατάσταση ή/και επαναμόλυνση με κάποιο νέο στέλεχος του HCMV είναι πιθανόν να συμβεί [11].

Ο επιπολασμός της συγγενούς λοίμωξης από HCMV είναι επίσης πιο υψηλός στις αναπτυσσόμενες χώρες, καθώς οι περισσότερες γυναίκες μολύνονται πριν την εφηβική ηλικία. Στις περιπτώσεις αυτές, η επανενεργοποίηση του ιού είναι πιο συχνή αιτία συγγενούς λοίμωξης σε σύγκριση με τις περιπτώσεις πρωτογενούς λοίμωξης της μητέρας [9]. Γενικά, υπολογίζεται πως το 10% περίπου των νηπίων έχουν μολυνθεί μέχρι την ηλικία των 6 μηνών από μητέρες που νοσούν, είτε μέσω του πλακούντα κατά τη κύηση, κατά τον τοκετό ή στη συνέχεια κατά το θηλασμό [7, 9]. Η συχνότητα

επιπολασμού αυξάνεται με την ηλικία και υπολογίζεται ανάμεσα σε 5 έως 30% μέχρι την ηλικία των 6 ετών. Η μόλυνση του πληθυσμού σε ανεπτυγμένες χώρες φαίνεται να συμβαίνει σε δύο φάσεις. Η πρώτη συμβαίνει κατά τα 2 με 3 πρώτα έτη της ζωής των ατόμων μέσω οριζόντιας μόλυνσης, ενώ η δεύτερη συμβαίνει κατά την εφηβεία και στα νεαρά άτομα, ανάμεσα στα 16 και 30 έτη, ως αποτέλεσμα σεξουαλικών επαφών. Μετά από αυτή τη περίοδο, η συχνότητα των οροθετικών ατόμων αυξάνεται ξανά με την ηλικία και υπολογίζεται ανάμεσα στο 50% με 70% [8].

Η λοίμωξη από HCMV είναι ήπια και τα υγιή άτομα εμφανίζονται κατά κύριο λόγο ασυμπτωματικά [9]. Παρόλα αυτά, οι περιπτώσεις στις οποίες έχουμε εκδήλωση συμπτωμάτων μπορούν να ενταχθούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την ομάδα του πληθυσμού που προσβάλλει ο ιός και προκαλεί το αντίστοιχο κλινικό σύνδρομο.

Η πρώτη μορφή με την οποία μπορεί να εμφανιστεί η λοίμωξη του HCMV είναι ένα σύνδρομο που μοιάζει με αυτό της λοιμώδους μονοπυρήνωσης. Το σύνδρομο εμφανίζεται στο 10% περίπου των πρωτογενών μολύνσεων (primary infection) σε ανοσοεπαρκή παιδιά μεγαλύτερων ηλικιών και ενήλικες, ενώ, όπως έχει αναφερθεί, στο 90% η πρωτογενής λοίμωξη είναι ασυμπτωματική. Η μονοπυρήνωση από HCMV μοιάζει κλινικά με την κλασική μονοπυρήνωση από τον ιό Epstein-Barr, ο οποίος ανήκει στην ίδια οικογένεια, με τη διαφορά ότι οι ασθενείς HCMV δεν παρουσιάζουν ετερόφυλα αντισώματα. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, κόπωση, ατυπική λεμφοκύττωση, φαρυγγίτιδα, και πιο σπάνια λεμφαδενοπάθεια και ηπατίτιδα [7].

Η δεύτερη μορφή είναι αυτή της συγγενούς λοίμωξης από HCMV. Η συγγενής λοίμωξη από HCMV είναι η πιο κοινή ιική μόλυνση που αφορά το ανθρώπινο έμβρυο και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η πιθανότητα ένα παιδί να γεννηθεί με HCMV υπολογίζεται συνολικά στο 0,7%, ενώ η πιθανότητα των προσβεβλημένων παιδιών να παρουσιάσουν κάποιο σύνδρομο που έχει συνδεθεί με HCMV (π.χ. ηπατοσπληνομεγαλία, αμφιβληστροειδοπάθεια, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, μικροκεφαλία, νοητική υστέρηση) κατά τη γέννηση είναι 12,7% [7, 12, 13].

Η τρίτη μορφή είναι το σύνδρομο από HCMV σε άτομα με σημαντική ανοσοκαταστολή, και εδώ είναι που η λοίμωξη αποκτά ιδιαίτερη σημασία. Σε αντίθεση με τα συμπτώματα στις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, της συγγενούς λοίμωξης και της λοιμώδους μονοπυρήνωσης, οι οποίες είναι οι πιο κοινές εκδηλώσεις πρωτογενούς λοίμωξης από HCMV, οι ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς είναι πιθανό να εκδηλώσουν πολύ σοβαρές έως και επικίνδυνες για τη ζωή μορφές λοίμωξης, που μπορεί να οφείλονται είτε σε πρωτογενή είτε σε δευτερογενή μόλυνση. Σε αυτή την κατηγορία ασθενών, η λοίμωξη μπορεί να προσβάλει τους πνεύμονες, τον γαστρεντερικό σωλήνα, το συκώτι, τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι ομάδες, οι οποίες κινδυνεύουν περισσότερο από μια σοβαρή μορφή της λοίμωξης από HCMV περιλαμβάνουν δέκτες μεταμόσχευσης οργάνων, ιδιαίτερα μυελού των οστών, πάσχοντες από HIV (Human Immunodeficiency Virus) και άτομα που υποβάλλονται σε ανοσοκατασταλτικές θεραπείες, όπως ασθενείς με νεοπλασίες. Η λοίμωξη σε μεταμοσχευθέντες ασθενείς, οι οποίοι λαμβάνουν μόσχευμα από οροθετικούς δότες,

είναι σημαντική αιτία απόρριψης του μοσχεύματος, ενώ οι συγκεκριμένοι ασθενείς παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης πνευμονίας από HCMV. Το επίπεδο ανοσοκαταστολής είναι κυρίως αυτό που καθορίζει τη σοβαρότητα της λοίμωξης [7].

1.3.2. Θεραπεία για τον HCMV

Η θεραπεία του HCMV δεν είναι εύκολη, καθώς οι επιλογές σε φάρμακα είναι περιορισμένες. Μέχρι σήμερα, πέντε φάρμακα έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία ή την προφύλαξη από τον HCMV, και όλα στοχεύουν στη λυτική φάση της μόλυνσης: α) η γκανσικλοβίρη (Ganciclovir, GCV), συνθετικό ανάλογο της γουανίνης και ανταγωνιστικός αναστολέας της ιικής DNA πολυμεράσης UL54, β) η βαλγκασικλοβίρη (Valganciclovir, VGCV), συνθετικό ανάλογο της 2'-δεοξυγουανοσίνης ανταγωνιστικός αναστολέας της ιικής DNA πολυμεράσης, γ) η σινοφοβίρη (Cidofovir, CDV), ανάλογο της κυτοσίνης και ανταγωνιστικός αναστολέας της ιικής DNA πολυμεράσης, δ) η φοσκαρνέτη (Foscarnet, FOS), πυροφωσφορικό ανάλογο με διαφορετικό μηχανισμό δράσης από τη γκανσικλοβίρη πάνω στην ιική DNA πολυμεράση και πιο πρόσφατα ε) η λετερμονβίρη (Letermovir, LTV), η οποία αναστέλλει το σύμπλοκο της DNA-τερμινάσης του HCMV και παρεμποδίζει το πακετάρισμα των νέων ιοσωμάτων. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα φάρμακα αυτά δίδονται συνήθως σε σοβαρές περιπτώσεις ανοσοκατασταλμένων ασθενών, καθώς παρουσιάζουν συχνά μειωμένη αποτελεσματικότητα, αυξημένη τοξικότητα και ανάπτυξη ανθεκτικών ιικών στελεχών. Έως και σήμερα, δεν υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για τον HCMV [9, 14-16].

1.3.3. Κύκλος ζωής του HCMV

Λυτική Μόλυνση

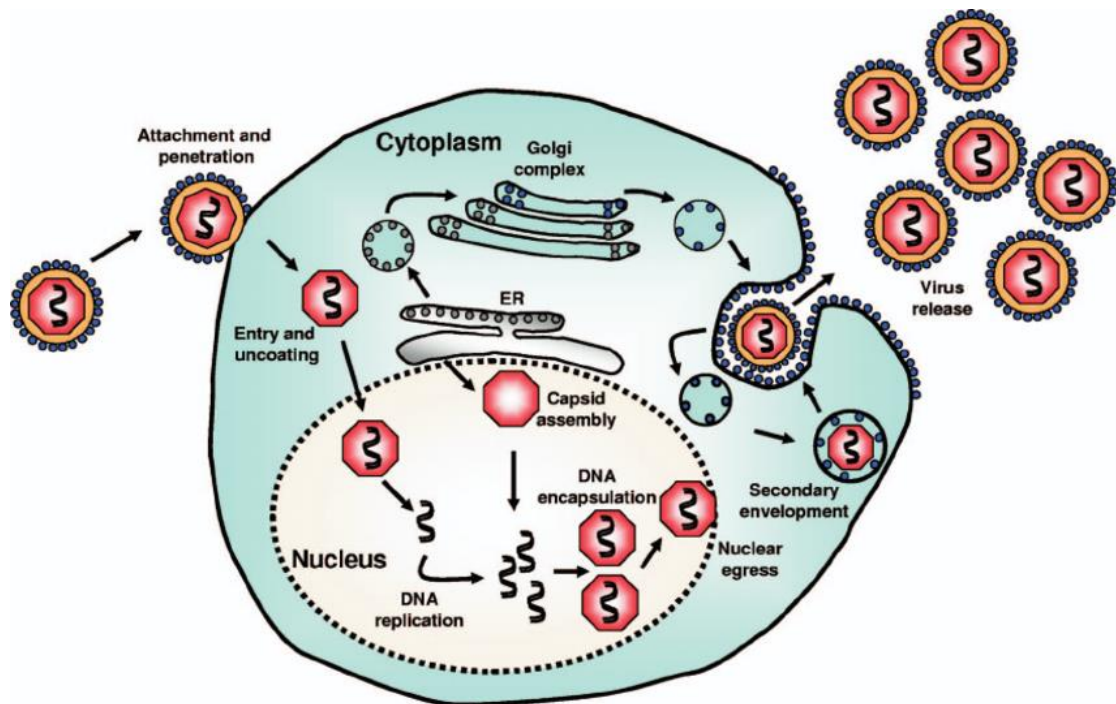
Τα ώριμα ιοσωμάτια του HCMV περιέχουν όλα τα απαραίτητα εργαλεία για τη πρόσδεση και την είσοδο τους στα κύτταρα του ξενιστή, καθώς και για την εκκίνηση της διαδικασίας πολλαπλασιασμού του ιού. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τον ιό, είτε αυτές που περιέχονται στο ιοσωμάτιο, είτε αυτές που κωδικοποιούνται από τον ιό και εκφράζονται σε μεταγενέστερο στάδιο της μόλυνσης, αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς και τα συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου - ξενιστή, ρυθμίζοντας τις λειτουργίες του με τελικό σκοπό τον επιτυχή πολλαπλασιασμό και τη διάδοση του ιού [10].

Κατά την είσοδο του ιοσωματίου στο κύτταρο, οι γλυκοπρωτεΐνες του ιικού εξωτερικού φακέλου, αλληλεπιδρούν με υποδοχείς του ξενιστή και επιτρέπουν είτε την ενδοκύτωση του ιοσωματίου στο κύτταρο είτε την ενσωμάτωση του στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, πρωτεΐνες του tegument φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το σύστημα των μικροσωληνίσκων του ξενιστή και μεταφέρουν τα ιικά καψίδια στον πυρηνικό φάκελο και εν τέλει στον πυρήνα, όπου θα γίνει η αντιγραφή του γονιδιώματος, η ιική μεταγραφή και η εγκαψιδίωση των νέων ιοσωματίων. Παράλληλα, άλλες tegument πρωτεΐνες τοποθετούνται στοχευόμενα σε συγκεκριμένες κυτταρικές τοποθεσίες στα μολυσμένα κύτταρα από εισερχόμενα

ισωμάτια, ώστε να παρεμποδίσουν τα πρώτα στάδια της ανοσολογικής απόκρισης και να ρυθμίσουν την ιική έκφραση γονιδίων. Μεγάλες συγκεντρώσεις tegument πρωτεϊνών έχουν εντοπισθεί και κατά τα μεταγενέστερα στάδια της μόλυνσης, επομένως θεωρείται πιθανή η εμπλοκή τους και στα στάδια ωρίμανσης των νέων ισωμάτων [10].

Επιπλέον, η έκφραση πολλών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον ιό ρυθμίζουν μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και μεταβολισμού, ώστε να υποστηρίξουν περαιτέρω τον ιικό πολλαπλασιασμό και την αποφυγή ανοσολογικής απόκρισης. Η έκφραση των ιικών αυτών πρωτεϊνών συμβαίνει με τη μορφή «καταρράκτη», όπου συγκεκριμένες ομάδες πρωτεϊνών εκφράζονται σε απόλυτα αυστηρά καθορισμένους χρόνους μετά την αρχική είσοδο του ισωματίου στο κύτταρο και χωρίζονται αντίστοιχα ανάλογα με τον χρόνο έκφρασης τους σε τρεις ομάδες: α) στις άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες (IE, immediate early), β) στις καθυστερημένα πρώιμες, (DE, delayed early) και στις όψιμες (L, late). Η κάθε κατηγορία πρωτεϊνών παρουσιάζει διαφορετικές λειτουργίες στο αντίστοιχο χρονικό σημείο έκφρασης και η κάθε μια ρυθμίζει την έκφραση της προηγούμενης. Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες (IE) είναι ανεξάρτητες από άλλες de novo συντιθέμενες ιικές και δρουν ως ενεργοποιητές (trans-activators). Ρυθμίζουν κυρίως λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή (γονιδιακή έκφραση, πρόοδο κυτταρικού κύκλου, ρύθμιση απόπτωσης, αναστολή ανοσολογικής απόκρισης) και επάγουν την έκφραση των καθυστερημένα πρώιμων (DE) πρωτεϊνών, οι οποίες συνεισφέρουν στην αντιγραφή του ιικού DNA. Οι καθυστερημένα πρώιμες (DE) επάγουν την έκφραση των όψιμων πρωτεϊνών (L), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ωρίμανση και την τελική δομική μορφογένεση του ισωματίου [17].

Τα νέα νουκλεοκαψίδια, αφού σχηματιστούν, διαπερνούν τη διπλοστιβάδα του πυρήνα και εξέρχονται από αυτόν με το σχηματισμό του nuclear egress complex (NEC), ενός συμπλόκου ιικών αλλά και κυτταρικών παραγόντων, το οποίο αναδιοργανώνει τον πυρηνικό φάκελο μέσω αναδόμησης των λαμινών της πυρηνικής μεμβράνης. Όταν τα νουκλεοκαψίδια φτάσουν στο κυτταρόπλασμα, η μεταφορά των νέων ισωματίων γίνεται μέσω ενσωμάτωσης τους σε διάφορα σηματοδοτικά κυτταρικά μονοπάτια. Ο HCMV μέσω της ρύθμισης του, εκμεταλλεύεται όλο το τμήμα του εκκριτικού μηχανισμού του κύτταρου, δηλαδή το ενδοπλασματικό δίκτυο ER (Endoplasmic Reticulum), το σύμπλεγμα Golgi (Golgi Apparatus) και το σύστημα των ενδοσωμάτων, ώστε να σχηματιστεί τελικώς το ιικό σύμπλοκο συναρμολόγησης (Assembly Complex, AC). Στο σύμπλοκο αυτό, αποκτούν τα νεοσχηματισμένα ιωσώματα την πρωτεϊνική στιβάδα tegument, καθώς και τον εξωτερικό φάκελο από κυστίδια του κυττάρου. Ο HCMV, κατά τον κύκλο του, εκτός από μολυσματικά ιωσώματα, παράγει επίσης δύο μορφολογικά διαφορετικούς τύπους ιωσωματίων: πυκνά σωμάτια (Dense Bodies), τα οποία δεν έχουν νουκλεοκαψίδιο ή DNA, και μη λοιμώδη τμήματα περιβαλλόμενα από φάκελο (Non Infectious Enveloped Particles), τα οποία αποτελούνται από άδεια καψίδια, περιβαλλόμενα από φάκελο [9]. Τα νέα ιωσώματα, καθώς και τα παραπάνω μη μολυσματικά ιωσώματα (Dense Bodies και Non Infectious Enveloped Particles), απελευθερώνονται στον εξωκυτταρίο χώρο [10].



Εικόνα 1. Ο κύκλος ζωής του ιού στη λυτική μόλυνση [18].

Λανθάνουσα φάση

Η λανθάνουσα κατάσταση χαρακτηρίζεται από παραμονή του γονιδιώματος του HCMV στο μολυσμένο κύτταρο, χωρίς την παρουσία ενεργούς μόλυνσης και άρα την παραγωγή νέων ισωμάτων. Ωστόσο, ο ιός διατηρεί τη δυνατότητα επανεργοποίησης και παραγωγής νέων μολυσματικών ισωματίων, όταν οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές. Διαδικασία - κλειδί στην εγκαθίδρυση λανθάνουσας κατάστασης είναι η καταστολή της έκφρασης των άμεσα πρώιμων (IE) γονιδίων, των οποίων η έκφραση είναι το έναυσμα για τον πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση την έναρξη του λυτικού κύκλου του ιού. Αντίστροφα, το ίδιο σημαντική είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης των άμεσα πρώιμων (IE) γονιδίων κατά την διαδικασία της επανεργοποίησης από την λανθάνουσα κατάσταση. Επομένως, ο έλεγχος της έκφρασης των άμεσα πρώιμων (IE) γονιδίων είναι αυτό που καθορίζει το λυτικό κύκλο, τη λανθάνουσα κατάσταση ή και την επανεργοποίηση. Η έκφραση των γονιδίων αυτών ελέγχεται από τον Κύριο Υποκινητή των Άμεσα Πρώιμων γονιδίων (Major Immediate Early Promoter – MIEP). Σε περιοχές του MIEP, υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν ή αναστέλλουν την έκφραση των άμεσα πρώιμων (IE) γονιδίων μέσω αναδιαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης. Αναλύσεις της δομής της χρωματίνης στον MIEP, φαίνεται να δείχνουν πως η συνθήκη λανθάνουσας κατάστασης συμπίπτει χρονικά με δομή ετεροχρωματίνης (repressive structure), η οποία δεν επιτρέπει τη μεταγραφή. Γνωρίζουμε ότι στη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης γύρω από τον MIEP συμμετέχουν τόσο ιικοί, όσο και κυτταρικοί παράγοντες. Επομένως, είναι πιθανόν η ισορροπία ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες ενεργοποίησης ή καταστολής (συμπύκνωσης ή ανοίγματος της χρωματίνης) να καθορίζει αν θα συμβεί

ή όχι έκφραση των άμεσα πρώιμων (IE) γονιδίων, και κατ'επέκταση αν ο ιός θα ακολουθήσει λυτική οδό, λανθάνουσα κατάσταση ή επανεργοποίηση [19].

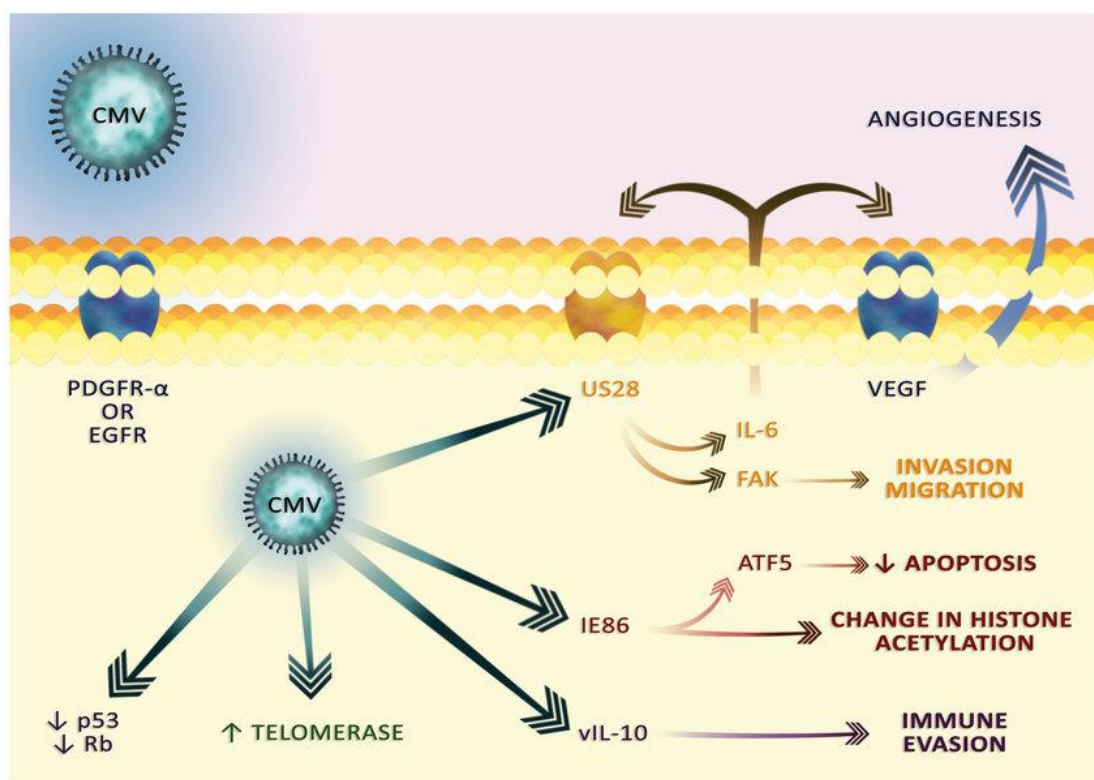
1.3.4. Η σύνδεση του HCMV με τον καρκίνο

Το 2002, αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η μόλυνση HCMV και η έκφραση των γονιδιακών προϊόντων του ιού συνδέονται με το γλοιοβλάστωμα. Από τότε, έχει παρατηρηθεί σημαντική σύνδεση ανάμεσα στον HCMV και τις ανθρώπινες κακοήθειες από διαφορετικές ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες έχουν εντοπίσει τον HCMV σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90% σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως το γλοιοβλάστωμα, τον καρκίνο του προστάτη, τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το μυελοβλάστωμα, το ραβδομυοσάρκωμα και τον καρκίνο των ωοθηκών [20]. Παράλληλα, σε κατάσταση μόλυνσης, ο ιός εντοπίζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς ωστόσο να ανιχνεύεται σε γειτονικούς υγιείς ιστούς [21].

Πολλές κυτταρικές λειτουργίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου αποτελούν στόχους ρύθμισης για γονιδιακά προϊόντα του HCMV και περιλαμβάνουν απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, κυτταρική αθανατοποίηση, μεταλλάξεις καθώς και αστάθεια του ιικού γονιδιώματος, ενισχυμένη κυτταρική επιβίωση και αποφυγή ανοσολογικής απόκρισης σε συνδυασμό με διασπορά του όγκου. Επιπροσθέτως, ο HCMV προσβάλλει και αρκετούς κυτταρικούς τύπους που βρίσκονται στον καρκινικό ιστό και το μικροπεριβάλλον του [22].

Ο HCMV υπολογίζεται πως κωδικοποιεί από 170 έως 750 πρωτεΐνες, και πολλά από τα γονιδιακά του προϊόντα, ιδιαίτερα αυτά που εκφράζονται στα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής του ιού, ρυθμίζουν διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με τα λεγόμενα «Σημεία Κατατεθέντα του Καρκίνου» (Hallmarks of Cancer). Έκφραση των άμεσα πρώιμων πρωτεϊνών (IE), που κωδικοποιούνται από τα γονίδια UL122 και UL123, οδηγούν σε απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες IE1 και IE2 μπορούν να προωθήσουν την αθανατοποίηση κυττάρων μέσω ενεργοποίησης παρατεταμένης δράσης τελομεράσης (hTERT), καθώς και εμποδίζοντας την απόπτωση (παρεμπόδιση δράσης TNF-α) [21]. Επιπλέον, πρώιμες (early) πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τον HCMV αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς παράγοντες-κλειδιά, όπως η οικογένεια πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb), οι κυκλίνες, ο ογκοκαταστολέας p53, τα μονοπάτια Wnt, PI3K/Akt και NF-kB, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τον μεταβολισμό. Ένα ακόμα γονιδιακό προϊόν του HCMV, το οποίο εκφράζεται τόσο κατά τον λυτικό κύκλο, αλλά και κατά τη λανθάνουσα κατάσταση, είναι η US28, μια από τις τέσσερις ιικές G-πρωτεΐνες (πρωτεΐνες που προσδέουν GTP) που συνδέονται με υποδοχείς που κωδικοποιεί ο ιός (vGPCRs). Η US28 ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση και τη φλεγμονή. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει τις δυνατότητες που έχουν οι πρωτεΐνες IE1, pp65 και pp71 να προκαλούν μεταλλάξεις μέσω χρωμοσωμικών ανωμαλιών, σπασμάτων στο DNA και παρεμπόδισης των μονοπατιών επιδιόρθωσης του DNA [21].

Η ανοσοκαταστολή που επάγεται από τον HCMV γίνεται μέσω έκκρισης ανοσοκατασταλτικών παραγόντων από τα μολυσμένα κύτταρα (GM-CSF, TGF- β , cmvIL-10), οι οποίοι δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που προστατεύει τα μολυσμένα κύτταρα από την καταστροφή μέσω καταστροφής των φυσικών φονιάδων (natural killer cells) και των T κυτταροτοξικών. Η παραγωγική μόλυνση σε ένα μικροπεριβάλλον όγκου προωθεί περαιτέρω τη βλαστική κατάσταση των καρκινικών κυττάρων και ενισχύει την επιθετικότητα του όγκου. Με αυτόν τον τρόπο, η μόλυνση από HCMV προκαλεί ένα συνεχές κύκλο κατά τον οποίο έχουμε μη λυτική μόλυνση, σε συνδυασμό με μεταμόρφωση των επιθηλιακών κυττάρων και ταυτόχρονη επανενεργοποίηση των M1 μακροφάγων, διαδικασίες που μπορούν θεωρητικά να σημάνουν την εκκίνηση της νεοπλασματικής διαδικασίας [21].



Εικόνα 2. Κυτταρικές λειτουργίες και μόρια- στόχοι ρύθμισης του HCMV κατά τη μόλυνση σε καρκινικά κύτταρα [23].

Όπως έχει αναφερθεί, τα περισσότερα όργανα και ιστοί του ανθρώπινου σώματος μπορούν να προσβληθούν από τον HCMV. Τα κλινικά στελέχη που έχουν απομονωθεί από δείγματα εμφανίζουν μεγάλο κυτταρικό τροπισμό όπως επιθηλιακά κύτταρα (του πνεύμονα, του μαστού, του γαστρεντερικού σωλήνα, των νεφρών), ενδοθηλιακά κύτταρα, ηπατοκύτταρα, ινοβλάστες, κύτταρα του στρώματος, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αστροκύτταρα και νευρικά βλαστικά κύτταρα [22]. Μετά τη μόλυνση μονοκυττάρων από HCMV, η ενεργοποίηση των μονοπατιών NF- κ B και PI3K έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του φαινοτύπου M1/M2 τόσο σε προφίλ φλεγμονής αλλά και ανοσοκαταστολής. Φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNF- α , η ιντερλευκίνη-6 και η συνθάση του νιτρικού οξέος παράγονται από M1 μακροφάγα μετά την μόλυνση από HCMV. Παρομοίως, ενισχυμένη έκκριση TNF- α , IL-6 και

χημοκινών εντοπίζεται στα υπερκείμενα από CMV καλλιέργειες μικρογλοίων. Αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, όπως οι κυτοκίνες μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη καρκίνου [22]. Επιπλέον, ο ιός εκμεταλλεύεται τις συνθήκες χρόνιας φλεγμονής και της απώλειας ανοσολογικής ρύθμισης, και επομένως προάγει μια κατάσταση η οποία στατιστικά ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αθανατοποίηση σε σχέση με το μονοπάτι του λυτικού κύκλου, διαδικασίες που εν δυνάμει μπορούν να κινήσουν την ογκογενετική διαδικασία [20].

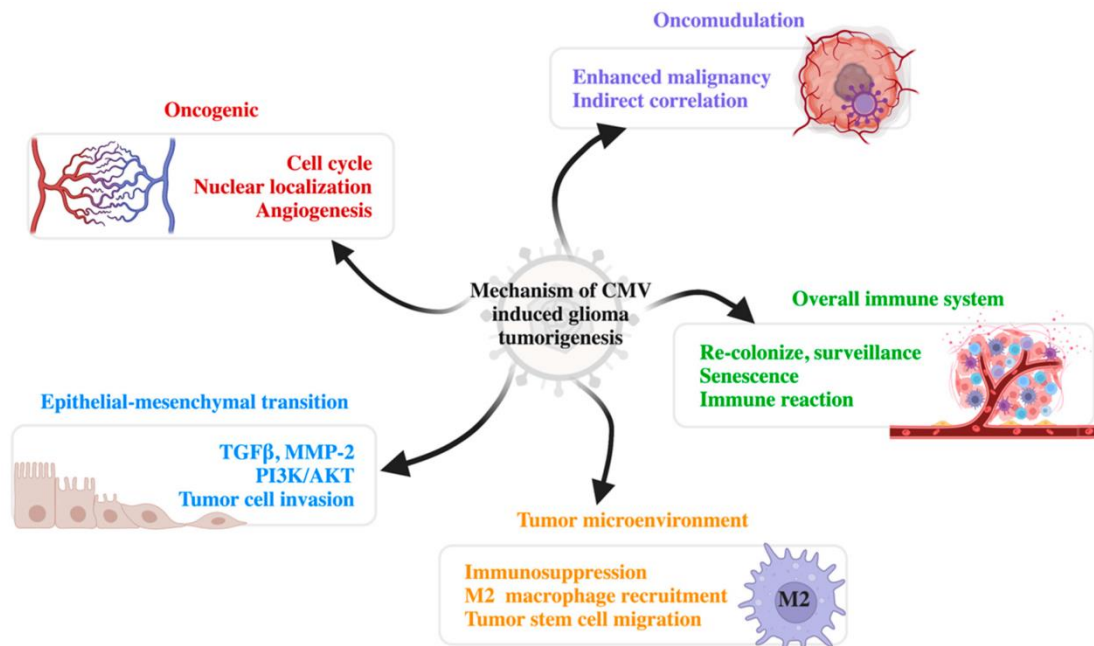
1.3.5. Ο ρόλος του HCMV στο γλοιοβλάστωμα

Από τότε που ο ιός παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε γλοιώματα το 2002, η σχέση του HCMV με τον καρκίνο έχει μελετηθεί εκτενώς στο γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma Multiforme, GBM) [24], με την ύπαρξη και το ρόλο του HCMV να αποτελεί ιδιαίτερο ζήτημα αντιπαράθεσης ανάμεσα στους ερευνητές στο συγκεκριμένο τύπο κακοήθειας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει την παρουσία του ιού στο γλοιοβλάστωμα, παράλληλα όμως εξίσου πολλές είναι και οι αναφορές αδυναμίας ανίχνευσής του. Ωστόσο, σημειώνεται πως αυτό πιθανόν να οφείλεται στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία, καθώς επίσης και στο γεγονός πως δεν υπάρχει μια κοινώς αποδεκτή προσέγγιση για τον εντοπισμό του ιού, ο οποίος μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να είναι ιδιαίτερα δύσκολος λόγω χαμηλών επιπέδων μόλυνσης. Έως σήμερα, οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό DNA και πρωτεϊνών του HCMV σε ανθρώπινους ιστούς γλοιοβλαστώματος είναι ο *in situ* υβριδισμός, η ηλεκτρονική μικροσκοπία, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η δοκιμασία ενζυμο-συζευγμένης ανοσοπροσρόφησης (ELISA), η κυτταρομετρία ροής, καθώς και μέθοδοι ανοσοϊστοχημείας. Συνολικά, μέσω των τεχνικών αυτών, μελέτες έχουν εντοπίσει τη παρουσία των ιικών πρωτεϊνών IE1, US28, pp65, gB, HCMV IL-10, pp28, καθώς και τα γονίδια IE1 και gB σε ιστούς γλοιωμάτων, ενώ σε φυσιολογικούς ιστούς του εγκεφάλου, γύρω από τον περιοχή του όγκου, δεν έχει παρατηρηθεί αντίστοιχη παρουσία πρωτεϊνών ή νουκλεοτιδίων του ιού [25].

Ένα εξίσου αμφιλεγόμενο ζήτημα αποτελεί η κατάσταση του κύκλου ζωής του ιού στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος. Η ύπαρξη του ιού μέσα στο γλοιοβλάστωμα δε φαίνεται να ακολουθεί στενά μόνο ένα από τα δύο κλασσικά μονοπάτια της λυτικής ή της λανθάνουσας μόλυνσης. Η λυτική μόλυνση του ιού χαρακτηρίζεται από ενδοπυρηνική έκφραση των άμεσα πρώιμων γονιδίων IE1 και IE2. Τα γονιδιακά τους προϊόντα, σε συνδυασμό με αυτά των καθυστερημένα πρώιμων γονιδίων (DE), ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων του ιού και του ξενιστή, τα οποία με τη σειρά τους κινούν τη διαδικασία της ιικής αντιγραφής. Η διαδικασία αυτή διευκολύνεται περαιτέρω, καθώς τα ίδια αυτά γονιδιακά προϊόντα παρεμποδίζουν την κυτταρική απόπτωση. Από ιστολογική πλευρά, η παρουσία ενδοπυρηνικών ιικών πρωτεϊνών σε μορφή έγκλειστων σωματίων (Owl's Eye) επιβεβαιώνουν τη διάγνωση. Ωστόσο, η συγκεκριμένη εικόνα δεν έχει παρατηρηθεί σε δείγματα γλοιοβλαστώματος ούτε σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα γλοιώματος (gCSCs). Επίσης, έως και σήμερα, δεν έχει δειχθεί ποτέ η παραγωγή μολυσματικών ιοσωματίων σε κύτταρα γλοιωμάτων. Από την άλλη πλευρά, η λανθάνουσα κατάσταση του ιού χαρακτηρίζεται από την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στον ξενιστή χωρίς έκφραση των λυτικών

γονιδίων (στα οποία περιλαμβάνονται και τα γονίδια IE) και την παραγωγή νέων ιοσωμάτων. Μόνο ένα μικρό ποσοστό των μεταγράφων του HCMV που συνδέονται με την λανθάνουσα κατάσταση έχουν εντοπιστεί σε γλοιώματα, ωστόσο η παρουσία της IE1 υποδεικνύει πως ο ιός δε βρίσκεται σε πραγματική λανθάνουσα κατάσταση εντός των κυττάρων γλοιοβλαστώματος [25].

Ως προς τη σχέση του HCMV με την ογκορύθμιση, πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει πως οι ογκορυθμιστικές ιδιότητες του ιού έχουν σημαντική εφαρμογή στο γλοιοβλάστωμα. Η υψηλή έκφραση της ιικής πρωτεΐνης IE1 στο γλοιοβλάστωμα έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση των ασθενών, ενώ αντιικά φάρμακα και ανοσοθεραπείες, οι οποίες στοχεύουν συγκεκριμένα τον HCMV, έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα ως προς τη βελτίωση του χρόνου επιβίωσης των ασθενών [26]. Η πρωτεΐνη UL33, μια από τις τέσσερις G-πρωτεΐνες που κωδικοποιεί ο ιός, φαίνεται να συνεισφέρει στην ογκορυθμιστική ικανότητα του ιού, καθώς η δράση της έχει συνδεθεί με την επαγωγή μονοπατιών απόκρισης στη φλεγμονή και ενεργοποίησης της αγγειογένεσης. Επιπλέον, η έκφραση της εμφανίζεται να προωθεί τον φαινότυπο πολλαπλασιασμού σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος U251, τόσο σε συνθήκες καλλιέργειας, όσο και *in vivo* σε μοντέλα ποντικών [26]. Η πρωτεΐνη US28, η οποία επίσης αποτελεί μια ιική G-πρωτεΐνη, έχει συνδεθεί και αυτή με ανοδική ρύθμιση της κυτοκίνης IL-6, του αυξητικού παράγοντα VEGF, της κυκλίνης D1 και του παράγοντα NF-κB, οι οποίοι επάγουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης [25]. Ακόμα, η μόλυνση από HCMV φαίνεται να αυξάνει τον αριθμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (GCSCs), ενός υποπληθυσμού άκρως ογκογενετικών καρκινικών κυττάρων, τα οποία έχουν απεριόριστη δυνατότητα αυτοανανέωσης και παρουσιάζουν ιδιαίτερη αντίσταση στις κλασικές θεραπείες. Ο ιός φαίνεται να συμβάλει στη διατήρηση των κυττάρων αυτών σε αδιαφοροποίητη βλαστική κατάσταση, προωθώντας έτσι την αύξηση της επιθετικότητας των όγκων γλοιοβλαστώματος [27]. Τέλος, η παρουσία του ιού έχει επίσης συνδεθεί με τη διατήρηση σημάτων πολλαπλασιασμού, αποφυγή της αναστολής της κυτταρικής αύξησης, ενεργοποίηση της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), της διήθησης και της μετάστασης καθώς και με περιπτώσεις επαγωγής γενωμικής αστάθειας σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος [25, 28, 29]. Με βάση τα παραπάνω, οι ογκορυθμιστικές ιδιότητες του HCMV στο γλοιοβλάστωμα είναι ένα από τα σημεία τα οποία θεωρούνται πλέον καθολικώς αποδεκτά, καθώς επαρκής αριθμός ερευνών έχει δείξει την άμεση σύνδεση της βιολογίας του HCMV με βασικές αλλαγές στη φυσιολογία των κυττάρων, οι οποίες αποτελούν σημεία κατατεθέντα του καρκίνου και συμμετέχουν στη ρύθμιση των κακοηθών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων [22, 25].



Εικόνα 3. Μηχανισμοί ογκορύθμισης/ογκογένεσης του HCMV στο γλοιοβλάστωμα [30].

1.4. Μικρο-RNAs (miRNAs)

Τα μικρο-RNAs (microRNAs/miRNAs) αποτελούν εξελικτικά συντηρημένα, μικρά μόρια RNA μήκους 20-30 νουκλεοτιδίων, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες [31, 32]. Ρυθμίζουν αρνητικά την γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, καθώς προσδένονται συμπληρωματικά στις μη μεταφραζόμενες περιοχές (3' UTRs) των αγγελιαφόρων RNA (mRNA) – στόχων τους, με αποτέλεσμα την αποδόμηση τους και καταστολής της μετάφρασης τους σε πρωτεΐνες [33]. Τα γονίδια-στόχοι των miRNAs εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας πληθώρας κρίσιμων για το κύτταρο διεργασιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η απόπτωση [33]. Τα τελευταία χρόνια, όλο και μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ερευνών που συνδέουν την έκφραση των miRNAs με τον καρκίνο. Το ποσοστό των miRNA γονιδίων τα οποία έχουν ανακαλυφθεί σε περιοχές του γονιδιώματος που εμπλέκονται στο καρκίνο ξεπερνά το 50% [31], ενώ σε καρκινικά κύτταρα η έκφραση πολλών miRNAs παρουσιάζεται ιδιαίτερα απορρυθμισμένη [34], υποδηλώνοντας το ρόλο-κλειδί που φαίνεται να έχουν τελικά τα miRNAs στην ογκογένεση. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως τα απορρυθμισμένα επίπεδα miRNAs μπορούν να επηρεάσουν βασικές κυτταρικές διαδικασίες, οι οποίες ανήκουν στα «Σημεία Κατατεθέντα του Καρκίνου», όπως ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η αποφυγή των αναστολέων κυτταρικής ανάπτυξης, η αντίσταση στην απόπτωση, καθώς και η ενεργοποίηση των διεργασιών της διήθησης, της μετάστασης και της αγγειογένεσης [34]. Σημαντικός είναι επίσης ο αριθμός των μελετών που χαρακτηρίζει ως πολλά υποσχόμενη τη προοπτική μελλοντικής αξιοποίησης των miRNAs στη κλινική πράξη, με πολλά miRNAs να έχουν ήδη προταθεί τόσο ως θεραπευτικοί στόχοι ή εργαλεία, αλλά και ως πιθανοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για την αντιμετώπιση πολλών τύπων κακοηθών όγκων [34, 35].

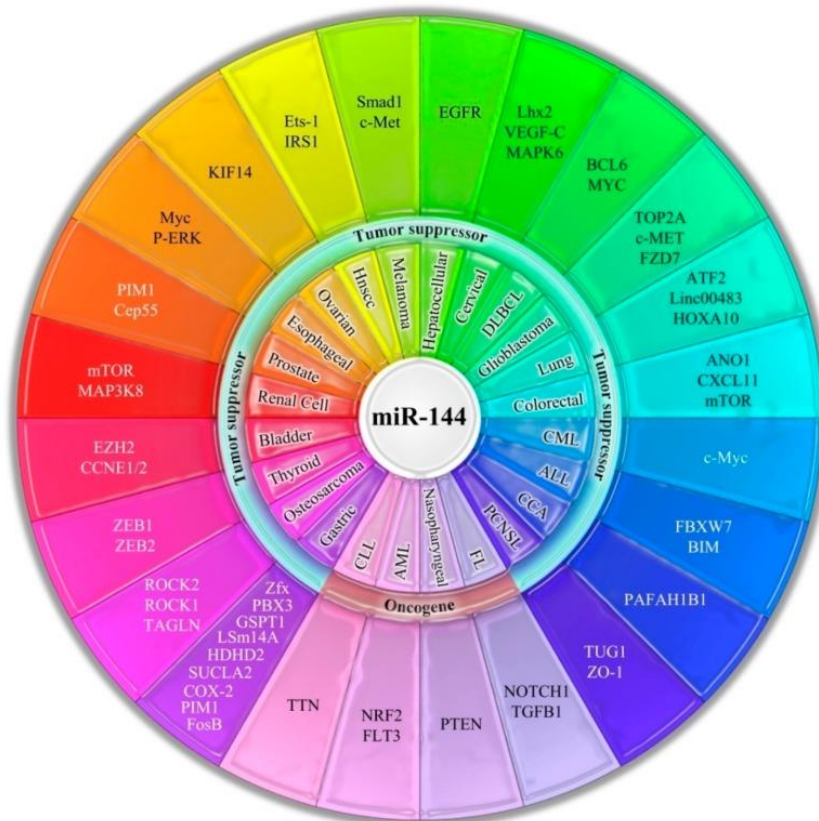
1.4.1. Ο ρόλος του miR-144 στον καρκίνο

Το miR-144 βρίσκεται στη χρωμοσωμική περιοχή 17q11.2 του γονιδιώματος και αποτελεί σήμερα ένα από τα πιο ελκυστικά miRNA για μελέτη και ανάλυση. Η έκφραση του φαίνεται να απορρυθμίζεται σημαντικά σε όγκους ασθενών πολλών τύπων καρκίνων, ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται σε βιολογικές διεργασίες ζωτικές για την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, όπως η διείσδυση, η μετανάστευση, η αγγειογένεση και ο κυτταρικός κύκλος [35]. Είναι γνωστό ότι τα miRNAs μπορούν να δράσουν είτε ως ογκογονίδια, είτε ως ογκοκαταστολείς κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [34] και στοχεύοντας συγκεκριμένα γονίδια-στόχους με ποικίλες βιολογικές λειτουργίες σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών [31]. Αντιστοίχως, και το miR-144 φέρεται να έχει διπλή δράση, λειτουργώντας ως καταστολέας των καρκινικών ιδιοτήτων στο γαστρικό καρκίνο, στο οστεοσάρκωμα, στο καρκίνο του θυρεοειδούς, στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης, στο καρκίνο του προστάτη, στον καρκίνο του οισοφάγου, στο καρκίνο των ωοθηκών, στο καρκίνο κεφαλής και τραχήλου, στο μελάνωμα, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στο καρκίνο του πνεύμονα, στον κολοορθικό καρκίνο, στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, στο γλοιοβλάστωμα, στο καρκίνο του νεφρού, στο διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBCL), στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML), στην οξεία λεμφοκυτταρική ή λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL), στο χολαγγειοκαρκίνωμα (CCA) και στο πρωτογενές λέμφωμα κεντρικού νευρικού συστήματος (PCNSL), ενώ ως επαγωγέας της ογκογενετικής διαδικασίας στις περιπτώσεις του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος, του ωοθυλακικού καρκινώματος, της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL) και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML) [31].

1.4.2. Ο ρόλος του miR-144 στο γλοιοβλάστωμα

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, ο ρόλος του miR-144 στο γλοιοβλάστωμα χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικός. Έχει δείχθει πως τα επίπεδα miR-144 ρυθμίζονται καθοδικά στα δείγματα όγκων ασθενών με γλοιοβλάστωμα σε σύγκριση με δείγματα από υγιείς εγκεφαλικούς ιστούς, ενώ η χαμηλή έκφραση miR-144 εμφανίζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με κακή πρόγνωση και μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών με γλοιοβλάστωμα [36, 37]. Το miR-144 φαίνεται να καταστέλλει τις κακοήθεις ιδιότητες των κυττάρων γλοιοβλαστώματος στοχεύοντας το γονίδιο MET, η αυξημένη δραστηριότητα του οποίου συχνά συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό και τη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων [36]. Αντίθετα, η καταστολή της έκφρασης του miR-144, είτε μέσω μορίων-ρυθμιστών του, όπως το μακρύ μη-κωδικοποιό RNA (lncRNA) RP1-86C11.7, είτε μέσω τεχνητών μορίων-καταστολέων (inhibitors), επιφέρει στα κύτταρα διαμετρικά αντίθετα αποτελέσματα, επιδεινώνοντας την κακοήθη συμπεριφορά [38]. Στόχο του miR-144 στο γλοιοβλάστωμα αποτελεί και το γνωστό ογκογονίδιο FZD7, η καταστολή του οποίου περιορίζει τη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος [37]. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-144 σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος φέρεται να είναι σε θέση να μειώσει τη μεταναστευτική και διεισδυτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, καθώς και να αυξήσει την ευαισθησία τους στο χημειοθεραπευτικό φάρμακο DCA (dichloroacetate), πιθανά στοχεύοντας την έκφραση των PDK1, TIGAR, IDH1 και IDH2 [39]. Παρόμοια επίδραση έχει δείχθει να

έχει η χορήγηση miR-144 και όσον αφορά τη χημειοευαισθησία στην τεμολοζαμίδη και η οποία πιθανά επιτυγχάνεται μέσω της αρνητικής ρύθμισης των γονιδίων CAV2 και FGF7 [40]. Τέλος, η δράση του miR-144 έχει διερευνηθεί και στο περιβάλλον της μόλυνσης του HCMV. Έτσι, φαίνεται πως μετά τη μόλυνση κυτταρικών σειρών, αλλά και ιστών γλοιοβλαστώματος με HCMV, η έκφραση του miR-144 μειώνεται σημαντικά, ενώ αντίθετα αυξημένη έκφραση παρουσιάζει η TOP2A, μόριο που αποτελεί σημαντικό καρκινικό βιοδείκτη και παράλληλα αρνητικό στόχο ρύθμισης του miR-144 [41]. Υπερέκφραση, ωστόσο, του miR-144 εμφανίζεται να έχει για ακόμη μια φορά ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, καθώς και την αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε *in vivo* μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού [41].



Εικόνα 4. Οι στόχοι και ο ρόλος του miR-144 στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου [31].

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Κύτταρα και Ιοί

Έγινε χρήση κυττάρων της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς γλοιοβλαστώματος U373MG και πρωτογενών ανθρώπινων ινοβλαστών της ακροποσθίας (Primary Human Foreskin Fibroblasts, HFFs). Οι ανθρώπινοι ινοβλάστες χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό και την τιτλοποίηση του ιού. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Biosera) με προσθήκη 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Biosera) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (penicillin/streptomycin) (Biosera) σε επωαστήρα με θερμοκρασία 37°C και παρουσία 5% CO₂. Για τις ιικές μολύνσεις που πραγματοποιηθήκαν, έγινε χρήση του εργαστηριακού αγρίου τύπου στελέχους του HCMV AD169, με τίτλο 3 x 10⁷ PFU (plaque-forming unit)/ml.

2.1.1. Καλλιέργεια HCMV

Το αγρίου τύπου εργαστηριακό στέλεχος HCMV-AD169, χαρακτηρίζεται από έλλειψη περίπου 19 γονιδίων (15 kb) στο UL τμήμα του γονιδιώματός του. Τα γονίδια που λείπουν, ωστόσο, δεν εμπλέκονται στον κύκλο ζωής του ιού, καθιστώντας το ιδανικό για εργαστηριακή χρήση. Το stock του ιού πολλαπλασιάστηκε σε κύτταρα HFF, σύμφωνα με τα τυπικά πρωτόκολλα.

Υλικά:

- DMEM full Glucose 10% FBS, 100mg pen/strep (Biosera Co., Gibco BRL).
- Ξύστρα κυττάρων (cell scraper), 290 mm (SPL Life Sciences Co.).
- Stock ιού HCMV-AD169 (ευγενική χορηγία του C. Sinzger).
- Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων, διαμέτρου 100mm.
- Falcon tubes, χωρητικότητας έως 15ml.

Μέθοδος:

1. Αρχικά, επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (100 mm²) 10⁶ κύτταρα HFF, σε θρεπτικό μέσο DMEM. Έγινε επώαση για 24 ώρες, ώστε τα κύτταρα να προσκολληθούν στην εσωτερική βάση.
2. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε μόλυνση των κυττάρων από το εργαστηριακό στέλεχος του HCMV, AD169, σε MOI 0,5. Το MOI (multiplicity of infection) αντιστοιχεί στο ποσό των κυττάρων που μπορεί να μολύνει ένα σωματίδιο ιού.
3. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων, με συχνή μικροσκοπική παρατήρηση τους, για όσο χρονικό διάστημα χρειάστηκε, έως ότου να αυξηθούν σε μέγεθος και να αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια του πηγαδιού. Αυτή η αλλαγή στη

μορφολογία αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη ενεργού μόλυνσης από HCMV και ονομάζεται κυτταροπαθητικό αποτέλεσμα (cpe).

4. Μόλις το cpe έγινε υπερβολικό, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με χρήση ξύστρας κυττάρων και αποθηκεύτηκαν σε σωληνάριο Falcon 15 mL.
5. Το εναιώρημα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε σε 2.000 rpm για 10 λεπτά και στους 4°C.
6. Το προκύπτον ίζημα περιείχε κύτταρα, στο εσωτερικό των οποίων βρισκόταν ο ιός, (CAV) και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου.
7. Στη συνέχεια, υποβλήθηκε σε υπερήχους υψηλής συχνότητας για 3-4 λεπτά, στους 4°C. Μέσω της έκθεσης σε υπερήχους, προκαλείται κυτταρική σχάση και απελευθέρωση των ιοσωμάτων του HCMV από το εσωτερικό τους.
8. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 rpm στους 4, ώστε να διαχωριστούν τα κυτταρικά θραύσματα από τον ιό.
9. Το υπερκείμενο, όπου περιεχόταν ο HCMV, συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.1.2. Τιτλοποίηση Ιού (Plaque Assay)

Αφού ο ιός πολλαπλασιάστηκε, ακολούθησε, στη συνέχεια, η τιτλοποίηση του, δηλαδή η ποσοτικοποίηση των ιοσωμάτων του ιού. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να γίνεται μόλυνση με τόση ποσότητα ιού, ώστε, αφ' ενός να μην αντιστοιχούν υπερβολικά πολλά σωματίδια ιού ανά κύτταρο και καταστραφεί η καλλιέργεια και, αφ' ετέρου, ώστε ο ιός να είναι αρκετός ώστε η μόλυνση να πραγματοποιηθεί με επιτυχία και να εξελιχθεί με σχετικά γρήγορους ρυθμούς. Η τιτλοδότηση του HCMV έγινε μέσω διαδοχικών αραιώσεων του ιού. Στη συνέχεια, κύτταρα HFF επώαστηκαν με τις διαφορετικές αραιώσεις, έως τον σχηματισμό χαρακτηριστικών κυτταρικών μορφών, των πλακών. Ειδικότερα:

Υλικά:

- Ορός απομονωμένος από αίμα οροθετικών, σε HCMV, ατόμων.
- Stock ιού HCMV-AD169 (ευγενική χορηγία του C. Sinzger).
- Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων με 6 πηγάδια (6-well plates).
- DMEM full Glucose (DMEM Free) (Biosera Co.).
- Αποστειρωμένο Phosphate-buffered saline (PBS), 1X, pH 7,4.
- Χρωστική Giemsa.
- Eppendorf χωρητικότητας έως 1,5 ml.
- Στερεοσκόπιο.

Μέθοδος:

1. Συνολικά 4×10^5 HFF κύτταρα επιστρώθηκαν με DMEM σε 6-well plates και παρέμειναν στον επωαστήρα για 24 ώρες, ώστε να προσκολληθούν στην εσωτερική, κάτω επιφάνεια των πηγαδιών.
2. Μετά από 24 ώρες παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις του ιικού stock μέσα σε DMEM-free θρεπτικό μέσο, δουλεύοντας πάντα σε πάγο. Οι αραιώσεις κυμαινόταν μεταξύ 10^{-2} έως 10^{-6} . Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε πρώτα η αραιώση 10^{-1} με την προσθήκη 10λ stock ιού σε 90λ DMEM (-). Για την αραιώση 10^{-2} μεταφέρονται 10λ από την αραιώση 10^{-1} σε 90λ DMEM (-). Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τις υπόλοιπες αραιώσεις.
3. Πριν από την προσθήκη του ιού, το DMEM αφαιρέθηκε και αντικαταστάθηκε από μικρή ποσότητα φρέσκου (500λ/πηγάδι περίπου), έτσι ώστε τα κύτταρα να καλυπτόταν ελάχιστα.
4. Στη συνέχεια, σε κάθε πηγάδι προστέθηκε διαφορετική αραιώση του ιού. Η μόλυνση διήρκεσε συνολικά 2 ώρες. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το πιάτο ανακινούνταν απαλά ανά 10 λεπτά.
5. Μετά την περίοδο των 2 ωρών, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από ένα μείγμα ανθρώπινου ορού – DMEM, σε αναλογία 1:100 (200λ ορού σε 20ml πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM). Ο ανθρώπινος ορός είχε ληφθεί από θετικά στον HCMV άτομα, και, άρα, ήταν θετικός σε αντισώματα anti-HCMV IgG. Η προσθήκη του οδηγεί, ουσιαστικά, σε αδρανοποίηση των ιικών σωματιδίων που βρίσκονται ελεύθερα στο θρεπτικό μέσο.
6. Τα μολυσμένα κύτταρα αφέθηκαν να επωαστούν για 10 ημέρες, με καθημερινή παρατήρηση υπό το μικροσκόπιο. Σταδιακά, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός χαρακτηριστικών δομών στα κύτταρα, που ονομάζονται πλάκες. Όσο μικρότερη η αραιώση του ιού, τόσο πιο γρήγορα εμφανίζονται οι πλάκες. (Σε αυτές τις 10 ημέρες (ή παραπάνω, αν η διαδικασία προχωράει με αργά βήματα), συνίσταται η απόρριψη και επαναπροσθήκη του μείγματος ορού, ώστε να αποφευχθεί πιθανή μυκητιακή ανάπτυξη).
7. Όταν κρίθηκε, βάση παρατήρησης, ότι η διαδικασία ήταν έτοιμη να ολοκληρωθεί, έγινε αφαίρεση του υπερκειμένου της καλλιέργειας και μία πλύση με 500λ αποστειρωμένου PBS.
8. Η χρώση των πλακών έγινε με τη χρωστική GIEMSA. Ειδικότερα, περίπου 500λ αδιάλυτου GIEMSA προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι και το πιάτο αφέθηκε να επωαστεί για 2 ώρες.
9. Στη συνέχεια, τα πηγάδια πλύθηκαν πολύ καλά, αλλά προσεκτικά, με τρεχούμενο νερό βρύσης και αφέθηκαν να στεγνώσουν ανάποδα στον αέρα.

10. Τέλος, μετά τη χρώση ήταν δυνατή η στερεοσκοπική παρατήρηση των πλακών. Ειδικότερα, οι πλάκες που αναπτύχθηκαν μετρήθηκαν και ο τίτλος του ιού υπολογίστηκε με τον τύπο: $X = (\# \text{ πλακών})/d \cdot V$ όπου X = ο τίτλος, d = παράγοντας αραίωσης και V = ο όγκος του αραιωμένου ιού.

2.2. miRNA διαμόλυνση (miRNA transfection)

Η ενδογενής έκφραση του miR-144 στη κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U373MG παρουσιάζεται ως ιδιαίτερα χαμηλή. Επομένως, για να μελετηθεί η ακριβής επίδραση του miRNA στο πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των κυττάρων γλοιοβλαστώματος έγινε αρχικά υπερέκφραση του miR-144, μέσω miRNA διαμόλυνσης, μιας τεχνικής εισαγωγής miRNA μιμητών (miRNA mimics) στο κύτταρο, χημικά κατασκευασμένων δηλαδή miRNA μορίων, που μιμούνται την φυσική δράση των miRNAs μετά την κυτταρική τους ενσωμάτωση. Η τεχνική χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τη τελευταία δεκαετία για τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθορισμό της δράσης ή/και των μορίων-στόχων των miRNAs σε διάφορους τύπους κυττάρων.

Για τη διαδικασία της διαμόλυνσης, στρώθηκαν κύτταρα της σειράς U373MG σε πιάτα με 12 πηγάδια (12-well plates), με 15×10^4 κύτταρα/πηγάδι (cells/well). Μετά από 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διαμόλυνσης με λιποφεκταμίνη RNAi MAX (Invitrogen) για κάθε πηγάδι, με την προσθήκη miR-144 μιμητών (5' GGAUAUCAUCAUAUACUGUAAG 3'), συγκέντρωσης 50nM, σε 45 μl θρεπτικό. Η ανάλογη διαδικασία έγινε και για τη διαμόλυνση miR-144 αναστολέων (5' CUUACAGUAUAUGAUGAUAUCC 3'), συγκέντρωσης 50nM, στα κύτταρα. Η έκφραση των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς (control) μαζί με κύτταρα U373MG, τα οποία δεν είχαν δεχτεί καμία μεταχείριση. Σε αντίθεση με τους μιμητές miRNA, οι αναστολείς miRNA (miRNA inhibitors), οι οποίοι αποτελούν επίσης συνθετικά μόρια, καταστέλλουν την έκφραση και λειτουργία των ενδογενών miRNAs των κυττάρων, επιτρέποντας την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους και μεταβάλλοντας θεωρητικά τις ιδιότητες ή/και τον φαινότυπο των κυττάρων με διαφορετικό τρόπο από τους αντίστοιχους τους miRNA μιμητές. Με βάση το πρωτόκολλο αποτελεσματικής δράσης της λιποφεκταμίνης, έγινε επώαση των κυττάρων μέσα στο μέσο διαμόλυνσης για 48 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού και αντικατάσταση του με νέο θρεπτικό DMEM 10% FBS + 1% P/S, μέσα στο οποίο παρέμειναν τα κύτταρα για 48 ακόμα ώρες στους 37°C και παρουσία 5% CO₂. Στη περίπτωση που ήταν επιθυμητές οι ιικές μολύνσεις των κυττάρων μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα παρέμειναν στον επωαστήρα για 24 ώρες με το νέο θρεπτικό. Στη συνέχεια, μετά από αφαίρεση του θρεπτικού και αντικατάσταση του με DMEM 1% FBS + 1% P/S, έγιναν οι ιικές μολύνσεις (MOI 1) για 72 ώρες. Έτσι, συνολικά τέσσερις ημέρες μετά την έναρξη της διαδικασίας της διαμόλυνσης (έξι συνολικά ημέρες στη περίπτωση των μολυσμένων κυττάρων), έγινε συλλογή των πιάτων με τα κύτταρα. Αφού αφαιρέθηκε το υπάρχον θρεπτικό υλικό από κάθε πηγάδι και έγινε μια πλύση των κυττάρων με παγωμένο PBS (non sterile) για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού και νεκρών κυττάρων από τα

πηγάδια, έγινε αποθήκευση των πιάτων στους -80°C , μέχρι τη διαδικασία απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος RNA από τα κύτταρα (RNA extraction).

2.3. Αντίστροφη Μεταγραφή RNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μέθοδο πολλαπλασιασμού ενός συγκεκριμένου τμήματος αλληλουχίας DNA και παραγωγής εκατομμυρίων έως και δισεκατομμυρίων αντιγράφων του μέσα από πολύ μικρό δείγμα. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR) ή αλλιώς ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) αποτελεί μέθοδο βασισμένη στην κλασσική αντίδραση της PCR, όντας όμως πολύ πιο ακριβής, καθώς υπολογίζει την συγκέντρωση του παραγόμενου DNA κατά τη διάρκεια και όχι κατά το τέλος της αντίδρασης (όπως η κλασσική PCR). Στην real-time PCR γίνεται χρήση χρωστικών που προσδένονται στο DNA και έτσι μετρώντας τα επίπεδα φθορισμού μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης, έχουμε αντίστοιχα εικόνα της συγκέντρωσης των παραγόμενων προϊόντων DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), η οποία επίσης βασίζεται στην real-time PCR και είναι και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία, αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το RNA των κυττάρων των οποίων μας ενδιαφέρει η μεταγραφική έκφραση χρησιμοποιείται ως “καλούπι” για τη σύνθεση cDNA (complementary DNA), μέσω του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Στο δεύτερο στάδιο, το cDNA αυτό υπόκειται κανονικά στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR), με τελικό σκοπό την λήψη αποτελεσμάτων για τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων σε επίπεδο RNA.

Απομόνωση RNA (RNA Extraction) και Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription)

Αφού τα πιάτα βγήκαν από τους -80°C , τοποθετήθηκαν σε πάγο και η διαδικασία απομόνωσης RNA έγινε με βάση το πρωτόκολλο του NucleoSpin® miRNA Isolation Kit (MACHEREY-NAGEL). Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης, μετρήθηκε η συγκέντρωση του ολικού RNA του κάθε δείγματος σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher). Με βάση την συγκέντρωση αυτή, έγινε υπολογισμός του όγκου δείγματος που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί στην κάθε αντίδραση για τη σύνθεση του cDNA. Η τελική επιθυμητή ποσότητα RNA σε κάθε δείγμα ήταν 6000 ng (6μg). Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA με PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription PCR) με βάση το πρωτόκολλο του Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit, TaKaRa. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής έγινε σε τελικό όγκο 10μl. Τέλος, τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν (τελική αραιώση 1:4), με προσθήκη νερού χωρίς RNάσες (RNase free dH₂O) για την πραγματοποίηση της τελικής αντίδρασης PCR.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε Πραγματικό Χρόνο (qPCR)

Η αντίδραση της Real Time PCR ήταν διαφορετική ανάλογα την έκφραση του μορίου που θέλαμε να εξετάσουμε (miR-144 ή mRNA κάποιου γονιδίου). Έτσι, στην περίπτωση των miR-144 και U6 (μικρό πυρηνικό RNA, το οποίο αποτελεί το πιο κοινό ενδογενές γονίδιο αναφοράς για τα περισσότερα miRNAs), κάθε δείγμα αντίδρασης είχε τελικό όγκο 25μl, αποτελούμενο από 5 μl cDNA του κάθε δείγματος που παράχθηκε στο προηγούμενο στάδιο, 0,5 μl πρόσθιου εκκινητή (forward primer) και 0,5 μl ανάστροφου εκκινητή (reverse primer), 12,5μl ενζύμου SYBR Green (SYBR FAST qPCR Master Mix 2X, Kappa) και 6,5 μl RNase free dH₂O. Για τα γονίδια του GAPDH (γονίδιο αναφοράς) και της ιικής πρωτεΐνης UL54 κάθε δείγμα είχε τελικό όγκο 10μl, αποτελούμενο από 1,5 μl cDNA του κάθε δείγματος που παράχθηκε στο προηγούμενο στάδιο, 0,1 μl πρόσθιου εκκινητή (forward primer) και 0,1 μl ανάστροφου εκκινητή (reverse primer) του αντίστοιχου γονιδίου που εξετάζαμε κάθε φορά, 5μl ενζύμου SYBR Green (SYBR FAST qPCR Master Mix 2X, Kappa) και 3,3 μl RNase free dH₂O. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μηχανήμα AriaMx Real-time PCR System (Agilent).

Γονίδιο	Αλληλουχίες Εκκινητών
miR-144	Forward: 5' GGATATCATCATATACTGTA 3' Reverse: 5' GAACATGTCTGCGTATCTC 3'
GAPDH	Forward: 5' CCTGCACCACCAACTGCTTA 3' Reverse: 5' GGCCATCCACAGTCTTCTGAG 3'
UL54	Forward: 5' TACGAGGTAGCCGAAGATCC 3' Reverse: 5' GGCGACAGCACGTTAGTTAC 3'
U6	Forward: Lot#2112041A Reverse: Lot#2112043A

Μετά την ολοκλήρωση των αντιδράσεων, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αρχικά, υπολογίστηκαν τα ΔCts για κάθε δείγμα, χρησιμοποιώντας τα γονίδια U6 και GAPDH ως γονίδια αναφοράς. Ο αριθμός Ct (Cycle Threshold) της αντίδρασης PCR υποδεικνύει πόσοι κύκλοι αντίδρασης πρέπει να ολοκληρωθούν για να περάσει το σήμα φθορισμού κάποιο συγκεκριμένο κατώφλι το οποίο εμείς έχουμε θέσει. Ο αριθμός Ct αποτελεί επίσης ένδειξη της ποσότητας του νουκλεϊκού οξέως που περιέχεται στο δείγμα μας (όσο πιο χαμηλά είναι τα επίπεδα Ct, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα νουκλεϊκού οξέως). Επομένως, με τον υπολογισμό του ΔCt, δηλαδή με αφαίρεση του Ct του γονιδίου αναφοράς μας (U6 ή GAPDH) από το αντίστοιχο Ct του εξεταζόμενου γονιδίου του κάθε δείγματος, έγινε η κανονικοποίηση των δεδομένων μας, ώστε να μπορούν στη συνέχεια να πραγματοποιηθούν οι επιθυμητές συγκρίσεις. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι για τα ΔCts κάθε συνθήκης συνολικά, τα οποία προήλθαν από 2 ανεξάρτητες επαναλήψεις (n=2) της πειραματικής διαδικασίας. Η σύγκριση των επιπέδων σχετικής μεταγραφικής έκφρασης ανάμεσα σε δύο διαφορετικές συνθήκες έγινε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.4. Δοκιμασία Μεταβολικής Δραστηριότητας (MTT Assay)

Η δοκιμασία MTT είναι μέθοδος μέτρησης της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων, η οποία αποτελεί δείκτη της κυτταρικής βιωσιμότητας, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και της πιθανής κυτταροτοξικότητας υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η δοκιμασία είναι χρωματομετρική και στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει το ένζυμο αφυδρογονάση (dehydrogenase) των ενεργών μιτοχονδρίων των κυττάρων να διασπά το αλάτι τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), το οποίο έχει κίτρινο χρώμα, σε κρυστάλλους φορμαζάνης (formazan crystals), οι οποίοι έχουν μωβ χρώμα. Αφού οι σχηματιζόμενοι κρύσταλλοι διαλυθούν σε DMSO (Dimethylsulfoxide), η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) τους γίνεται σε φασματοφωτόμετρο (ELISA reader), με την τελική απορρόφηση να είναι ανάλογη με τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στη καλλιέργεια. Στη συγκεκριμένη εργασία, η δοκιμασία MTT πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη παρατήρηση της πιθανής επίδρασης του miR-144 στον πολλαπλασιασμό κυττάρων γλοιοβλαστώματος, παρουσία ή όχι ιικής μόλυνσης από HCMV.

Αρχικά, στρώθηκαν κύτταρα σε πιάτα με 96 πηγάδια (96-well plates), 10.000 κύτταρα/πηγάδι (cells/well). Μια ημέρα μετά το στρώσιμο των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με miR-144 μιμητές και miR-144 αναστολείς, καθώς και μόλυνση των κυττάρων με HCMV (MOI 3). Μετά το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, το οποίο κυμαινόταν από 24 έως 96 ώρες μετά τη διαδικασία της διαμόλυνσης, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού και προσθήκη 100 μl μείγματος θρεπτικού DMEM- και του αντιδραστηρίου MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, 98%, ACROS ORGANICS, 158990050) (τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml) για 4 ώρες στους 37°C και παρουσία 5% CO₂. Στη συνέχεια, έγινε ξανά αφαίρεση του μείγματος MTT και προσθήκη 200 μl DMSO (Dimethyl sulfoxide, EMR031500, EuroClone), για επώαση 30 λεπτών, μετά από καλή διάλυση των κρυστάλλων στα πηγάδια. Η φωτομέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά, στο φάσμα των 540 nm.

2.5. Δοκιμασία Επούλωσης Τραύματος In Vitro (In Vitro Wound Healing Assay)

Η δοκιμασία επούλωσης τραύματος αποτελεί μια μέθοδο υπολογισμού του μεταναστευτικού ρυθμού των κυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας. Κατά τη διαδικασία, δημιουργείται ένα τραύμα σε κυτταρική μονοστιβάδα και στη συνέχεια η σταδιακή επούλωση του τραύματος παρακολουθείται και καταγράφεται μέσω λήψης φωτογραφιών ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μέσα από την τελική σύγκριση των φωτογραφιών των συνθηκών μεταξύ τους, γίνεται και η ανάλογη σύγκριση του ποσοστού επούλωσης του τραύματος και άρα η σύγκριση της ταχύτητας της κυτταρικής μετανάστευσης ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες. Στη συγκεκριμένη εργασία, η δοκιμασία επούλωσης τραύματος πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη

παρατήρηση της πιθανής επίδρασης του miR-144 στην μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, παρουσία ή όχι ιικής μόλυνσης από HCMV.

Αρχικά, στρώθηκαν κύτταρα U373MG, σε πιάτα με 6 πηγάδια (6-well plates). Μια ημέρα μετά το στρώσιμο των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με miR-144 μιμητές και miR-144 αναστολείς. Στις περιπτώσεις που ήταν επιθυμητή η ιική μόλυνση (MOI 1), αυτή πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας των 72 ωρών από τη διαμόλυνση, για 72 επιπλέον ώρες. Επομένως, η δοκιμασία επούλωσης τραύματος ξεκίνησε 3 ημέρες μετά τη διαμόλυνση για τα μη μολυσμένα και 6 ημέρες μετά τη διαμόλυνση για τα μολυσμένα κύτταρα. Προκλήθηκαν με την άκρη ενός tip πιπέττας οριζόντιες γραμμές (τραύμα) στη μονοστοιβάδα των μολυσμένων και μη κυττάρων σε κάθε πηγάδι και έπειτα παρατηρήθηκε η πορεία επούλωσης του τραύματος μετά από 0, 24, 48 και 72 ώρες. Η παρατήρηση της επούλωσης έγινε σε ανάστροφο μικροσκόπιο και για κάθε χρονικό σημείο παρατήρησης γινόταν λήψη φωτογραφίας της κάθε συνθήκης σε δύο σημεία. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά δύο επαναλήψεις του πειράματος (n=2) και η ποσοτικοποίηση της κινητικότητας των κυττάρων έγινε με το πρόγραμμα ImageJ, μετά από μέτρηση διαφορετικών σημείων του ανοίγματος του τραύματος για την φωτογραφία κάθε χρονικού σημείου και υπολογισμό του μέσου όρου των αποστάσεων αυτών για κάθε μία συνθήκη. Τέλος, με βάση τα παραπάνω δεδομένα έγινε η τελική ποσοτικοποίηση των ποσοστών επούλωσης για κάθε συνθήκη και μεταξύ τους σύγκριση, με συνθήκη αναφοράς τα κύτταρα U373MG για κάθε ομάδα σύγκρισης.

2.7. Στατιστική Ανάλυση

Όλα τα δεδομένα που παρατίθενται αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητα πειράματα και παρουσιάζονται ως η μέση \pm τυπική απόκλιση. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονόδρομη ANOVA ακολουθούμενη από διαδοχικά t-tests, χρησιμοποιώντας λογισμικό GraphPad 8.3.1 (GraphPad Software, Inc.).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

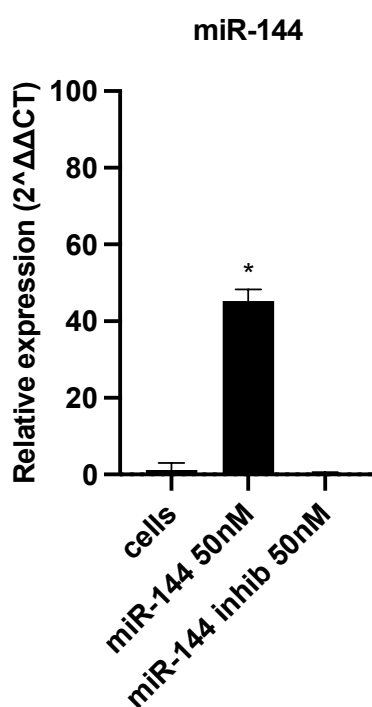
3.1. Έλεγχος κυτταροτοξικότητας και βελτιστοποίηση της διαδικασίας διαμόλυνσης των U373MG κυττάρων γλοιοβλαστώματος με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς

Πριν τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης των κυττάρων U373MG με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς, καθώς οι ακριβείς ποσότητες των miRNA μιμητών ή των αναστολέων που απαιτούνται για την αποτελεσματική στόχευση ενός γονιδίου-στόχου ή αντίστοιχα την αναστολή της φυσιολογικής δράσης ενός miRNA διαφέρει, ανάλογα με τη κυτταρική σειρά, το πρωτόκολλο διαμόλυνσης που ακολουθείται, καθώς και το ίδιο το miRNA. Αναφέρεται πως γενικά οι miRNA μιμητές δύνανται να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους ξεκινώντας από συγκέντρωση 0.5nM. Ωστόσο, σημειώνεται πως αν είναι επιθυμητή η τελική μελέτη των στόχων αυτών σε πρωτεϊνικό επίπεδο, είναι πιθανό να απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ώστε το αποτέλεσμα να είναι εμφανές στην ανάλυση. Αντίστοιχα, στην πλειοψηφία τους, οι miRNA αναστολείς φαίνεται να ξεκινούν την καταστολή των δράσεων των αντίστοιχων τους miRNA από τα 50nM, χωρίς αυτό να αποκλείει την αποτελεσματικότητα της δράσης τους σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Έτσι, προκειμένου να εντοπιστεί η ποσότητα μιμητών και αναστολέων του miR-144 που θα επέφερε τα βέλτιστα αποτελέσματα επιμόλυνσης στη κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U373MG, πραγματοποιήθηκαν αρχικά δοκιμές διαμόλυνσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις μιμητών και αναστολέων. Οι τρεις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν ήταν τα 5nM, τα 50nM και τα 100nM. Διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωση 5nM, τόσο των μιμητών όσο και των αναστολέων, δεν ήταν επαρκής για να επιφέρει εμφανείς αλλαγές των μεταγραφικών επιπέδων του miR-144, ενώ στη περίπτωση της συγκέντρωσης 100nM, η διαμόλυνση με miR-144 μιμητές αποδείχτηκε κυτταροτοξική για τα κύτταρα. Με βάση τα παραπάνω, η συγκέντρωση των 50nM επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για τη δράση των miR-144 μιμητών και αναστολέων στη κυτταρική σειρά U373MG. Επιπλέον, εκτός από τη συγκέντρωση, ελέγχθηκε και ο παράγοντας του χρόνου, καθώς οι miRNA μιμητές και αναστολείς σπανίως προκαλούν αλλαγές στη μεταγραφική και πρωτεϊνική έκφραση του κυττάρου αμέσως μετά τη διαμόλυνση. Επομένως, πριν την έναρξη των πειραματικών διεργασιών, ήταν απαραίτητο να καθοριστεί ο χρόνος που απαιτούνταν να παρέλθει μετά τη διαμόλυνση, ώστε αυτή να κριθεί ως αποτελεσματική και να πραγματοποιηθεί μετέπειτα η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αφού ελέγχθηκαν χρόνοι από τις 0 μέχρι τις 168 ώρες μετά τη διαμόλυνση, διαπιστώθηκε πως η δράση των miR-144 μιμητών και αναστολέων ξεκινά ήδη από τις 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση, ωστόσο φαίνεται να γίνεται πιο αποτελεσματική με το πέρασμα των 48-72 ωρών μετά τη διαμόλυνση. Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί διαμόλυνση των κυττάρων U373MG, αναμονή για 72 ώρες και στη συνέχεια να ακολουθεί οποιαδήποτε άλλη πειραματική μεταχείριση, όπως στη περίπτωση της συγκεκριμένης εργασίας, οι ιικές μολύνσεις. Εξαιρέση στην

παραπάνω μέθοδο αποτέλεσε η περίπτωση της δοκιμασίας MTT, κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα τόσο η miRNA διαμόλυνση αλλά και η ιική μόλυνση, ώστε τα αποτελέσματα του ρυθμού αύξησης μεταξύ μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων να είναι απόλυτα συγκρίσιμα στους επιλεγμένους χρόνους μετά τη διαμόλυνση.

3.2. Έλεγχος ενδογενών επιπέδων miR-144 σε U373MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος και πειράματα διαμόλυνσης με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς, έγινε έλεγχος των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης του miR-144 υπό τρεις διαφορετικές συνθήκες: σε κύτταρα U373MG τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση και περιείχαν μόνο τον όγκο του θρεπτικού καλλιέργειας, χωρίς το microRNA και χωρίς τη λιποφεκταμόνη (cells), σε κύτταρα U373MG τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές συγκέντρωσης 50nM (miR-144 50nM) και σε κύτταρα U373MG τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς συγκέντρωσης 50nM (miR-144 inhib 50nM). Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της qPCR για όλα τα δείγματα, έγινε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, με σκοπό τη σύγκριση της σχετικής έκφρασης του miR-144 ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες.



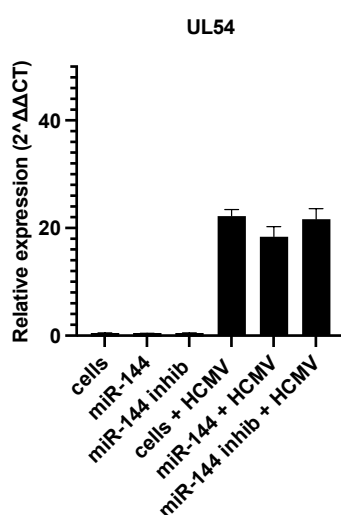
Εικόνα 5. Η σχετική μεταγραφική έκφραση του miR-144 σε κύτταρα U373MG, τα οποία είτε είχαν είτε δεν είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς. *: $p = 0.03$.

Πράγματι, μετά τη διαμόλυνση, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης του miR-144 ανάμεσα στα κύτταρα που είχαν υποστεί

διαμόλυνση με miR-144 μιμητές (miR-144 50nM) και σε κύτταρα U373MG (cells), καθώς και σε κύτταρα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς (miR-144 inhib 50nM) (**Εικόνα 5**). Συγκεκριμένα, υπό συνθήκες διαμόλυνσης με miR-144, τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης του miR-144 εμφανίστηκαν σημαντικά υψηλότερα ($p = 0.03$) από τα αντίστοιχα των κυττάρων U373MG και των κυττάρων διαμολυσμένων με miR-144 αναστολείς, ενώ αντίστοιχα υπό συνθήκες διαμόλυνσης με miR-144 αναστολείς, τα επίπεδα miR-144 παρουσιάστηκαν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των δύο άλλων συνθηκών. Αξίζει εδώ να σημειωθεί πως η μείωση των επιπέδων miR-144 μετά τη διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς δεν εμφανίζεται να είναι τόσο δραστική όσο η αντίστοιχη αύξηση μετά τη διαμόλυνση με miR-144 μιμητές, γεγονός που πιθανά οφείλεται στο ιδιαίτερα χαμηλό επίπεδο ενδογενούς έκφρασης του miR-144 στη κυτταρική σειρά U373MG.

3.3. Επιβεβαίωση της μόλυνσης των κυττάρων με HCMV

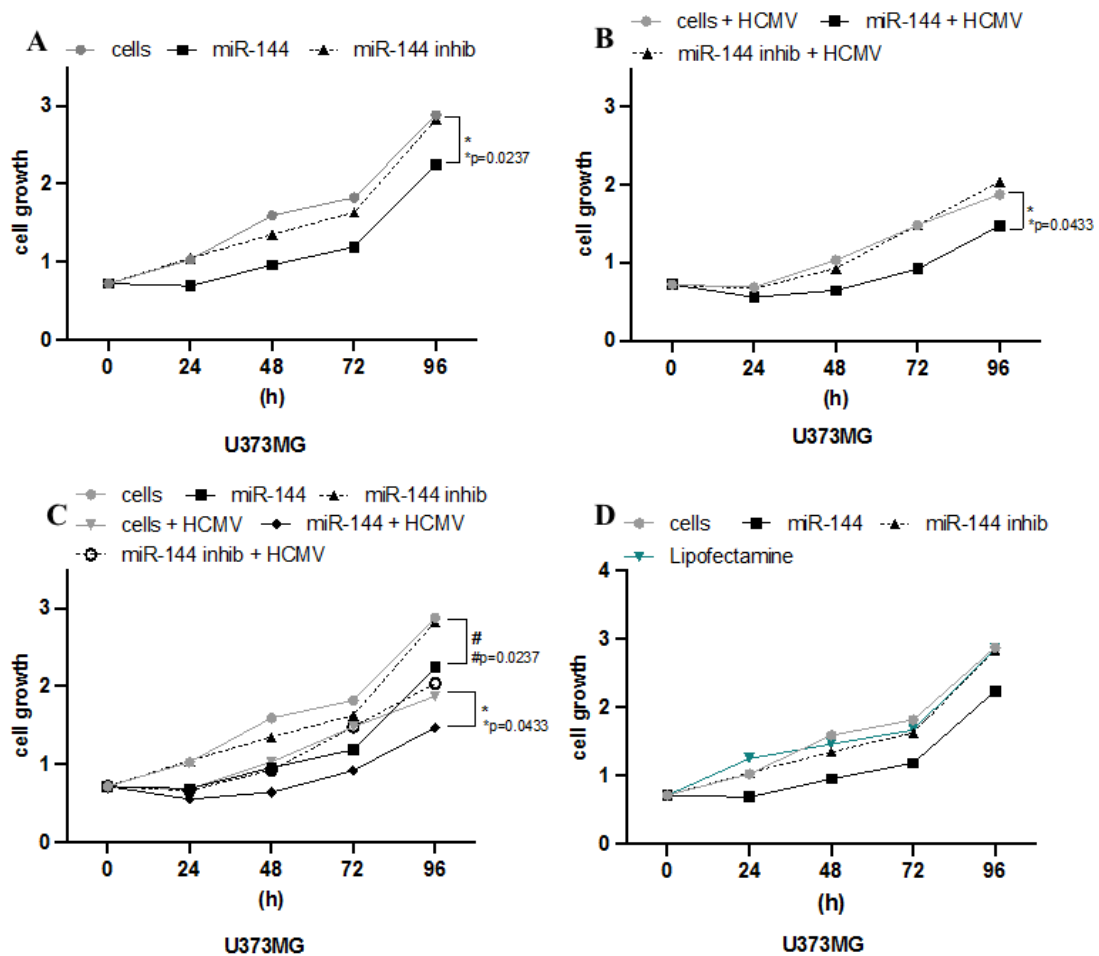
Για να επιβεβαιωθεί η μόλυνση των κυττάρων με τον HCMV προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της υπερέκφρασης ή αναστολής του miR-144, τα κύτταρα όλων των συνθηκών μολύνθηκαν με το εργαστηριακό στέλεχος AD169wt HCMV και έγινε διερεύνηση της έκφρασης της UL54 μέσω της διαδικασίας της qPCR. Μετά τη πραγματοποίηση της qPCR για όλα τα δείγματα, έγινε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, με σκοπό τη σύγκριση της σχετικής έκφρασης της UL54 ανάμεσα στις μολυσμένες και μη μολυσμένες συνθήκες. Η επιλογή της UL54 έγινε με βάση τη σημασία της για τον κύκλο ζωής του ιού. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη UL54 αποτελεί καταλυτική υπομονάδα της DNA πολυμεράσης του HCMV, υπεύθυνη για την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος στα μετέπειτα στάδια της ιικής μόλυνσης, και ως αποτέλεσμα ανήκει στην κατηγορία των καθυστερημένα πρώιμων πρωτεϊνών που ξεκινούν να μεταγράφονται το νωρίτερο μετά τις 12 ώρες, αφού έχει γίνει η μόλυνση [42].



Εικόνα 6. Η σχετική μεταγραφική έκφραση της ιικής πρωτεΐνης UL54 σε μη μολυσμένα και μολυσμένα κύτταρα U373MG, τα οποία είτε είχαν είτε δεν είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές ή miR-144 αναστολείς.

3.4. Η επίδραση του miR-144 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV

Για να ελέγξουμε αν το miR-144 επηρεάζει τον ρυθμό αύξησης, και επομένως τον πολλαπλασιασμό των μολυσμένων και μη κυττάρων γλοιοβλαστώματος U373MG, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων (κυτταροτοξικότητας) MTT σε κύτταρα τριών διαφορετικών συνθηκών (κύτταρα U373MG, κύτταρα U373MG που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές και κύτταρα U373MG που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς), υπό συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV. Όπως έχει αναφερθεί, η διαδικασία της διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε στο χρονικό σημείο 0 (σημείο 0h), ενώ στη περίπτωση των μολυσμένων κυττάρων εκτελέστηκαν συγχρόνως οι διαδικασίες της διαμόλυνσης με τους miR-144 μιμητές/αναστολείς και οι ιικές μολύνσεις με HCMV. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες MTT στα χρονικά σημεία των 0, 24, 48, 72 και 96 ωρών μετά το σημείο 0, τόσο για τα μολυσμένα όσο και για τα μη μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση ή αναστολή της έκφρασης του miR-144.



Εικόνα 7. Η επίδραση του miR-144 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων U373MG, σε συνθήκες μόλυνσης ή μη από τον HCMV, όπως προκύπτει από τη δοκιμασία μεταβολικής

δραστηριότητας των κυττάρων MTT. Παρουσιάζονται διαγραμματικά οι τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD) των κυττάρων, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων τη κάθε χρονική στιγμή (άξονας y - cell growth), ως προς το χρονικό σημείο στο οποίο έγινε η μέτρηση (άξονας x - h) για τις συνθήκες: **A**) των μη μολυσμένων κυττάρων τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές/αναστολείς, **B**) των μολυσμένων κυττάρων τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές/αναστολείς, **C**) των μολυσμένων και μη κυττάρων τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές/αναστολείς και **D**) των μη μολυσμένων κυττάρων τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές/αναστολείς, μαζί με τη συνθήκη επώασης με λιποφεκταμίνη.

Αρχικά, για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο το σύνολο των αποτελεσμάτων να οφειλόταν στην επίδραση του μέσου της διαμόλυνσης που χρησιμοποιήθηκε στα κύτταρα, δηλαδή της λιποφεκταμίνης, και όχι στη δράση των ίδιων των miR-144 μιμητών και αναστολέων, καθώς και το ενδεχόμενο η λιποφεκταμίνη να εμφάνιζε κυτταροτοξική δράση, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας MTT για όλα τα χρονικά σημεία μετά την προσθήκη μόνο λιποφεκταμίνης σε κύτταρα U373MG. Επιβεβαιώθηκε ότι κανένα από τα παραπάνω δεν ίσχυε, καθώς οι τιμές αύξησης των κυττάρων τα οποία είχαν δεχτεί επώαση μόνο με λιποφεκταμίνη (Lipofectamine) ήταν παρόμοιες με αυτές των κυττάρων αναφοράς, δηλαδή αυτών που δεν είχαν υποστεί μεταχειρίσεις (cells), καθώς και αυτών που είχαν δεχτεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς (miR-144 inhib) **(Εικόνα 7D)**.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η πιθανή επίδραση του miR-144 στο πολλαπλασιασμό μη μολυσμένων κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Παρατηρήθηκε πως η αύξηση των κυττάρων U373MG στα οποία είχε πραγματοποιηθεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές (miR-144) ήταν σημαντικά πιο χαμηλή ($p=0,0237$) σε όλα τα χρονικά σημεία σε σύγκριση με αυτή των κυττάρων U373MG στα οποία δεν είχε πραγματοποιηθεί καμία μεταχείριση (cells), καθώς και με αυτή των κυττάρων στα οποία είχε πραγματοποιηθεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς (miR-144 inhib) **(Εικόνα 7A)**. Ταυτόχρονα, ο ρυθμός ανάπτυξης τόσο των κυττάρων U373MG, όσο και των κυττάρων U373MG τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς, έμοιαζε να κινείται στα ίδια επίπεδα σε όλα τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν **(Εικόνα 7A)**. Ίδιο μοτίβο πολλαπλασιασμού φάνηκε να παρουσιάζουν και τα μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση του miR-144 σε σύγκριση με τις δύο άλλες συνθήκες. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα μολυσμένα με HCMV κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές (miR-144 + HCMV) παρουσίασαν σημαντικά πιο χαμηλό ρυθμό αύξησης ($p=0,0433$) σε σχέση με τα μολυσμένα κύτταρα τα οποία δεν είχαν υποστεί μεταχείριση (cells + HCMV) και τα μολυσμένα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς (miR-144 inhib + HCMV) **(Εικόνα 7B)**. Σημειώνεται εδώ πως και υπό συνθήκες μόλυνσης, οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού των κυττάρων U373MG και των κυττάρων U373MG διαμολυσμένων με miR-144 αναστολείς κυμαινόταν ξανά σε επίπεδα τιμών τέτοια, τα οποία μπορούσαν να θεωρηθούν στατιστικά πανομοιότυπα **(Εικόνα 7B)**. Ως προς τη σύγκριση των μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων μεταξύ τους, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα χρονικά σημεία οι τιμές απορροφήσεων, άρα και ο ρυθμός αύξησης, των μολυσμένων κυττάρων U373MG παρουσιάζονταν στα ίδια επίπεδα με αυτές των αντίστοιχων τους μη μολυσμένων για όλες τις συνθήκες, διαμόλυνσης και μη **(Εικόνα 7C)**. Είναι, επομένως, πιθανό η επίδραση του miR-144

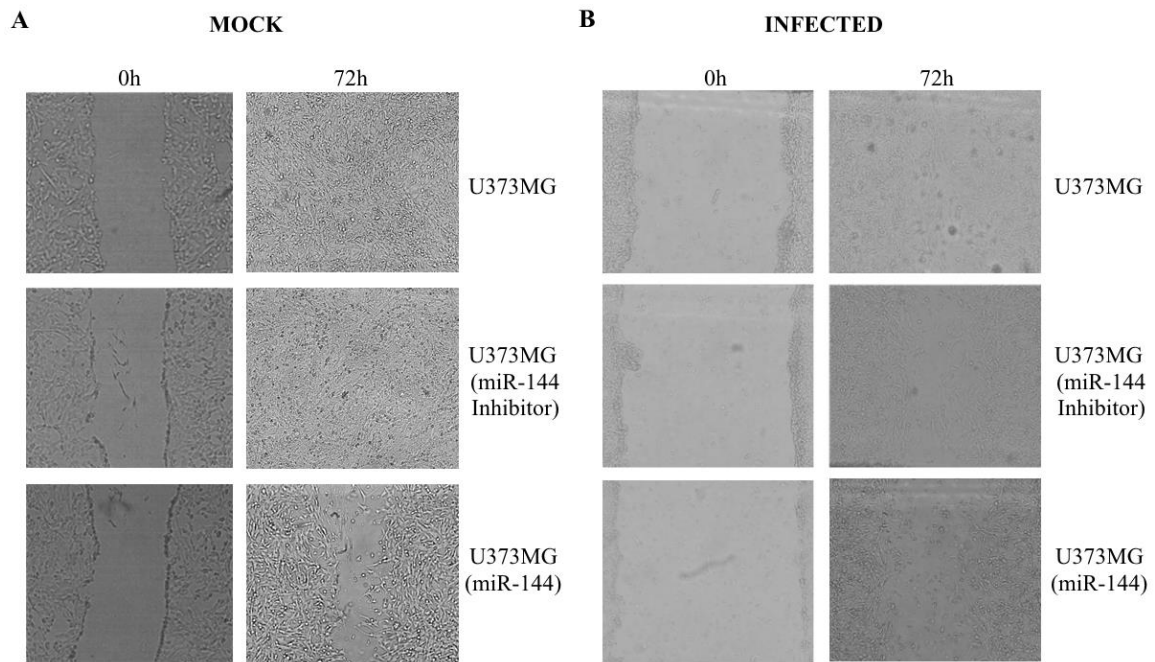
στη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων να επηρεάζει και τη μόλυνση με HCMV, με τον χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού λόγω υπερέκφρασης του miR-144 να μην ευνοεί την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από τον ιό.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι σημαντικό κομμάτι της καρκινογενετικής διαδικασίας, με τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους ή επιθετικούς τύπους καρκίνου, στους οποίους ανήκει και το γλοιοβλάστωμα, να εμφανίζουν ρυθμούς αύξησης και μεταβολισμού πολύ υψηλότερους από αυτούς των φυσιολογικών κυττάρων [43]. Το miR-144 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων, λειτουργώντας κατά κύριο λόγο ως αρνητικός ρυθμιστής, στοχεύοντας γονίδια τα οποία σχετίζονται στενά με την ενεργοποίηση ή τη διατήρηση των σημάτων του πολλαπλασιασμού [31, 44]. Δεν προκαλεί επομένως έκπληξη, το γεγονός ότι χαρακτηρίζεται ως ογκοκατασταλτικό μόριο στους περισσότερους τύπους όγκων, με την έκφραση του να εμφανίζει σημαντική υπορρύθμιση σε κακοήθεις ιστούς και καρκινικές σειρές κυττάρων [44]. Ωστόσο, πολλαπλές μελέτες υπερέκφρασης μέσω πειραμάτων διαμόλυνσης με miR-144 μιμητές έχουν υποδείξει πως η ανοδική ρύθμιση της έκφρασης του miR-144 είναι ικανή να περιορίσει σε σημαντικό βαθμό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό διαφόρων καρκινικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων και πολλών τύπων γλοιωμάτων [36, 37, 41, 45, 46]. Από την άλλη πλευρά, αν και οι αναφορές στην ακριβή δράση των miR-144 αναστολέων δεν είναι τόσο συχνές όσο των μιμητών στη βιβλιογραφία, η διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων με miR-144 αναστολείς φαίνεται να είναι σε θέση να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα ενδοκυτταρικής έκφρασης του miR-144, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [40]. Συνοψίζοντας επομένως, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ συμφωνούν με τις δεδομένες έως σήμερα ερευνητικές μελέτες και επιβεβαιώνουν πως το miR-144 παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, δρώντας συγκεκριμένα ως καταστολέας της διαδικασίας, καθώς η υπερέκφραση του φαίνεται να περιορίζει σε σημαντικό βαθμό τον ρυθμό κυτταρικής αύξησης, τόσο σε μη μολυσμένα, αλλά και μολυσμένα από τον HCMV, κύτταρα της καρκινικής σειράς U373MG. Αντιθέτως, η καθοδική ρύθμιση του miR-144, όπως συμβαίνει άλλωστε συχνά στο περιβάλλον ενός κακοήθους όγκου, αναιρεί την ογκοκατασταλτική του δράση, επιτρέποντας τελικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

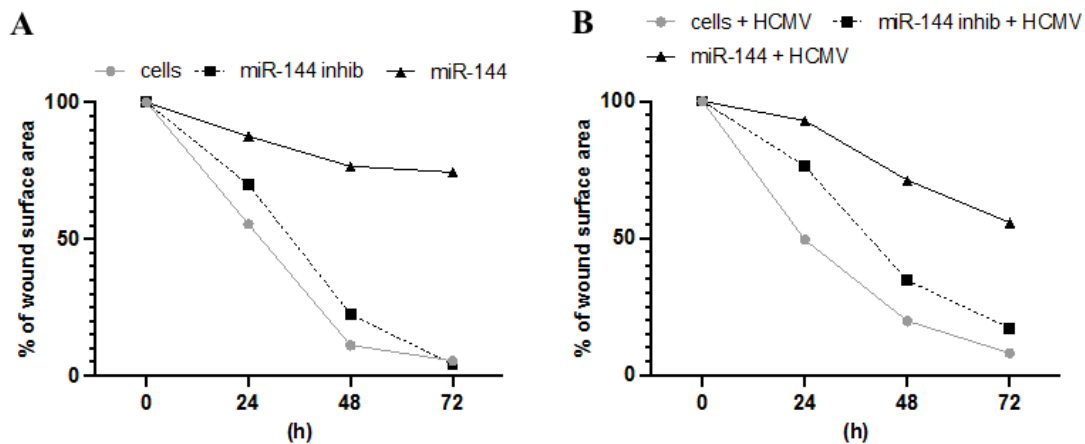
3.5. Η επίδραση του miR-144 στην κυτταρική μετανάστευση σε συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV

Για να ελέγξουμε αν το miR-144 επηρεάζει τον ρυθμό μετανάστευσης των μολυσμένων και μη κυττάρων γλοιοβλαστώματος U373MG, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay) σε κύτταρα τριών διαφορετικών συνθηκών (κύτταρα U373MG, κύτταρα U373MG στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση του miR-144 και κύτταρα U373MG στα οποία είχε γίνει αναστολή της έκφρασης του miR-144), σε συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV. Η διαδικασία της επούλωσης του τραύματος παρατηρήθηκε και καταγράφηκε σε συγκεκριμένα

χρονικά σημεία των 0, 24, 48 και 72 ωρών μετά την αρχική πραγματοποίηση του τραύματος. Στη συνέχεια, έγινε ποσοτικοποίηση του ποσοστού επούλωσης του τραύματος για όλες τις συνθήκες. Όσον αφορά στα μολυσμένα κύτταρα, έγινε μόλυνση με HCMV για χρονικό διάστημα 72 ωρών.



Εικόνα 8. Η επίδραση του miR-144 στη μετανάστευση των κυττάρων U373MG, σε συνθήκες μόλυνσης (72 ώρες μετά τη μόλυνση) ή μη από τον HCMV.



Εικόνα 9. Ποσοτικοποίηση της δοκιμασίας επούλωσης τραύματος σε κύτταρα της σειράς U373MG που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές ή αναστολείς, υπό συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV.

Αρχικά, εξετάστηκε η πιθανή επίδραση του miR-144 στη μετανάστευση μη μολυσμένων κυττάρων γλοιοβλαστώματος. Παρατηρήθηκε πως στα κύτταρα U373MG στα οποία έγινε διαμόλυνση με miR-144 μιμητές (miR-144), η επούλωση του τραύματος ήταν πιο αργή σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε καμία μεταχείριση (cells) και με τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς (miR-144 inhib) (**Εικόνα 9A**).

Ομοίως με τη περίπτωση του πολλαπλασιασμού που εξετάστηκε σε προηγούμενη ενότητα, τα ποσοστά επούλωσης των κυττάρων U373MG τα οποία δεν είχαν υποστεί μεταχειρίσεις, καθώς και αυτών τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς, εμφανίζονταν σχεδόν πανομοιότυπα (**Εικόνα 9A**). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι μέσα στο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε, δηλαδή εντός 72 ωρών μετά την πραγματοποίηση του τραύματος, τα κύτταρα U373MG τα οποία δεν είχαν υποστεί μεταχειρίσεις και τα κύτταρα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 αναστολείς είχαν μεταναστεύσει αρκετά γρήγορα ώστε να κλείσουν σχεδόν ολοκληρωτικά το τραύμα που τους είχε προκληθεί (**Εικόνα 8A, 9A**). Αντιθέτως, το ίδιο δε φαίνεται να συμβαίνει και στη περίπτωση των κυττάρων που είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές, αφού στο αντίστοιχο χρονικό σημείο των 72 ωρών μετά τη πραγματοποίηση του τραύματος, η μετανάστευση των κυττάρων είχε οδηγήσει μόλις στο 25% της συνολικής επούλωσης του ανοιχτού ακόμα τραύματος (**Εικόνα 8A, 9A**). Όσον αφορά στις συνθήκες ιικής μόλυνσης, το ίδιο μεταναστευτικό μοτίβο φαίνεται να ακολουθούν και εδώ τα κύτταρα όλων των συνθηκών. Τα μολυσμένα με HCMV κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση του miR-144 (miR-144 + HCMV) παρουσίασαν πιο χαμηλό ρυθμό μετανάστευσης σε σχέση με τα μολυσμένα κύτταρα τα οποία δεν υπέστησαν κάποια μεταχείριση (cells + HCMV) και τα μολυσμένα κύτταρα στα οποία έγινε αναστολή της έκφρασης του miR-144 (miR-144 inhib + HCMV) (**Εικόνα 9B**). Επιπλέον, για ακόμη μια φορά, τα κύτταρα δίχως μεταχειρίσεις και τα κύτταρα στα οποία έγινε αναστολή έκφρασης του miR-144 εμφάνισαν τα ίδια επίπεδα κυτταρικής μετανάστευσης και υπό συνθήκες μόλυνσης από τον HCMV (**Εικόνα 9B**), με το τραύμα να έχει επουλωθεί πλήρως στις 72 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας (**Εικόνα 8B, 9B**). Αντίθετα, το τραύμα δεν εμφανίστηκε να κλείνει ολοκληρωτικά μέχρι και τις 72 ώρες στα μολυσμένα κύτταρα στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση του miR-144 (**Εικόνα 8B, 9B**). Ωστόσο, παρότι τόσο στα μολυσμένα όσο και στα μη μολυσμένα κύτταρα στα οποία έγινε υπερέκφραση του miR-144 δεν παρατηρήθηκε πλήρης επούλωση τραύματος, το ποσοστό επούλωσης ήταν μεγαλύτερο στα μολυσμένα από ότι στα μη μολυσμένα κύτταρα, φτάνοντας κατά προσέγγιση το 45% στις 72 ώρες μετά την έναρξη της δοκιμασίας (**Εικόνα 9B**). Αξίζει να σημειωθεί εδώ πως παρόλο που οι διαφορές στα ποσοστά επούλωσης ανάμεσα σε μολυσμένα και μη κύτταρα που υπερέκφραζαν το miR-144 δε μπορούν να κριθούν ως στατιστικά σημαντικές, είναι πιθανό τα σχετικά υψηλότερα ποσοστά επούλωσης των μολυσμένων κυττάρων να οφείλονται στην επίδραση της ιικής μόλυνσης. Όπως έχει προαναφερθεί, ο HCMV έχει βρεθεί να προάγει τις καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων που μολύνει, με ιδιαίτερη έμφαση στο κομμάτι της μετανάστευσης [21, 28, 47, 48], και επομένως να δύναται να αναιρέσει σε κάποιο μικρό βαθμό την επίδραση της αρνητικής ρύθμισης του miR-144 στα μολυσμένα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί διαμόλυνση με miR-144 μιμητές, προωθώντας την μετανάστευση.

Η διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης παίζει κρίσιμο ρόλο στην πορεία της δημιουργίας και εξέλιξης του καρκίνου. Είναι γνωστό πως η μετανάστευση σε συνδυασμό με την διήθηση των καρκινικών κυττάρων αποτελούν κρίσιμα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας, η οποία μάλιστα χαρακτηρίζεται και ως ένα από τα «Σημεία Κατατεθέντα του Καρκίνου» (Hallmarks of Cancer) [22, 49, 50]. Το miR-144 έχει βρεθεί να εμπλέκεται συχνά στη ρύθμιση της μεταναστευτικής και μεταστατικής

ιδιότητας ενός εύρους τύπων καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και του γλοιοβλαστώματος, λειτουργώντας ως επί το πλείστον ανασταλτικά. Όπως και στη περίπτωση του πολλαπλασιασμού, πειράματα υπερέκφρασης των επιπέδων του miR-144 σε καρκινικές σειρές είχαν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της μεταναστευτικής, καθώς και της μεταστατικής, δυνατότητας των κυττάρων σε σημαντικό βαθμό, ενώ η καταστολή της έκφρασης του στα κύτταρα φάνηκε να επιφέρει ξανά την αντίθετη επίδραση, προωθώντας την μεταναστευτική ιδιότητα [40, 41, 51-55]. Συνοψίζοντας, οι παρατηρήσεις που έγιναν στη συγκεκριμένη εργασία βρίσκονται σε συμφωνία με τα γνωστά ως τώρα δεδομένα και υποδεικνύουν ότι το miR-144 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων γλοιοβλαστώματος της σειράς U373MG. Η υπερέκφραση του miR-144 φαίνεται να μειώνει σε σημαντικό βαθμό το ρυθμό μετανάστευσης, ενώ αντίθετα η αναστολή της έκφρασής του να επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα τη διατήρηση την μεταναστευτικής τους ικανότητας, τόσο υπό συνθήκες μόλυνσης, αλλά και μη, από τον HCMV.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μικρο-RNAs (miRNAs) αποτελούν μια κατηγορία μικρών, ενδογενών, μη κωδικών μορίων RNA, τα οποία ελέγχουν την έκφραση μεγάλου ποσοστού των γνωστών έως σήμερα γονιδίων σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο, ρυθμίζοντας έτσι πληθώρα κυτταρικών ιδιοτήτων. Η ανακάλυψη πως η απορρύθμιση πολλών miRNAs συνδέεται με τη νόσο του καρκίνου έχει ανοίξει τις τελευταίες δεκαετίες ένα μεγάλο πεδίο έρευνας που αφορά στις εφαρμογές χρήσης των miRNAs στη κλινική πράξη, είτε ως βιοδείκτες, είτε ως θεραπευτικά μόρια-στόχους για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Ένα εκ των πιο καλά μελετημένων έως και σήμερα miRNAs είναι το miR-144, το οποίο λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό μόριο στη πλειοψηφία των καρκινικών τύπων, συμπεριλαμβανομένου και του γλοιοβλαστώματος. Το γλοιοβλάστωμα αποτελεί σήμερα τον πιο κοινό κακοήγη όγκο του εγκεφάλου και παρουσιάζει ιδιαίτερα φτωχή πρόγνωση για τον ασθενή, με μέσο όρο επιβίωσης το ένα έτος. Εμφανίζοντας ιδιαίτερα χαμηλή ανταπόκριση στις σύγχρονες θεραπευτικές μεθόδους, εξακολουθεί να παραμένει ένας από τους πιο θανατηφόρους τύπους καρκίνου, λόγω της άκρως επιθετικής και διεισδυτικής του συμπεριφοράς. Ο ανθρώπινος κυτταρομεγαλοϊός (HCMV) φαίνεται επίσης να συνδέεται στενά με τη νόσο του καρκίνου, καθώς έχει εντοπιστεί μεταξύ άλλων σε ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστών όγκων γλοιοβλαστώματος και ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί πως η παρουσία του ιού και γονιδιακών του προϊόντων σε όγκους γλοιωμάτων σχετίζεται με την αυξημένη επιθετικότητα του όγκου, αλλά και την κακή πρόγνωση των ασθενών που νοσούν. Επομένως, έχοντας ως βάση ότι το miR-144, αλλά και ο ιός HCMV, έχουν βρεθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων, ως στόχος της παρούσας εργασίας τέθηκε η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης του miR-144 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετανάστευση, δύο χαρακτηριστικών σημείων της ογκογενετικής διαδικασίας, της σειράς γλοιοβλαστώματος U373MG, τόσο σε περιβάλλον μόλυνσης και μη από τον HCMV.

Αρχικά, όσον αφορά στην επίδραση του miR-144 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, οι πειραματικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως το miR-144 παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον ρυθμό αύξησης, και κατ' επέκταση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τόσο σε μολυσμένα αλλά και μη μολυσμένα κύτταρα U373MG. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός αύξησης βρέθηκε να είναι σημαντικά χαμηλότερος σε κύτταρα U373MG στα οποία έγινε υπερέκφραση των επιπέδων του miR-144 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 7A), ενώ αντιθέτως κύτταρα στα οποία έγινε αναστολή της έκφρασης του miR-144 εμφάνισαν ίδιο ρυθμό αύξησης με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 7A). Φαίνεται, επομένως, η παρουσία του miR-144 να ισοδυναμεί με μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού για τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, ενώ η απουσία του μοιάζει να αναιρεί την ανασταλτική αυτή δράση, επιτρέποντας τη διατήρηση της ιδιότητας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει και στις καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος U87MG, U251MG, T98G και LN18 [37, 40, 45, 56], όπου πειράματα υπερέκφρασης ή αναστολής των επιπέδων του miR-144 έχουν υποδείξει την ικανότητα του να μειώνει ή αναλόγως να αυξάνει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών

κυττάρων, καταστέλλοντας ή προάγοντας έτσι την εξέλιξη της ογκογενετικής διαδικασίας. Ως προς τη μόλυνση με HCMV, ίδια εικόνα διαφορών παρατηρήθηκε και στα μολυσμένα κύτταρα, με το ρυθμό αύξησης των μολυσμένων κυττάρων που υπερέκφραζαν το miR-144 να είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τους ρυθμούς των μολυσμένων κυττάρων αναφοράς και των μολυσμένων κυττάρων στα οποία είχε ανασταλεί η έκφραση του miR-144 (Εικόνα 7B). Επιπλέον, όπως και στις μη μολυσμένες συνθήκες, τα κύτταρα αναφοράς και τα κύτταρα στα οποία έγινε αναστολή της έκφρασης του miR-144 παρουσίασαν τα ίδια επίπεδα πολλαπλασιασμού (Εικόνα 6B). Τα αποτελέσματα μιας μελέτης που εξέτασε την δράση του miR-144 σε μολυσμένα κύτταρα από HCMV υπέδειξαν πως υπερέκφραση του miR-144 ήταν σε θέση να αναστείλει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού σε μολυσμένες με HCMV κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος [41]. Ταυτοχρόνως, έχει δειχθεί πως ο ίδιος ιός συνδέεται με τις καρκινικές ιδιότητες των κυττάρων γλοιοβλαστώματος, συγκεκριμένα προωθώντας τον κακοήγη φαινότυπο [57]. Είναι, λοιπόν, πιθανό η ανασταλτική επίδραση του miR-144 στο ρυθμό πολλαπλασιασμού να επηρεάζει σε κάποιο βαθμό και την αποτελεσματικότητα της μόλυνσης του HCMV, μην επιτρέποντας στον ιό να ασκήσει τις ογκορρυθμιστικές του ιδιότητες και να αυξήσει τα επίπεδα πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων στα οποία είχε γίνει υπερέκφραση του miR-144 (Εικόνα 7B). Λαμβάνοντας, επομένως, υπόψη τα παραπάνω, το miR-144 κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας ρύθμισης του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα της σειράς γλοιοβλαστώματος U373MG, δρώντας συγκεκριμένα ως ογκοκατασταλτικό μόριο και αναστέλλοντας την ιδιότητα του πολλαπλασιασμού, τόσο σε μολυσμένα, αλλά και μη μολυσμένα, από τον HCMV κύτταρα.

Όσον αφορά στο κομμάτι της μετανάστευσης, οι πειραματικές παρατηρήσεις υποδεικνύουν πως το miR-144 επηρεάζει και το μεταναστευτικό ρυθμό, τόσο σε μολυσμένα αλλά και μη μολυσμένα κύτταρα γλοιοβλαστώματος U373MG. Κατά τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος παρατηρήθηκε πως η επούλωση, άρα και η ταχύτητα μετανάστευσης, ήταν πιο αργή στα κύτταρα U373MG στα οποία έγινε υπερέκφραση του miR-144 σε σχέση με αυτή των κυττάρων αναφοράς και των κυττάρων στα οποία έγινε αναστολή της έκφρασης του miR-144, με τις δύο τελευταίες συνθήκες να κινούνται στα ίδια επίπεδα μετανάστευσης (Εικόνα 9A). Αντίστοιχο μοτίβο παρουσιάστηκε και υπό συνθήκες μόλυνσης των κυττάρων. Ο μεταναστευτικός ρυθμός των μολυσμένων με HCMV κυττάρων στα οποία έγινε υπερέκφραση με miR-144 ήταν μειωμένος σε σύγκριση με αυτόν των μολυσμένων κυττάρων αναφοράς και των μολυσμένων κυττάρων στα οποία έγινε αναστολή έκφρασης του miR-144, τις δύο συνθήκες που κυμαίνονταν ξανά σε πανομοιότυπες τιμές (Εικόνα 9B). Ενδιαφέρον σημείο εδώ αποτελεί η παρατήρηση πως ο μεταναστευτικός ρυθμός των μολυσμένων κυττάρων στα οποία έγινε υπερέκφραση με miR-144 ήταν σχετικά πιο υψηλός σε σχέση με των αντίστοιχων μη μολυσμένων κυττάρων (Εικόνα 9A, 9B). Ομοίως με τη περίπτωση του πολλαπλασιασμού, τόσο το miR-144, όσο και ο ιός HCMV, έχουν βρεθεί να παίζουν κρίσιμο ρόλο στο κομμάτι της κυτταρικής μετανάστευσης, δρώντας ωστόσο διαμετρικά αντίθετα, με το miR-144 να λειτουργεί ως ογκοκατασταλός περιορίζοντας τον μεταναστευτικό ρυθμό των καρκινικών κυττάρων και τον HCMV να ενισχύει τις κακοήθεις ιδιότητες μέσω των ογκορρυθμιστικών ιδιοτήτων του. Κρίνεται, λοιπόν, ως πιθανό, η αρνητική ρύθμιση

που ασκεί το miR-144 στη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων, να επιδρά ανασταλτικά και για την ιική μόλυνση, εξισορροπώντας και αναιρώντας σε κάποιο βαθμό το μεταναστευτικό πλεονέκτημα που προσδίδει ο ιός στα κύτταρα. Επομένως, σε συμφωνία με τα γνωστά έως σήμερα δεδομένα, προτείνεται πως το miR-144 παίζει σημαντικό ρόλο στη κυτταρική μετανάστευση της σειράς γλοιοβλαστώματος U373MG, με την υπερέκφραση του να καταστέλλει επιτυχώς μια από τις πιο κρίσιμες ιδιότητες στην πρόοδο του καρκίνου, τόσο υπό συνθήκες μόλυνσης και μη από τον HCMV.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν πως το miR-144 παίζει ιδιαίτερα κρίσιμο ρόλο στην αναστολή δύο βασικών καρκινικών ιδιοτήτων, τόσο σε μολυσμένα αλλά και σε μη μολυσμένα από τον HCMV κύτταρα γλοιοβλαστώματος, ενώ ταυτόχρονα ενδέχεται η παρουσία του να περιορίζει και την ογκορυθμιστική δράση του ιού. Γνωρίζοντας τη σημασία τόσο του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης, αλλά και της ιικής μόλυνσης, στην πορεία εξέλιξης της καρκινογένεσης, το miR-144 κρίνεται ως μόριο με ιδιαίτερες προοπτικές έρευνας, καθώς θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικά στόχο θεραπείας για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Urbańska, K., et al., *Glioblastoma multiforme - an overview*. Contemp Oncol (Pozn), 2014. **18**(5): p. 307-12.
2. Wirsching, H.G., E. Galanis, and M. Weller, *Glioblastoma*. Handb Clin Neurol, 2016. **134**: p. 381-97.
3. Pająk, B. *Looking for the Holy Grail—Drug Candidates for Glioblastoma Multiforme Chemotherapy*. Biomedicines, 2022. **10**, DOI: 10.3390/biomedicines10051001.
4. Foster, H., I.V. Ulasov, and C.S. Cobbs, *Human cytomegalovirus-mediated immunomodulation: Effects on glioblastoma progression*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017. **1868**(1): p. 273-276.
5. Smith, T.T. and R.J. Whitley, *166 - Herpesviruses*, in *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, J. Cohen, W.G. Powderly, and S.M. Opal, Editors. 2017, Elsevier. p. 1426-1438.e1.
6. Davison, A.J., *Herpesviruses: General Features ☆*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014, Elsevier.
7. Whitley, R.J., *Herpesviruses*, in *Medical Microbiology*, S. Baron, Editor. 1996, University of Texas Medical Branch at Galveston

Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.: Galveston (TX).

8. Schottstedt, V., et al., *Human Cytomegalovirus (HCMV) - Revised*. Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie, 2010. **37**(6): p. 365-375.
9. Landolfo, S., et al., *The human cytomegalovirus*. Pharmacology & Therapeutics, 2003. **98**(3): p. 269-297.
10. Jean Beltran, P.M. and I.M. Cristea, *The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics*. Expert review of proteomics, 2014. **11**(6): p. 697-711.
11. Griffiths, P., I. Baraniak, and M. Reeves, *The pathogenesis of human cytomegalovirus*. J Pathol, 2015. **235**(2): p. 288-97.
12. Townsend, C.L., et al., *Long-term outcomes of congenital cytomegalovirus infection in Sweden and the United Kingdom*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2013. **56**(9): p. 1232-1239.
13. Dollard, S.C., S.D. Grosse, and D.S. Ross, *New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection*. Rev Med Virol, 2007. **17**(5): p. 355-63.
14. Britt, W.J. and M.N. Prichard, *New therapies for human cytomegalovirus infections*. Antiviral Res, 2018. **159**: p. 153-174.
15. Perera, M.R., M.R. Wills, and J.H. Sinclair, *HCMV Antivirals and Strategies to Target the Latent Reservoir*. Viruses, 2021. **13**(5).
16. Krishna, B.A., M.R. Wills, and J.H. Sinclair, *Advances in the treatment of cytomegalovirus*. British Medical Bulletin, 2019. **131**(1): p. 5-17.
17. Ma, Y., et al., *Human CMV transcripts: an overview*. Future Microbiol, 2012. **7**(5): p. 577-93.
18. Crough, T. and R. Khanna, *Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(1): p. 76-98.
19. Elder, E. and J. Sinclair, *HCMV latency: what regulates the regulators?* Medical microbiology and immunology, 2019. **208**(3-4): p. 431-438.

20. Cobbs, C., *Cytomegalovirus is a tumor-associated virus: armed and dangerous*. *Curr Opin Virol*, 2019. **39**: p. 49-59.
21. Naucler, C.S., J. Geisler, and K. Vetvik, *The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: a review of current evidence and potential therapeutic implications*. *Oncotarget*, 2019. **10**(42): p. 4333-4347.
22. Herbein, G., *The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis*. *Viruses*, 2018. **10**(8).
23. Korbecki, J., et al., *New extracellular factors in glioblastoma multiforme development: Neurotensin, growth differentiation factor-15, sphingosine-1-phosphate and cytomegalovirus infection*. *Oncotarget*, 2018. **9**: p. 7219-7270.
24. Dos Santos, C.J., et al., *Impact of human cytomegalovirus on glioblastoma cell viability and chemotherapy treatment*. *J Gen Virol*, 2018. **99**(9): p. 1274-1285.
25. Dziurzynski, K., et al., *Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma*. *Neuro-Oncology*, 2012. **14**(3): p. 246-255.
26. van Senten, J.R., et al., *The human cytomegalovirus-encoded G protein-coupled receptor UL33 exhibits oncomodulatory properties*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019.
27. Fornara, O., et al., *Cytomegalovirus infection induces a stem cell phenotype in human primary glioblastoma cells: prognostic significance and biological impact*. *Cell Death & Differentiation*, 2016. **23**(2): p. 261-269.
28. Zhu, X., et al., *Human cytomegalovirus infection enhances invasiveness and migration of glioblastoma cells by epithelial-to-mesenchymal transition*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020. **13**(10): p. 2637-2647.
29. Cobbs, C., *Cytomegalovirus is a tumor-associated virus: armed and dangerous*. *Current Opinion in Virology*, 2019. **39**: p. 49-59.
30. Yang, T., et al. *Cytomegalovirus and Glioblastoma: A Review of the Biological Associations and Therapeutic Strategies*. *Journal of Clinical Medicine*, 2022. **11**, DOI: 10.3390/jcm11175221.
31. Kooshkaki, O., et al., *MiR-144: A New Possible Therapeutic Target and Diagnostic/Prognostic Tool in Cancers*. 2020. **21**(7).
32. Smolarz, B., et al., *miRNAs in Cancer (Review of Literature)*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(5).
33. Garzon, R., et al., *MicroRNA expression and function in cancer*. *Trends Mol Med*, 2006. **12**(12): p. 580-7.
34. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2016. **1**(1): p. 15004.
35. Jia, C.-Y., et al., *Prognostic potential of miR-144 in various cancers: A meta-analysis*. *Medicine*, 2022. **101**(46).
36. Lan, F., et al., *miR-144-3p exerts anti-tumor effects in glioblastoma by targeting c-Met*. *J Neurochem*, 2015. **135**(2): p. 274-86.
37. Cheng, Z.X., et al., *miR-144-3p serves as a tumor suppressor by targeting FZD7 and predicts the prognosis of human glioblastoma*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017. **21**(18): p. 4079-4086.
38. Ma, Q., X. Wang, and J. Li, *LncRNA RP1-86C11.7 exacerbates the glioma progression and oncogenicity by hsa-miR-144-3p/TFRC signaling*. *Transl Oncol*, 2021. **14**(12): p. 101215.
39. Cardoso, A.M.S., et al., *MiR-144 overexpression as a promising therapeutic strategy to overcome glioblastoma cell invasiveness and resistance to chemotherapy*. *Hum Mol Genet*, 2019. **28**(16): p. 2738-2751.

40. Liu, Z.Q., et al., *MicroRNA-144 represses gliomas progression and elevates susceptibility to Temozolomide by targeting CAV2 and FGF7*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 4155.
41. Song, J., et al., *The Inhibition of miR-144-3p on Cell Proliferation and Metastasis by Targeting TOP2A in HCMV-Positive Glioblastoma Cells*. *Molecules*, 2018. **23**(12).
42. White, E.A. and D.H. Spector, *Early CMV gene expression and function*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007, Cambridge University Press: Cambridge. p. 264-294.
43. Feitelson, M.A., et al., *Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**(Suppl): p. S25-s54.
44. Zhou, M., et al., *MicroRNA-144: A novel biological marker and potential therapeutic target in human solid cancers*. *J Cancer*, 2020. **11**(22): p. 6716-6726.
45. Lin, L., et al., *MicroRNA-144 suppresses tumorigenesis and tumor progression of astrocytoma by targeting EZH2*. *Hum Pathol*, 2015. **46**(7): p. 971-80.
46. Shao, Y., et al., *LncRNA-zinc finger protein 281 downregulates rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 by upregulating miR-144 in osteosarcoma*. *Oncol Lett*, 2020. **20**(4): p. 79.
47. Michaelis, M., H.W. Doerr, and J. Cinatl, *The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions*. *Neoplasia*, 2009. **11**(1): p. 1-9.
48. Teo, W.H., et al., *Human cytomegalovirus infection enhances cell proliferation, migration and upregulation of EMT markers in colorectal cancer-derived stem cell-like cells*. *Int J Oncol*, 2017. **51**(5): p. 1415-1426.
49. Tahtamouni, L., et al., *Molecular Regulation of Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis*. *Analytical Cellular Pathology*, 2019. **2019**: p. 1356508.
50. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020. **5**(1): p. 28.
51. Fang, G., et al., *MiR-144-3p inhibits the proliferation and metastasis of lung cancer A549 cells via targeting HGF*. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2022. **17**(1): p. 117.
52. Cheng, B., et al., *MiR-144 inhibits colorectal cancer cell migration and invasion by regulating PBX3*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020. **24**(18): p. 9361-9369.
53. Pu, R., et al., *MicroRNA 144 inhibits cell migration and invasion and regulates inflammatory cytokine secretion through targeting toll like receptor 2 in non-small cell lung cancer*. *Arch Med Sci*, 2021. **17**(4): p. 1028-1037.
54. Yin, Y., et al., *MiR-144 suppresses proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells through inhibiting CEP55*. *Cancer Biology & Therapy*, 2018. **19**(4): p. 306-315.
55. Wu, J., et al., *MiR-144-3p: a novel tumor suppressor targeting MAPK6 in cervical cancer*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2019. **75**(2): p. 143-152.
56. Zhou, J. and R. Liu, *Upregulation of miR-144-3p expression attenuates glioma cell viability and invasion by targeting BCL6*. *Exp Ther Med*, 2021. **22**(4): p. 1157.
57. Cobbs, C.S., *Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis*. *Herpesviridae*, 2011. **2**(1): p. 10.