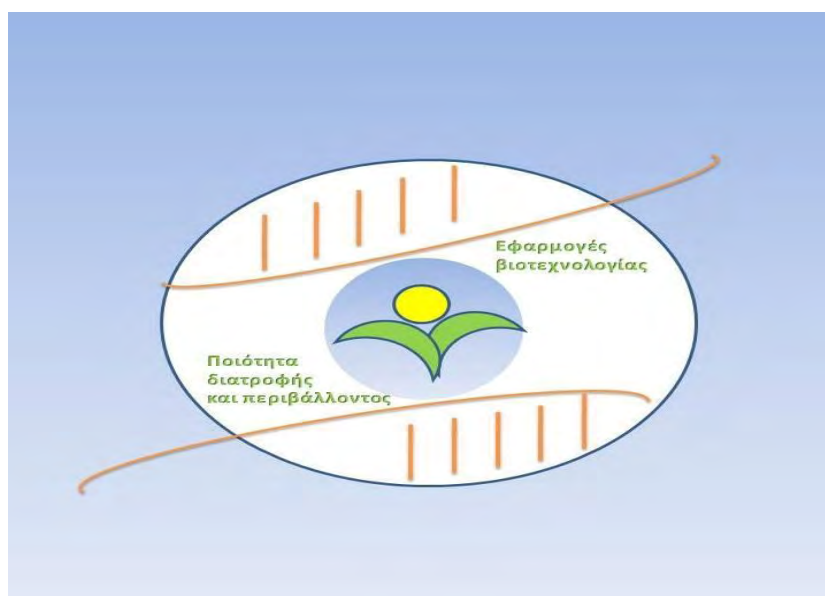




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Αξιολόγηση φυτικών ουσιών ως εν δυνάμει αντικαρκινικά
φάρμακα**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΛΑΡΙΣΑ 2018

**Αξιολόγηση φυτικών ουσιών ως εν δυνάμει αντικαρκινικά
φάρμακα**

**Evaluation of herbal substances as potential anti-cancer
drugs**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία (επιβλέπουσα): Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στερεοειδείς ορμόνες, απαραίτητες για την ανθρώπινη ζωή και ρυθμίζουν μια σειρά από σημαντικές διεργασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό. Χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες σε μια ποικιλία ασθενειών, όπως φλεγμονώδεις νόσοι, αλλεργικές διαταραχές και νοσήματα όπως ο καρκίνος. Παρόλα αυτά, η διαδεδομένη και χρόνια χρήση τους παρεμποδίζεται από ένα σύνολο παρενεργειών που μπορούν να επιφέρουν. Για το λόγο αυτό, προέκυψε η ανάγκη για ανακάλυψη επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAS), οι οποίοι θα είναι εξίσου αποτελεσματικοί όσο και τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή, αλλά με μειωμένες παρενέργειες. Οι τριτερπενοειδείς ενώσεις, που είναι φυτοχημικές ουσίες και βρίσκονται σε αφθονία στη φύση, μοιάζουν δομικά με τα γλυκοκορτικοειδή. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το ερέθισμα για περαιτέρω μελέτη και αξιολόγησή τους ως προς την εμπλοκή τους στην ρύθμιση της δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, διερευνήσαμε το κατά πόσο ορισμένες τριτερπενοειδείς ενώσεις μπορούν να δράσουν ως SEGRAS. Μελετήσαμε τις ουσίες PCUPO 4 και PCUPO 12 ως προς την αποπτωτική δράση τους σε κύτταρα HeLa. Επίσης, ελέγχθηκε η ικανότητα των ουσιών TFC 0020, TFC 0021, TFC 0022, να προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν πιθανή αποπτωτική δράση, αλλά απαιτείται περισσότερη διερεύνηση για τον χαρακτηρισμό των μηχανισμών επιτέλεσης αυτής της δράσης.

Abstract

Glucocorticoids are steroid hormones necessary for human life. They regulate a series of biochemical processes important for human life. They have been used for many decades in a variety of diseases, such as inflammatory diseases, allergic disorders and diseases such as cancer. However, their widespread and chronic use is hampered by a set of side effects that they can bring about. Therefore, there has been a need for the discovery of selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAS), which will be as effective as classical glucocorticoids but with reduced side effects. Triterpenoid compounds, which are phytochemicals and are abundant in nature, resemble structurally with glucocorticoids. This was the stimulus for further study and assessment of their involvement in glucocorticoid receptor signaling.

In this diploma thesis, we investigated whether some triterpenoid compounds can act as SEGRAS. We studied PCUPO 4 and PCUPO 12 for their apoptotic effect on HeLa cells. Also, the ability of TFC 0020, TFC 0021, TFC 0022, was tested to cause nuclear translocation of GR. Our results indicate that some molecules have the potential to induce apoptosis, but extra experiments are required to delineate the molecular mechanisms of this action

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης καθηγήτριας κ. Ψαρρά Άννας-Μαρίας. Θα ήθελα λοιπόν να της εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθειά της, το ενδιαφέρον αλλά και το χρόνο που διέθεσε για τη διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Καρρά για την καθοριστική βοήθεια και για τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους, αλλά και για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου παρείχε κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Ευχαριστίες οφείλω και σε όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου, που δημιούργησαν ένα φιλικό κλίμα συνεργασίας και ήταν πρόθυμοι να επιλύσουν οποιαδήποτε απορία μου καθώς και στον Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη που μας παρείχε τις σημαντικές τριτερπενοειδείς ουσίες από το εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

A. Πυρηνικοί υποδοχείς

A.1. Γενικά

A.2. Δομή Πυρηνικών υποδοχέων

B. Γλυκοκορτικοειδή

B.1. Δομή

B.2. Έκκριση- Παραγωγή γλυκοκορτικοειδών

B.3. Βιοχημική δράση γλυκοκορτικοειδών

B.3.1. Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

B.3.1.1. Δομή

B.3.1.2. Διάφορες ισομορφές

B.3.1.3. Μηχανισμοί δράσης

B.3.1.3.α. Γενωμικός μηχανισμός δράσης

B.3.1.3.β. Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης

B.4. Απόπτωση-Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια

Γ. Φαρμακευτική εφαρμογή- SEGRAS

Δ. Τριτερπενοειδείς ενώσεις

Δ.1. Γενικά

Δ.2. Cucurbitacins

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa

2.2. Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

2.2.1. Απόψυξη κυττάρων

2.2.2. Θρυψινοποίηση κυττάρων

2.2.3. Πάγωμα κυττάρων

2.2.4. Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

2.3. Western Blot

2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

2.3.2. Συλλογή κυττάρων

2.3.3. Λύση κυττάρων

2.3.4. Ομογενοποίηση κυττάρων

2.3.5. Ποσοτικοποίηση κυτταρικών εκχυλισμάτων

2.4. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS(SDS PAGE)

2.4.1. Ανοσοαποτύπωση Western

2.5 Ανοσοϊστοχημεία

3. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

3.1. Οι ουσίες Cucurbitacin A, Cucurbitacin D, Cucurbitacin E

3.2. Οι ουσίες PCUPO 4, PCUPO 12

4. Συζήτηση

Βιβλιογραφία

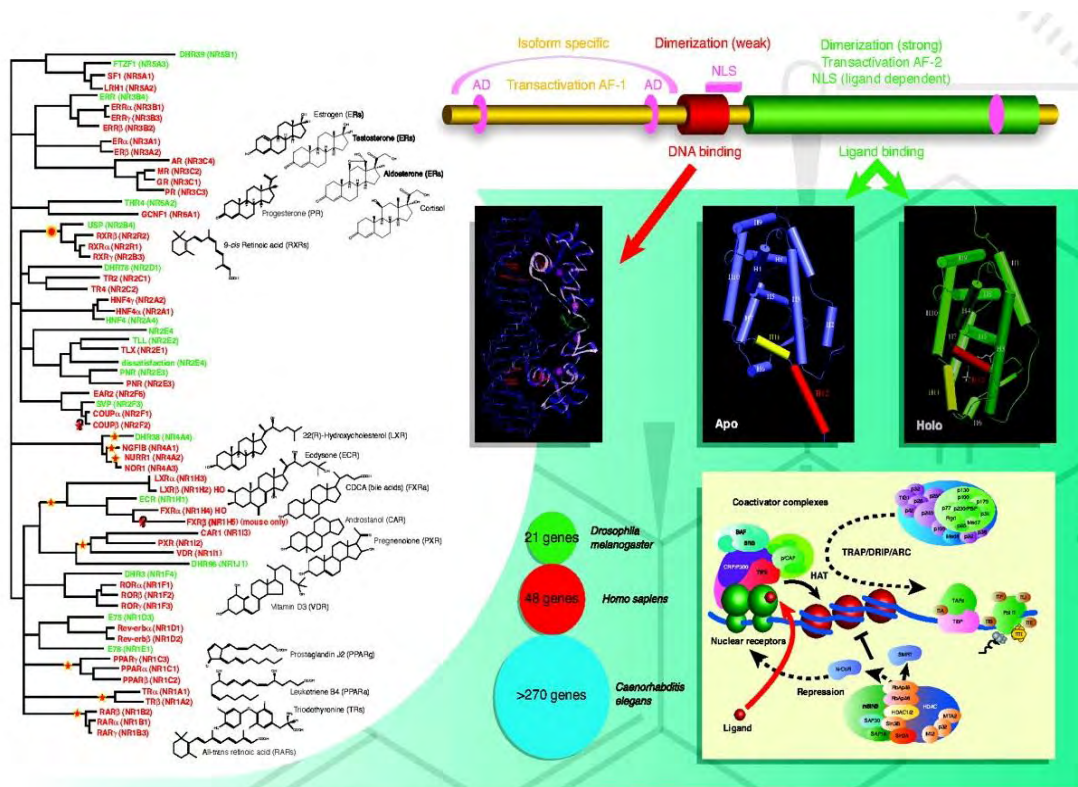
1. Εισαγωγή

A. Πυρηνικοί υποδοχείς

A.1. Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ανίχνευση στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών καθώς και κάποιων άλλων μορίων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μια από τις πιο άφθονες κατηγορίες μεταγραφικών ρυθμιστών στα ζώα. Ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες, όπως την ομοιόσταση, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό. Οι πυρηνικοί υποδοχείς λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες εφόσον ενεργοποιηθούν από τον προσδέτη τους και έτσι παρέχουν μια άμεση σύνδεση μεταξύ των μορίων σηματοδότησης, που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες και τις μεταγραφικές αποκρίσεις. Έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών υποδοχέων μέσω της ομοιότητας αλληλουχίας με γνωστούς υποδοχείς, αλλά υπάρχουν και πυρηνικοί υποδοχείς με μη φυσικούς προσδέτες που αναφέρονται ως «Πυρηνικοί ορφανοί υποδοχείς». Οι πυρηνικοί υποδοχείς υπόσχονται φαρμακολογικούς στόχους, καθώς συνδέουν μικρά μόρια που μπορούν να τροποποιούνται εύκολα με σχεδιασμό φαρμάκων και να ελέγχουν λειτουργίες που σχετίζονται με κύριες ασθένειες (π.χ. καρκίνο, οστεοπόρωση και διαβήτη). (Robinson- Rechavi et al., 2003)

Οι πυρηνικοί υποδοχείς σχηματίζουν μια υπεροικογένεια από φυλογενετικά σχετιζόμενες πρωτεΐνες, με 21 γονίδια στο πλήρες γονιδίωμα της μύγας *Drosophila melanogaster*, 48 σε ανθρώπους και απροσδόκητα, περισσότερα από 270 γονίδια στο νηματοειδές σκουλήκι *Caenorhabditis elegans*. Η υπεροικογένεια περιλαμβάνει υποδοχείς για υδρόφοβα μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες (π.χ. οιστρογόνα, γλυκοκορτικοειδή, προγεστερόνη, μεταλλοκορτικοειδή, ανδρογόνα, βιταμίνη D3, χολικά οξέα), ρετινοϊκά οξέα, θυρεοειδικές ορμόνες, λιπαρά οξέα, λευκοτριένια και προσταγλανδίνες. (Robinson- Rechavi et al., 2003)

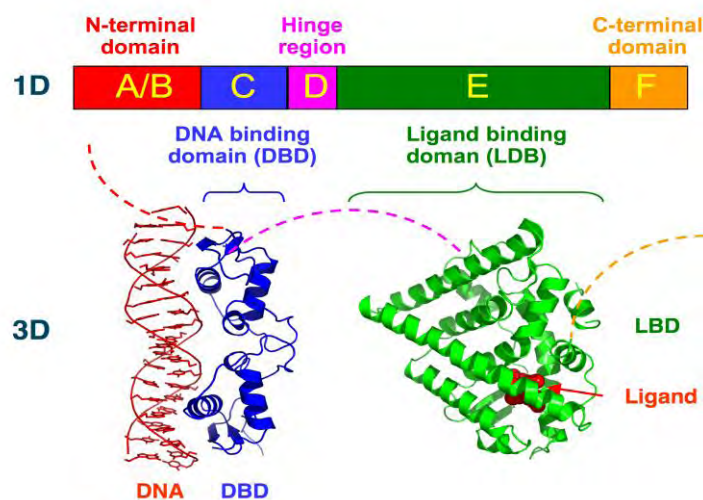


Εικόνα 1. Η υπερικογένεια πυρηνικών υποδοχέων (Robinson- Rechavi et al., 2003)

4.2. Δομή Πυρηνικών Υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μοιράζονται μια κοινή δομική οργάνωση. Το N-τελικό άκρο (περιοχή A/B) είναι αρκετά ποικίλο και περιέχει μια περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF-1). Η περιοχή A/B ποικίλει σε μήκος, από λιγότερο από 50 έως περισσότερα από 500 αμινοξέα και η 3D δομή της δεν είναι γνωστή. Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι η περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD, DNA Binding Domain, περιοχή C), η οποία, συγκεκριμένα, περιέχει το P-box, ένα σύντομο μοτίβο υπεύθυνο για την εξειδικευμένη δέσμευση στο DNA που περιέχει το μοτίβο AGGTCA και εμπλέκεται στο διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων. Η 3D δομή της περιοχής σύνδεσης στο DNA περιέχει δύο εξαιρετικά διατηρημένους δακτυλίους ψευδαργύρου C-X2-C-X13-C-X2-C και CX5-C-X9-C-X2-C. Η δομή που αναλύθηκε παραπάνω, αναφέρεται στην περιοχή σύνδεσης στο DNA του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) (Hard et al., 1990). Μεταξύ της περιοχής σύνδεσης στο DNA και της δέσμευσης με τον προσδέτη υπάρχει μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή (περιοχή D). Αυτή

συμπεριφέρεται ως μια εύκαμπτη άρθρωση μεταξύ της C και της E περιοχής και περιέχει το πυρηνικό σήμα εντοπισμού (NLS, Nuclear Localization Singal), το οποίο μπορεί να έχει επικάλυψη με την περιοχή C. Η μεγαλύτερη περιοχή είναι η περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD, ligand binding domain, E περιοχή), η οποία είναι λιγότερο συντηρημένη και της οποίας η δευτεροταγής δομή αποτελούμενη από 12 α-έλικες είναι καλύτερα συντηρημένη από την πρωτοταγή ακολουθία. (Robinson- Rechavi et al., 2003, Moras and Gronemeyer, 1998)

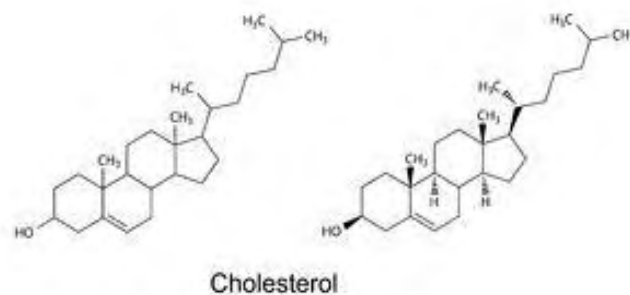


Εικόνα 2. Δομική οργάνωση των πυρηνικών υποδοχέων

B. Γλυκοκορτικοειδή

B.1. Δομή

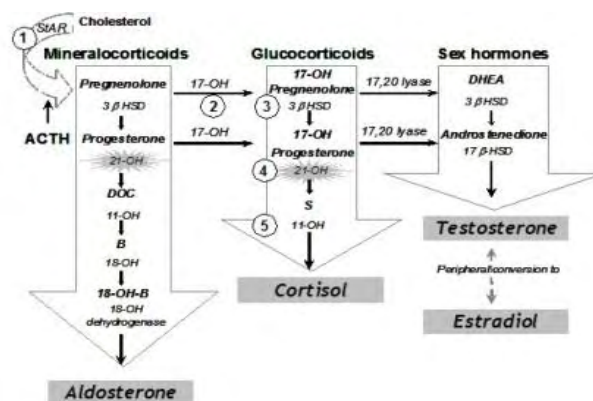
Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλες ορμόνες οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, την αύξηση, την ανάπτυξη και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, έχουν παρόμοια δομή και οι διαφορές τους έγκεινται στη δομή του δακτυλίου και στις πλευρικές αλυσίδες που συνδέονται σε αυτόν. (Psarra and Sekeris, 2007)



Εικόνα 3 . Η δομή της χοληστερόλης

Οι στεροειδείς ορμόνες διακρίνονται σε τρεις τύπους:

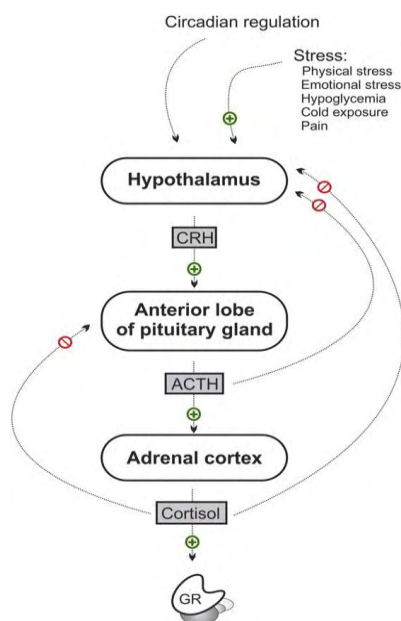
- Τα Γλυκοκορτικοειδή: Επηρεάζουν την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα, καθώς και άλλων μορίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό. Κυριότερος εκπρόσωπος είναι η *κορτιζόλη*.
- Τα Αλατοκορτικοειδή: Επηρεάζουν την εξωκυτάρια ιοντική ισορροπία. Κυριότερος εκπρόσωπος είναι η *αλδοστερόνη*.
- Τα Σεξοτρόπα στεροειδή: Διεγείρουν την ανάπτυξη των γεννητικών οργάνων (sexual development) και την ικανότητα αναπαραγωγής. Εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες από τον φλοιό των επινεφριδίων. Κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι τα *ανδρογόνα* και τα *οιστρογόνα* (Ortsäter H, 2012).



Εικόνα 4. Βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών. Η κάθε ομάδα (οδός), ξεκινά την σύνθεσή της από τη χοληστερόλη και αλυσιδωτά παράγει διαφορετικές στεροειδείς ορμόνες, μέχρι τη στιγμή που η κάθε οδός θα καταλήξει σε μία από τις τελικές ορμόνες: αλδοστερόνη - κορτιζόλη - τεστοστερόνη. Οι ορμόνες της οδού (ομάδας) της αλδοστερόνης ονομάζονται **αλατοκορτικοειδή** (λόγω του αποτελέσματος-εκτός των άλλων-της κατακράτησης άλατος στον οργανισμό, mineralocorticoids), οι ορμόνες της ομάδας της κορτιζόλης, **γλυκοκορτικοειδή** (λόγω του αποτελέσματος -εκτός των άλλων- της αύξησης του σακχάρου στον οργανισμό, glucocorticoides), και οι ορμόνες της ομάδας της τεστοστερόνης, **ανδρογόνα** (androgens).

B.2. Έκκριση-Παραγωγή γλυκοκορτικοειδών

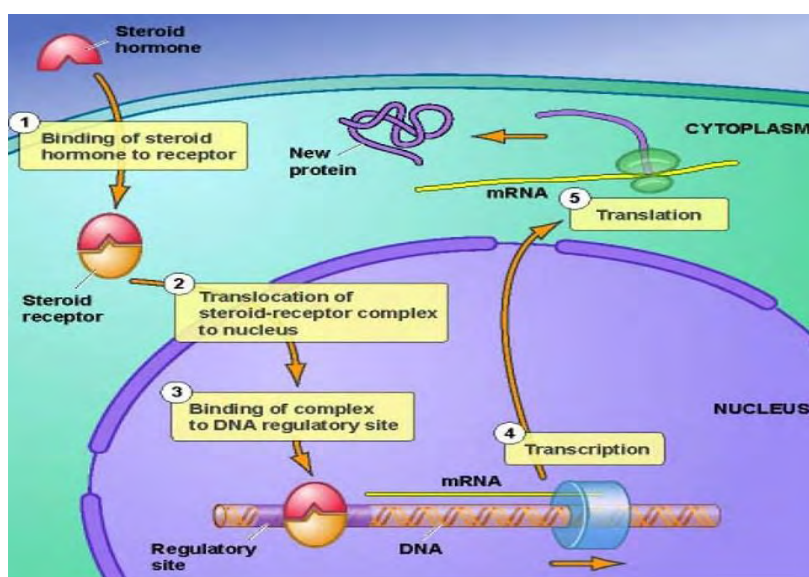
Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) παράγονται στο φλοιό επινεφριδίων με κιρκάδιο ρυθμό. Η παραγωγή αυτών των ορμονών ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Νευρικά, ενδοκρινικά και κυτοκινικά σήματα συγκλίνουν στον περιφερειακό υποθαλαμικό πυρήνα. Αυτά τα σήματα καθορίζουν την έκκριση της ορμόνης κορτικοτροπίνης (CRH) από τον υποθάλαμο προς στο σύστημα εισόδου της υπόφυσης. Διαδοχικά, η CRH επάγει την έκκριση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση, η οποία με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση της γλυκοκορτικοειδούς κορτιζόλης (που ονομάζεται επίσης και υδροκορτιζόνη) από την ζώνη συσσώρευσης του επινεφριδιακού φλοιού. Οι μηχανισμοί ανάδρασης εξασφαλίζουν αυστηρό έλεγχο της παραγωγής και απελευθέρωσης της κορτιζόλης (Εικ. 5). Περίπου το 10% της εκκρινόμενης κορτιζόλης είναι ελεύθερο και ως εκ τούτου ενεργό. Το άλλο 90% δεσμεύεται συστηματικά σε σφαιρίνες. Τα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR, Glucocorticoid Receptor), ένα μεταγραφικό παράγοντα που ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. (Sundahl et al., 2015)



Εικόνα 5. Υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφριδιακός άξονας. Η παραγωγή της κορτιζόλης, του ενδογενούς γλυκοκορτικοειδούς, έχει κιρκάδιο ρυθμό και η ρύθμιση και ξεκινά στο επίπεδο του υποθάλαμου. Εδώ, νευρικά ενδοκρινικά και κυτοκινικά σήματα συγκλίνουν και υποκινούν την έκκριση της CRH στο σύστημα πύλης της υπόφυσης. Διαδοχικά, η CRH προκαλεί έκκριση της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, που με τη σειρά της διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων. Αρνητικοί μηχανισμοί ανάδρασης προστατεύουν την ομοιόσταση του συστήματος.
+ θετική ρύθμιση
- αρνητική ρύθμιση. (Sundahl et al., 2015)

B.3. Βιοχημική δράση γλυκοκορτικοειδών

Όπως προαναφέρθηκε, η δράση των στεροειδών ορμονών γίνεται μέσω της σύνδεσής τους με πυρηνικούς υποδοχείς. Πιο συγκεκριμένα, εισέρχονται στο κύτταρο, συνδέονται με τον υποδοχέα τους, το σύμπλεγμα στεροειδούς ορμόνης–υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα, συνδέεται στο DNA και ρυθμίζει τη γονιαδιακή έκφραση. Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητες στεροειδείς ορμόνες για την ανθρώπινη ζωή και ρυθμίζουν μια σειρά σημαντικών διεργασιών δεσμεύοντας τους συγγενείς υποδοχείς τους, τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid receptors, GRs) (Georgatza & Gorgogietas et al., 2016).



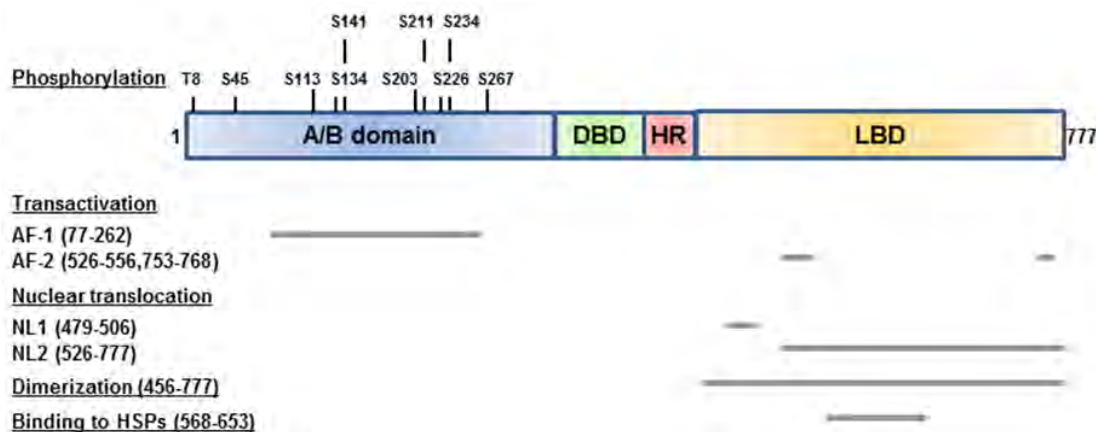
Εικόνα 6. Μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών.

B.3.1. Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR, Glucocorticoid Receptor)

B.3.1.1 Δομή του GR

Ο ανθρώπινος GR είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από διαφορετικές περιοχές (Εικ. 7). Στο N-τελικό τμήμα του υποδοχέα, βρίσκεται η περιοχή A/B που παρέχει τη λειτουργία trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής-1 (AF-1, Activation Function-1). Σε πολλές περιπτώσεις δρα συνεργιστικά με την συνδετοεξαρτώμενη AF-2, που βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD) του υποδοχέα. Επιπλέον, αυτή η περιοχή, φιλοξενεί διάφορες θέσεις φωσφορυλίωσης και είναι ο στόχος διαφόρων σηματοδοτικών κινασών, όπως οι ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinases) και οι

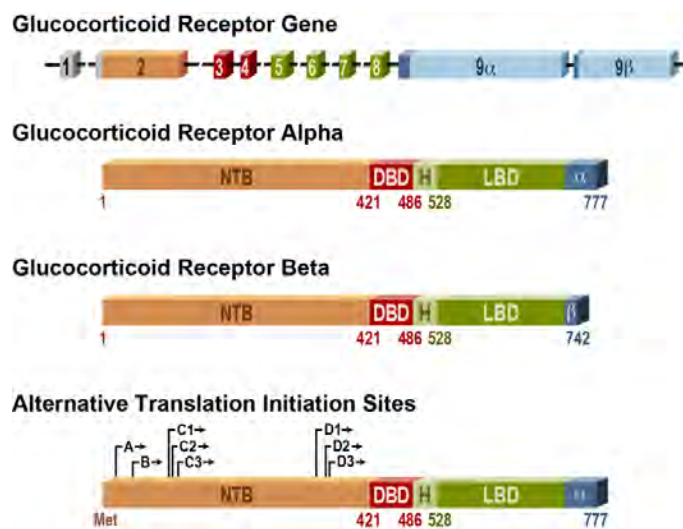
κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cdk, cyclin-dependent kinases). Στη συνέχεια, ακολουθεί η περιοχή δέσμευσης στο DNA (DBD, DNA Binding Domain) και μια περιοχή άρθρωσης (HR, Hinge Region). Στο τμήμα του C-τελικού άκρου είναι η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD, Ligand Binding Domain), που ξεκινά με τη σημαντική θέση αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp, Heat shock proteins) και τελειώνει με μια εξαρτώμενη από ορμόνη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-2, Activation function-2). (Ortsäter H, 2012)



Εικόνα 7. Δομή και περιοχές της ανθρώπινης ισομορφής GRα.

B.3.1.2 Διάφορες ισομορφές GR

Το κωδικοποιητικό γονίδιο για τον ανθρώπινο GR (hGR, human GR) περιέχει 9 εξόνια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q31-32. (Sundahl et al., 2015). Εναλλακτικό μάτισμα του ανθρώπινου γονιδίου GR στο εξόνιο 9 παράγει δύο ομόλογες ισομορφές υποδοχέων, που ονομάζονται α και β. Αυτές είναι πανομοιότυπες μέχρι το αμινοξύ 727 αλλά στη συνέχεια αποκλίνουν, με την α ισομορφή να έχει επιπλέον 50 αμινοξέα και τη β ισομορφή να έχει επιπλέον, μη ομόλογα, 15 αμινοξέα. Επιπλέον, διαφορετικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης αυξάνουν τον αριθμό των πιθανών ισομορφών του GR σε 16 (8α ισομορφές και 8β ισομορφές). Όλες αυτές οι παραλλαγές έχουν διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα ως απόκριση στη DEX (δεξαμεθαζόνη), ποικίλλουν στην υποκυτταρική κατανομή και εμφανίζουν διακριτά μοτίβα ενεργοποίησης ή καταστολής στη γονιδιακή έκφραση. Τα μοριακά βάρη των κανονικών ισομορφών α και β είναι 97 και 94 kilo-Dalton, αντίστοιχα. (Ortsäter H, 2012)



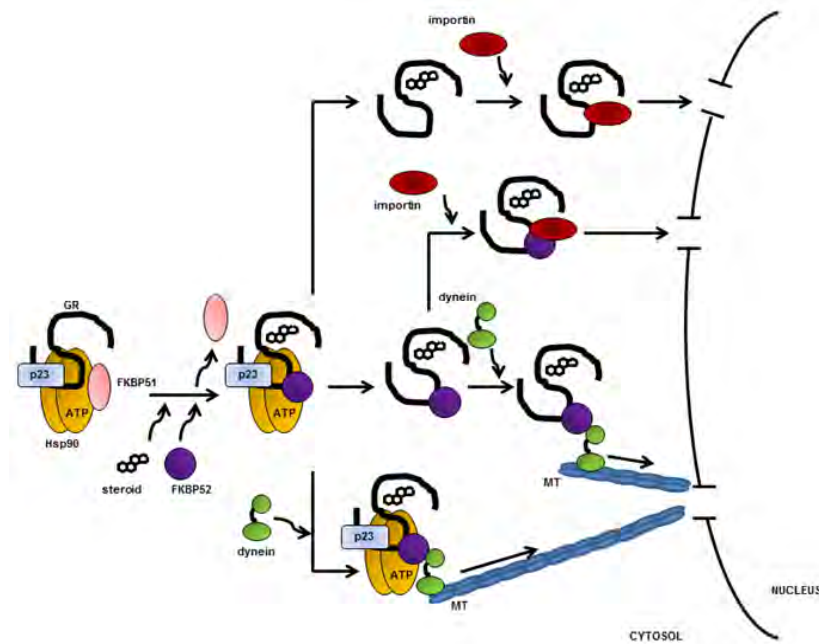
Εικόνα 8. Δομή γονιδίου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR).

Η α ισομορφή του ανθρώπινου GR βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και αντιπροσωπεύει τον κλασικό GR (cGR, cytosolic GR), που λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από προσδέτη. Η β ισομορφή του ανθρώπινου GR, από την άλλη πλευρά, δε δεσμεύει αγωνιστές του GR, έχει γονιδιακά ειδική μεταγραφική δραστηριότητα, ανεξάρτητη από την α ισομορφή, και ασκεί κυρίαρχη αρνητική επίδραση επί της μεταγραφικής δραστηριότητας της α ισομορφής (Ortsäter H, 2012). Επί πλέον, εναλλακτικές θέσεις έναρξης μετάφρασης και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GR καταλήγουν σε διάφορες ισομορφές του GR. Είναι ενδιαφέρον το ότι οι διαφορετικές μεταφράσιμες ισομορφές του GRα, έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν απόπτωση σε διαφορετικούς ρυθμούς. Η ισομορφή GRα-C αναγνωρίστηκε ως ο πιο ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης, ενώ η GRα-D ισομορφή, ο λιγότερο ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν επίσης ότι η σχετική αναλογία ειδικών ισομορφών GR σε ιστούς και κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την απόκρισή τους στην προκαλούμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση. (Gruver et al., 2013)

B.3.1.3.Μηχανισμοί δράσης GR

Οι GRs, από τη στιγμή της σύνθεσής τους και έως ότου αποσυντεθούν, δεν προχωρούν στο μονοπάτι της σηματοδότησης μόνοι τους, αλλά οδηγούνται μέσω μεταγωγής σήματος, από μια ποικιλία μοριακών συνοδών. (Ortsäter et al., 2012) Απουσία του προσδέτη του, ο GRα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα,

συμπλοκοποιημένος με πρωτεΐνες θερμικού σοκ/ μοριακές συνοδούς των 90 kDa (HSP-90), καθώς επίσης και με ανοσοφιλίνες και άλλες πρωτεΐνες. Αυτές μπλοκάρουν την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) του cGRα, αναστέλλοντας, έτσι, την πυρηνική μετατόπιση του GR. Ο GR, δεσμευμένος σε αυτές τις πρωτεΐνες παρουσιάζει μια τρισδιάστατη (3-D) δομή με τρεις εκτεθειμένες περιοχές: την περιοχή σύνδεσης HSP, την περιοχή δέσμευσης στο DNA και την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (Mitre et al., 2015). Εντούτοις, λαμβάνει χώρα μια συνεχής μετακίνηση μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος τόσο του ενεργοποιημένου όσο και του μη ενεργοποιημένου GR (Sundahl et al., 2015). Μόλις το γλυκοκορτικοειδές δεσμεύσει τον cGRα, αυτός υφίσταται αλλαγές διαμόρφωσης και φωσφορυλιώνεται από την ρ38 MAP κινάση στη σερίνη 211, η οποία είναι κρίσιμη για την μέγιστη ενεργοποίηση της σηματοδότησης GC (Mitre et al., 2015). Μετά τη φωσφορυλίωση του GR, προκαλείται αλλοστερική αλλαγή στο ανασταλτικό σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν νωρίτερα, που προάγει την αποσύνδεσή τους από το cGRα, επιτρέποντας την έκθεση του NLS και του τομέα διμερισμού (DD). Κατά συνέπεια, ο cGRα σχηματίζει ένα ομοδιμερές με τον ίδιο cGRα, μετατοπίζεται στον πυρήνα και δεσμεύεται στα στοιχεία απόκρισης στα GC (GRE, glucocorticoid response elements), στους υποκινητές των γονιδίων στόχων του. Αυτή η διαμόρφωση του ενεργοποιημένου cGRα επιτρέπει τη φυσική αλληλεπίδραση με μια ποικιλία συν-ρυθμιστικών παραγόντων και με τη χρωματίνη. Τα γλυκοκορτικοειδή, με τη σύνδεση με τον GR, επάγουν γενωμικούς και μη γενωμικούς μηχανισμούς δράσης. (Sundahl et al., 2015)



Εικόνα 9. Μεταφορά του ενεργοποιημένου GR από το κυτοσόλιο στον πυρήνα.

B.3.1.3.α. Γενωμικός μηχανισμός δράσης

Ο γενωμικός μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών είναι αυτός που παράγει μεταβολές στα επίπεδα mRNA. Αυτές οι μεταβολές μπορεί να προκύψουν από μεταβολές στη μεταγραφή γονιδίων στόχων ή μεταβολές της ημίσειας ζωής του mRNA. Ειδικότερα, ο κυτοσολικός GRα (cGRα) ο οποίος, μόλις συνδεθεί με το γλυκοκορτικοειδές, μετατοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με το DNA άμεσα ή έμμεσα σχηματίζοντας σύμπλοκα πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Mitre et al., 2015). Οι γονιδιωματικοί μηχανισμοί μπορούν να έχουν δύο αποτελέσματα: τη διέγερση της γονιδιακής μεταγραφής και την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής. (Sundahl et al., 2015)

Διέγερση της γονιδιακής μεταγραφής:

Η γονιδιακή έκφραση μπορεί να διεγερθεί μέσω τριών κύριων διαφορετικών μηχανισμών: (1) ο GR σχηματίζει ένα διμερές και δεσμεύεται σε ένα ατελές παλινδρομικό GRE, ενεργοποιώντας, έτσι, τον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου στόχου, (2) ο (μονομερής) GR δεσμεύεται στο DNA μαζί με έναν άλλο μεταγραφικό παράγοντα, ενισχύοντας, με τον τρόπο αυτό, συνεργιστικά τη γονιδιακή έκφραση και (3) ο GR μπορεί, επίσης, να αλληλεπιδράσει με μεταγραφικούς παράγοντες, χωρίς να

αλληλεπιδρά με το ίδιο το DNA. Αυτοί οι τρεις μηχανισμοί διεγείρουν, μεταξύ άλλων, την έκφραση αντιφλεγμονωδών γονιδίων και επίσης την έκφραση γονιδίων, τα μεταβολικά προϊόντα των οποίων, μπορεί να προκαλέσουν παρενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, όπως διαβήτης, γλαύκωμα, υπέρταση και μυϊκή αδυναμία (Beck et al., 2009, Sundahl et al., 2015).

Καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής:

Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη γονιδιακή μεταγραφή μέσω των ακόλουθων μηχανισμών:

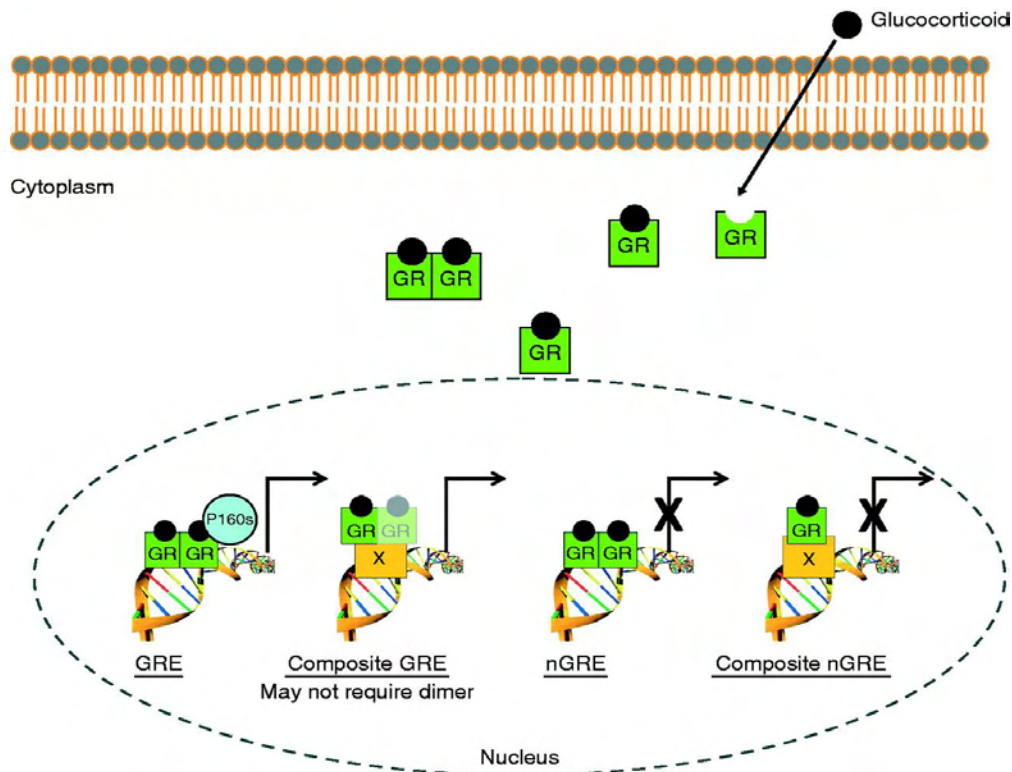
(1) Ο GR μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα μεταγραφικό παράγοντα, παρεμποδίζοντας, έτσι, το μεταγραφικό παράγοντα και καταστέλλοντας τη μεταγραφή. Αυτός είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός καταστολής και είναι ο μηχανισμός που χρησιμοποιείται συχνά για την παρεμπόδιση των προ-φλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κB (Beck et al., 2009) και ο (AP-1).

(2) Εναλλακτικά, ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας επικαλύπτεται με το GRE και η επακόλουθη δέσμευση του GR στο GRE, αποκλείει το μεταγραφικό παράγοντα από τη δέσμευση στο στοιχείο απόκρισης του αντίστοιχου γονιδίου (ανταγωνιστικό GRE).

(3) Ο GR μπορεί να δεσμευτεί με GRE και να διασταυρωθεί με μεταγραφικό παράγοντα που συνδέεται με τον ήδη δεσμευμένο μεταγραφικό παράγοντα στοιχείο απόκρισης (σύνθετο GRE), και τέλος

(4) Ο GR μπορεί να δεσμευτεί σε αρνητικό GRE (nGRE), με αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή.

Αυτοί οι μηχανισμοί συνήθως παρεμποδίζουν τη μεταγραφή των προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών (π.χ. κυτοκίνες, ένζυμα και μόρια προσκόλλησης). Ως εκ τούτου, ο μηχανισμός της καταστολής έχει, από καιρό, συνδεθεί με τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις που σχετίζονται με τα γλυκοκορτικοειδή και γενικά, με το θεραπευτικό αποτέλεσμα. (Sundahl et al., 2015)



Εικόνα 10. Σηματοδότηση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μετατοπίζεται στον πυρήνα μετά τη δέσμευσή του με τον προσδέτη, όπου ενεργεί ως ένα ομο- ή ετεροδιμερές με ή χωρίς άλλους συμπαραγόντες, για να καταστείλει ή να οδηγήσει στην επαγωγή της μεταγραφή γονιδίων-στόχων (Schlossmacher et al., 2011)

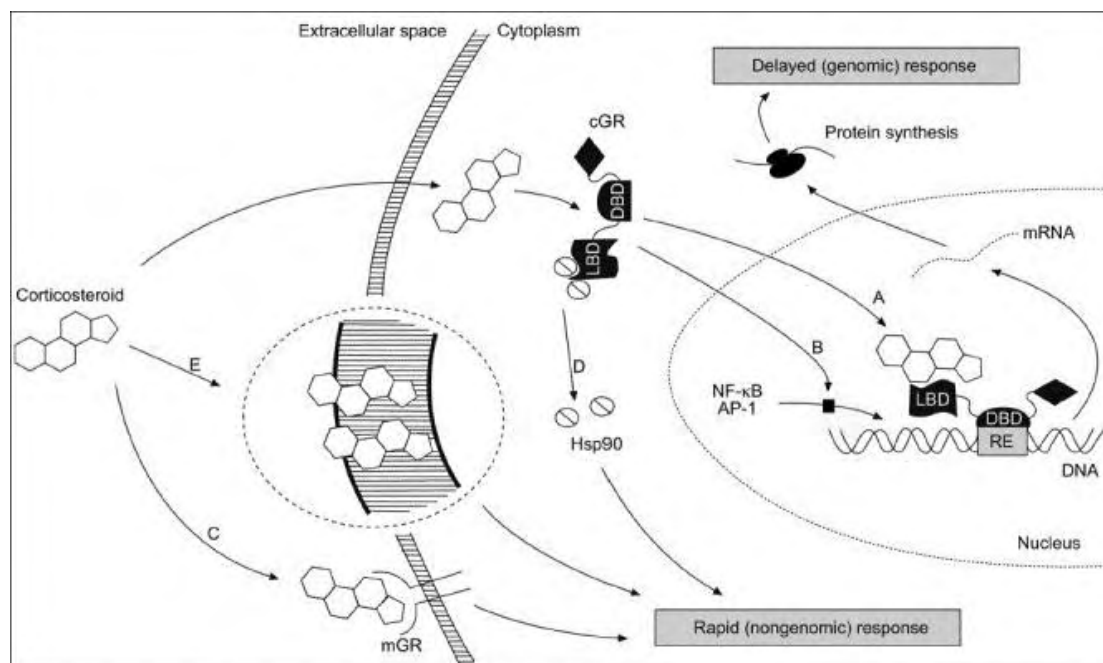
β. Μη γενωμικός μηχανισμός δράσης

Εκτός από τους προαναφερθέντες GR-μεσολαβούμενους γενωμικούς μηχανισμούς, έχουν αναφερθεί, επίσης, αρκετές γρήγορες μη γενωμικές οδοί (Sundahl et al., 2015). Οι μη γενωμικές επιδράσεις ορίστηκαν ως οποιεσδήποτε δράσεις που δεν επηρεάζουν αρχικά και άμεσα τη γονιδιακή έκφραση, αλλά επάγουν ταχείες αποκρίσεις, όπως η ενεργοποίηση οδών μεταγωγής σήματος. Μέχρι σήμερα, οι μη γενωμικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών έχουν περιγραφεί εμπλέκοντας τον GR, που εντοπίζεται, όμως, στη κυτταροπλασματική μεμβράνη αντί στο κυτοσόλιο (mGR) (Mitre et al., 2015). Οι μη γενωμικοί μηχανισμοί χαρακτηρίζονται από το γρήγορο ξεκίνημά τους (σε δευτερόλεπτα ή λεπτά) και από σύντομη χρονική διάρκεια δράσης (60-90 λεπτά) (Alangari et al., 2010). Αυτό συνεπάγεται ότι οι επιδράσεις τους δεν επηρεάζονται από τους αναστολείς της μεταγραφής και της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μπορούν να εμφανιστούν σε κύτταρα που δεν έχουν πυρήνα, όπως αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα και σπερματοζώαρια και μπορούν να ενεργοποιηθούν από ανάλογα στεροειδών (για παράδειγμα, αλβουμίνη ορού βοοειδούς [BSA] συζευγμένη με μόρια στεροειδών)

που δεν μπορούν να έχουν πρόσβαση στο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα (Mitre et al., 2015).

Αυτά τα μη γενωμικά μονοπάτια μπορεί να καταλήξουν στην επαγωγή καταρρακτών σηματοδότησης, σε αλλαγές στις κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις ασβεστίου, νατρίου ή καλίου, σε αύξηση της μιτοχondριακής παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου και υπεροξειδίου υδρογόνου, κλπ (Sundahl et al., 2015, Smith & Cidlowski, 2010).

Για το μη γενωμικό μονοπάτι, έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί, όπως: άμεση μεμβρανική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών, GRs που στοχεύουν μόρια σηματοδότησης που σχετίζονται ή όχι με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και GRs, που μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια (Sundahl et al., 2015).



Εικόνα 11. Οι γενωμικές δράσεις μεσολαβούνται μέσω A) άμεσης δέσμευσης στο DNA ή B) καταστολής παραγόντων μεταγραφής. Οι μη γενωμικές δράσεις προκαλούνται από C) υποδοχείς δεσμευμένους στη μεμβράνη, D) κυτοσολικούς υποδοχείς ή E) αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη. cGR: κυτταροπλασματικός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών; mGR: μεμβρανικός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών; LBD: περιοχή δέσμευσης του προσδέτη. DBD: περιοχή δέσμευσης στο DNA, hsp 90: πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90; RE: στοιχείο απόκρισης. NFκB: πυρηνικός παράγοντας κB; AP-1: ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1. (Alangari et al., 2010)

B.3.1.4. Απόπτωση-Ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια

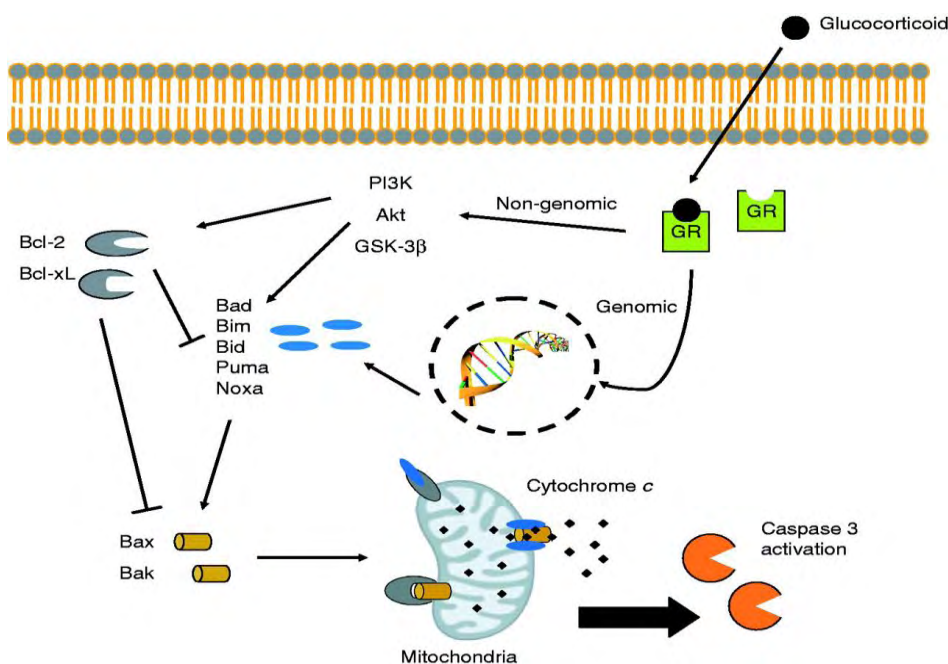
Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, καθώς επίσης και η χρωματίνη,

η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική, αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή.

Στην επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση πιστεύεται ότι συνεισφέρουν διάφοροι μηχανισμοί. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν μέσω της εξωγενούς αποπτωτικής οδού, όμως, ο κλασικός μηχανισμός της προκαλούμενης από γλυκοκορτικοειδή απόπτωσης εμπλέκει την ενεργοποίηση της ενδογενούς αποπτωτικής οδού. Η εξωγενής αποπτωτική οδός χαρακτηρίζεται από την εμπλοκή εξωγενών σημάτων (π.χ. FasL, TRAIL) που ενεργοποιούν τους υποδοχείς θανάτου (FADD, Fas-associated protein with death domain) Αυτοί με τη σειρά τους θα ενεργοποιήσουν την κασπάση-8 για την έναρξη της απόπτωσης, μέσω ενός μιτοχονδριακά ανεξάρτητου μηχανισμού. Η ενδογενής αποπτωτική οδός είναι μιτοχονδριο-εξαρτώμενη και συμβαίνει σε απάντηση διάφορων ενδογενών ερεθισμάτων (π.χ. γλυκοκορτικοειδή, έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και στέρηση ορού). Η γλυκοκορτικοειδής σηματοδότηση αυξάνει την έκφραση της Bim, η οποία αποτελεί μέλος της προ-αποπτωτικής οικογένειας των Bcl-2 και μπορεί να ενεργοποιήσει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax/Bak, για να διαταράξουν το δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης, καταλήγοντας στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και στη συνέχεια στην ενεργοποίηση της ενεργούς κασπάσης 3 και την απόπτωση. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ενδογενή οδό κατά τη διάρκεια της απόπτωσης που προκαλείται από γλυκοκορτικοειδή, περιλαμβάνουν την ρύθμιση άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως της Bad και της Puma ή τη ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως της Bcl-2 ή της Bcl-xL (Gruver et al. 2013).

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά οργανίδια που λαμβάνουν μέρος σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Λαμβάνουν και ενσωματώνουν αρκετά ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά προ- και αντι-αποπτωτικά σήματα παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη μοίρα του κυττάρου. Οι στεροειδείς ορμόνες, λοιπόν, είναι τέτοια σημαντικά ρυθμιστικά σήματα για την απόπτωση, ανάλογα με τη φύση των κυττάρων-στόχων και των μιτοχονδρίων τους (Psarra & Sekeris et al., 2007). Αυτή η ισορροπία των προ- και αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μπορεί να μεταβληθεί από τα γλυκοκορτικοειδή και το αν επάγεται ένα προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό

αποτέλεσμα, συχνά εξαρτάται από τον ιστό και / ή τον κυτταρικό τύπο (Gruver et al. 2013).. Όσον αφορά το σκελετικό σύστημα, για παράδειγμα, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αντιπολλαπλασιαστικά και προαποπτωτικά αποτελέσματα επί των οστεοβλαστών, τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του οστού. Επιπροσθέτως, τα γλυκοκορτικοειδή έχει αποδειχθεί ότι ασκούν αποπτωτικά αποτελέσματα στα κύτταρα του χόνδρου, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, την υπερτροφία και την παραγωγή μήτρας χόνδρου, συμβάλλοντας στη μείωση της διαμήκου ανάπτυξης των οστών. Η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί απόπτωση στα χονδροκύτταρα και συμβάλλει στην μείωση της ανάπτυξης των οστών σε ποντικούς. Από την άλλη πλευρά, άλλοι κυτταρικοί τύποι, όπως τα ουδετερόφιλα, εμφανίζουν αντιαποπτωτικά αποτελέσματα ως απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή. Ομοίως, τα ωθηκικά θυλακιώδη κύτταρα έχουν αντι-αποπτωτική απόκριση στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Η έκθεση κυττάρων επιθηλιακής προέλευσης σε γλυκοκορτικοειδή, είναι, επίσης, γνωστό ότι παρουσιάζει ένα αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα. (Psarra & Sekeris et al., 2007)



Εικόνα 12. Μηχανισμοί της μεσολαβούμενης από γλυκοκορτικοειδή απόπτωσης. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ασκήσουν τα αποτελέσματά τους είτε γενωμικά είτε μη γενωμικά. Ενώ η ακριβής οδός δεν είναι ξεκάθαρη και μπορεί να ποικίλει σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, πιστεύεται ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω της μιτοχονδριακής οδού προκαλώντας την ενεργοποίηση κασπασών. (Schlossmacher et al., 2011)

Γ. Φαρμακευτική εφαρμογή- SEGRAS

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία φλεγμονωδών, ανοσοποιητικών και αλλεργικών διαταραχών (π.χ., ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα), εγκεφαλικού οιδήματος, σοκ και διάφορων καρκίνων αίματος (π.χ. πολλαπλό μυέλωμα). Χρησιμοποιούνται, επίσης, για την πρόληψη της απόρριψης μετά τη μεταμόσχευση και για τη θεραπεία ανεπάρκειας κορτικοστεροειδών ορμονών. Η κλινική επιτυχία των εξωγενών γλυκοκορτικοειδών (π.χ. δεξαμεθαζόνη, πρεδνιζολόνη) οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα αντιφλεγμονώδη τους χαρακτηριστικά. Όπως προαναφέρθηκε, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή κυρίως μέσω της καταστολής φλεγμονωδών γονιδίων, όπως γονίδια που κωδικοποιούν κυτοκίνες, χημειοκίνες, φλεγμονώδη ένζυμα και μόρια προσκόλλησης που παίζουν ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων προς την κατεύθυνση των περιοχών φλεγμονής (Sundahl et al., 2015).

Τα γλυκοκορτικοειδή παραμένουν η πρώτη θεραπεία για τις φλεγμονώδεις διαταραχές, αλλά η χρόνια και παρατεταμένη χρήση τους σχετίζεται με δυσμενείς επιδράσεις, κυρίως στη μεταβολική ρύθμιση. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο διαβήτης, η μυϊκή απώλεια και η οστεοπόρωση. Θεωρείται ότι οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στους μηχανισμούς καταστολής του υποδοχέα, ενώ η ενεργοποίηση του υποδοχέα είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος των παρενεργειών που σχετίζονται με τη θεραπεία μέσω των γλυκοκορτικοειδών. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι μερικές παρενέργειες μεσολαβούνται κατά κύριο λόγο από την ενεργοποίηση (π.χ. υπεργλυκαιμία και απώλεια μυών), άλλες προκύπτουν απ' την καταστολή (π.χ. καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης) και άλλες παρενέργειες (π.χ. οστεοπόρωση) προκύπτουν και από τις δύο. Η τρέχουσα πρόκληση είναι να ελαχιστοποιηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες από αυτές τις παρενέργειες και να βελτιστοποιηθούν τα ευεργετικά αποτελέσματα που σχετίζονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές προσπάθειες για να βελτιωθεί αυτή η ισορροπία προσπαθώντας να ενισχυθούν οι θεραπευτικές ευεργετικές αντιφλεγμονώδεις δράσεις και να εξομαλυνθούν οι δυσμενείς μεταβολικές δράσεις. Η μεγαλύτερη προσοχή έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα ενεργοποιούν τις ευεργετικές δράσεις του GR και/ή θα καταστέλλουν τις παρενέργειές του. Αυτές οι ενώσεις

ταξινομούνται ως εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs, Selective Glucocorticoid Receptor Agonists) ή εκλεκτικοί διαμορφωτές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRM, Selective Glucocorticoid Receptor Modulators). Η τελευταία κατηγορία είναι ικανή να ρυθμίζει τη δραστηριότητα ενός αγωνιστή του GR. Οι SEGRAs και οι SEGRMs ονομάζονται συλλογικά εκλεκτικοί αγωνιστές και ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAMs, Selective Glucocorticoid Receptor Agonists and Modulators) και είναι ενώσεις που μπορούν να ενεργοποιήσουν συγκεκριμένους μηχανισμούς του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Έτσι, μπορούν να αλλάξουν τα μεσολαβούμενα από τον υποδοχέα προφιλ έκφρασης γονιδίων. Υπάρχουν παραδείγματα προσδετών του υποδοχέα που μπορούν να επάγουν επιλεκτικά καταστολή, χωρίς την ενεργοποίηση και για τα οποία, μακροπρόθεσμα, ο κίνδυνος των παρενεργειών μπορεί να μειωθεί, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις να διατηρούνται. (Sundahl et al., 2015)

Δ. Τριτερπενοειδείς ενώσεις

Δ.1. Γενικές πληροφορίες για τα τριτεροενοειδή

Τα τριτερπενοειδή είναι μεταβολίτες ολιγομερών πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου και αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη ομάδα φυτοχημικών. Έχει εκτιμηθεί ότι υπάρχουν περισσότερα από 20.000 τριτερπενοειδή στη φύση (Liby KT et al., 2007). Βρίσκονται κυρίως σε διάφορα φυτά, συμπεριλαμβανομένων των θαλάσσιων ζιζανίων, καθώς και σε κηροειδείς επικαλύψεις διαφόρων φρούτων και φαρμακευτικών βοτάνων, συμπεριλαμβάνοντας μήλα, κράνμπερρυ, σύκα, ελιές, γκι, λεβάντα, ρίγανη, δεντρολίβανο και θυμάρι (Bishayee et al., 2011).

Τα τριτερπενοειδή βιοσυντίθενται στα φυτά με την κυκλοποίηση του σκουαλενίου, ενός τριτερπενικού υδρογονάνθρακα και πρόδρομου όλων των στεροειδών (Phillips DR et al., 2006).



Εικόνα 13. Δομή σκουαλενίου

Μπορούν επιπλέον να υποκατηγοριοποιηθούν σε ποικίλες ομάδες που περιλαμβάνουν cucurbitanes, cycloartanes, dammaranes, euphanes, friedelanes, holostanes, hopanes, isomalabaricanes, lanostanes, limonoids, lupanes, oleananes, protostanes, squalenes, tirucallanes, ursanes και διάφορες ενώσεις. Παρόλο που τα τριτερπενοειδή θεωρήθηκαν ότι είναι βιολογικά ανενεργά για μεγάλο χρονικό διάστημα, συγκεντρώνοντας στοιχεία σχετικά με το ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων τους σε συνδυασμό με ένα χαμηλό προφίλ τοξικότητας, παρουσιάστηκε ενδιαφέρον όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία και τη θεραπεία ασθενειών.

Τα τριτερπενοειδή χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς σε πολλές Ασιατικές χώρες για τις αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, αντιπυρετικές, ηπατοπροστατευτικές, καρδιοτονωτικές, ηρεμιστικές και τονωτικές επιδράσεις τους. Πρόσφατες μελέτες δεν έχουν επιβεβαιώσει μόνο ορισμένες από τις προαναφερθείσες φαρμακολογικές ιδιότητες πολλών τριτερπενοειδών, αλλά επίσης προσδιόρισαν μια ποικιλία πρόσθετων βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντι-ική, αντιαλλεργική, αντιπηκτική, αντιαγγειογόνο και σπασμολυτική δράση. Ένας αυξανόμενος αριθμός τριτερπενοειδών έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα έναντι ποικίλων καρκινικών κυττάρων, χωρίς να εμφανίζουν οποιαδήποτε τοξικότητα σε κανονικά κύτταρα. Δείχνουν, επίσης, αντικαρκινική αποτελεσματικότητα σε προκλινικά καρκινικά μοντέλα ζώων. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός τριτερπενοειδών έχουν συντεθεί από δομική τροποποίηση των φυσικών ενώσεων για τη βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητας, και μερικά από αυτά τα ημι-συνθετικά ανάλογα, θεωρούνται ως τα πιο ισχυρά αντιφλεγμονώδη και αντι-καρκινογόνα τριτερπενοειδή που είναι γνωστά σήμερα (Bishayee et al., 2011).

4.2. Cucurbitacins

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το ενδιαφέρον στράφηκε στις ουσίες *Cucurbitacin A*, *Cucurbitacin D* και *Cucurbitacin E*. Οι cucurbitacins βρίσκονται συνήθως στα φυτικά είδη των *Bryonia*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Luffa*, *Echinocystis*, *Lagenaria* και *Citrullus* (Kaushik et al., 2015). Είναι μια κατηγορία εξαιρετικά οξειδωμένων τετρακυκλικών τριτερπενοειδών. Είναι ευρέως διανεμημένες στο φυτικό βασίλειο, όπου ενεργούν ως ετερόλογες χημικές φερομόνες που προστατεύουν

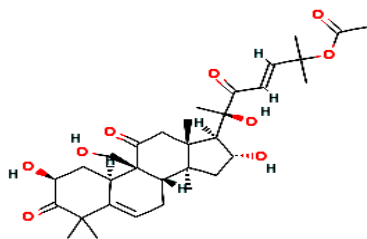
τα φυτά από τις εξωτερικές βιολογικές προσβολές. Το μέγεθος της ευρείας κλίμακας φαρμακολογικών δράσεων τους προσέδωσε την προσοχή στη δεκαετία του 1960. Φυσικές και ημι-συνθετικές cucurbitacins δείχνουν υποσχόμενες αντικαρκινικές δραστηριότητες που προέρχονται από αντι-πολλαπλασιασμό, διακοπή κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της απόπτωσης. Μέχρι σήμερα, περισσότερες από 40 νέες cucurbitacins και προερχόμενες από cucurbitacin ενώσεις έχουν απομονωθεί από την οικογένεια cucurbitaceae.

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί σε σχέση με τα αποπτωτικά αποτελέσματα των cucurbitacins, είναι η ικανότητά τους να τροποποιούν το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και τις μεταγραφικές δραστηριότητες μέσω πυρηνικών παραγόντων ή γονιδίων. Επίσης, η ικανότητά τους να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν προ- ή αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. (Alghasham et al., 2013)

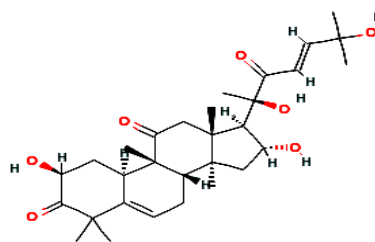
Χημική δομή των cucurbitacins

Δομικά, οι cucurbitacins χαρακτηρίζονται από τον τετρακυκλικό κουκουρβιτανικό πυρηνικό σκελετό (τριτερπένια). Η βασική δομή των τριτερπενίων είναι χτισμένη από έξι μονάδες ισοπρενίου. Τα τριτερπένια, όπως είναι γνωστό, είναι αντίστοιχα ενώσεις 30 ατόμων άνθρακα (C₃₀). (Alghasham et al., 2013)

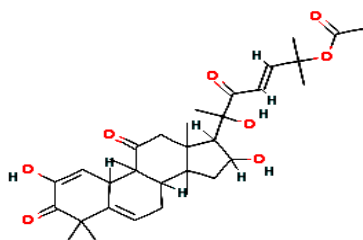
Όλες οι cucurbitacins περιέχουν ένα βασικό 19-(10→9β)-αμπε-10α-λανοσταν-5-ενικό δακτυλικό σκελετό. Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ όλων των ενώσεων στην κατηγορία των Cucurbitacins είναι η παρουσία 5,(6)-διπλού δεσμού. Η διαφορά των Cucurbitacins από το στεροειδή πυρήνα έγκειται στο γεγονός ότι στη βασική δομή των Cucurbitacins, μια μεθυλομάδα βρίσκεται στο C-9 αντί στο C-10. Οι περισσότερες από τις Cucurbitacins είναι τετρακυκλικές, αλλά μερικές έχουν έναν επιπλέον δακτύλιο λόγω της τυπικής κυκλοποίησης μεταξύ C-16 και C-24. Οι Cucurbitacins διαφέρουν από τα περισσότερα από τα άλλα τετρακυκλικά τριτερπένια καθώς είναι υψηλά ακόρεστες και περιέχουν πολλές κετο-, υδροξύλ- και ακετοξυ-ομάδες. Ορισμένες cucurbitacins έχουν ανακαλυφθεί με τη μορφή γλυκοζιτών και μερικές από αυτές δεν έχουν καρβονύλιο στο C-11. Χημικά, οι cucurbitacins κατατάσσονται σύμφωνα με την παρουσία διαφόρων λειτουργικών ομάδων στους δακτυλίους Α και Γ, την ποικιλομορφία στην πλευρική αλυσίδα και τους στερεοχημικούς παράγοντες (Kaushik et al., 2015).



1. Cucurbitacin A



2. Cucurbitacin D (Elatericin A)



3. Cucurbitacin E (Alpha-elterine)

Εικόνα 14. Η χημική δομή των Cucurbitacins που μελετήθηκαν.

Βιοδραστικότητα των cucurbitacins:

Οι περισσότερες cucurbitacins έχουν ένα δυναμικό βιολογικών δραστηριοτήτων ανάλογα με τα κύτταρα-στόχους όπως κυτταροτοξικές, αντικαρκινικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, καρδιαγγειακές και αντιδιαβητικές ιδιότητες. Πράγματι, αυτές οι δραστηριότητες μελετήθηκαν σε *in vivo* και *in vitro* πειράματα. Για παράδειγμα, έχουν δημοσιευθεί οι αντιοξειδωτικές ικανότητες και οι ιδιότητες δέσμευσης των ελεύθερων ριζών των γλυκοσιδίων E cucurbitacin. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν τις ελπιδοφόρες δυνατότητες των cucurbitacins-γλυκοσιδίων στην πρόληψη των ανθρώπινων ασθενειών που περιλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες και οξειδωτική καταστροφή. Επίσης, μερικές από τις cucurbitacins διαθέτουν αντιφλεγμονώδη ή αναλγητικά αποτελέσματα.

Τα τριτερπένια έχουν αναφερθεί ότι επάγουν κυτταρικό θάνατο. Αρκετές διαφορετικές ενώσεις cucurbitacins έχει βρεθεί να παρουσιάζουν αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις στις πολυάριθμες καρκινικές κυτταρικές σειρές του ανθρώπου και τα ξеноμοσχεύματα όγκου, συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του

προστάτη, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, του ήπατος, του δέρματος και του καρκίνου του εγκεφάλου (Alghasham et al., 2013).

Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του κατά πόσο οι ουσίες PCUPO 4 και PCUPO 12 έχουν αποπτωτική δράση, σε κύτταρα HeLa, μέσω της διαδικασίας της ανοσοαποτύπωσης Western Blot. Πραγματοποιήθηκε γι' αυτό, μελέτη των επιπέδων της έκφρασης μορίων που συνιστούν σημεία κλειδιά στο μονοπάτι της απόπτωσης. Επίσης, ελέγχθηκε η ικανότητα των ουσιών TFC 0020, TFC 0021, TFC 0022, να προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR, μέσω πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας. Οι ουσίες παρέχονται από συνεργάτες μας, μέσω του προγράμματος TRIFORC.

2. Υλικά & Μέθοδοι

Προκειμένου να αξιολογηθεί ο ρόλος των τριτερπενοειδών ουσιών PCUPO 4, PCUPO 12 και TFC 0020, TFC 0021, TFC 0022, ως προς τις αποπτωτικές τους ιδιότητες, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης κατά Western και πειράματα ανοσοϊστοχημείας στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa.

2.1 Καρκινικής κυτταρική σειρά HeLa

Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές, γενικά, αποτελούν κύτταρα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον όταν καλλιεργούνται κάτω υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Μία συνεχής κυτταρική σειρά έχει το πλεονέκτημα του να μπορεί να υποστεί ανακαλλιέργεια άπειρες φορές, χωρίς να χάσει κάποια ιδιότητα του κυτταρικού τύπου ή του ιστού απ' όπου προέρχεται.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όλα τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Η σειρά αυτή αποτελείται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας κι απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1951 από τον George Otto Gey (γνωστό ερευνητή της Ιατρικής Σχολής του John Hopkins). Ονομάστηκαν HeLa από τα αρχικά του ονόματος της ασθενούς από την οποία απομονώθηκαν, την 31-ετών Henrietta Lacks. Ο Gey είχε παρατηρήσει πως, σε αντίθεση με άλλα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονταν σε καλλιέργεια και πέθαιναν μετά από συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, τα

κύτταρα της Henrietta's συνέχιζαν να μεγαλώνουν και μάλιστα με πολύ γρήγορο ρυθμό. Έτσι, απομόνωσε ένα και μόνο κύτταρο από το οποίο και προέκυψε ολόκληρη η κυτταρική σειρά και αποτελούν την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που απομονώθηκε.

2.2 Διαχείριση Κυτταροκαλλιιεργειών

Για την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας όλες οι πρακτικές διαδικασίες μέσω κυτταροκαλλιιεργειών, έλαβαν χώρα μέσα σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο κυτταροκαλλιιεργειών, στον οποίο:

- ✓ Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εκπονήθηκαν μέσα στον απαγωγό-θάλαμο καθέτου νηματικής ροής
- ✓ Οποιοδήποτε αντιδραστήριο ή σκεύος χρησιμοποιήθηκε στις κυτταροκαλλιιεργειες, άνοιγε και έκλεινε αυστηρά και μόνο μέσα στον απαγωγό.
- ✓ Μετά τη λήξη των εργασιών μέσα στον απαγωγό, πάντα, εφαρμοζόταν UV ακτινοβολία διάρκειας 30min, για εσωτερικό καθαρισμό του χώρου που χρησιμοποιήθηκε.
- ✓ Η κυτταρική σειρά HeLa, με την οποία εκπονήθηκαν τα περισσότερα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω, ήταν ευγενική χορηγία του ΕΙΕ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών).

2.2.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν αποθηκευμένα στους -80°C ή σε υγρό άζωτο μέσα σε ειδικά φιαλίδια cryovials. Η απόψυξή τους λάμβανε χώρα σε υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 37°C , έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονταν σε 10ml θρεπτικό και ακολουθούσε φυγοκέντρισή τους για 5min, στα 1000rpm, RT ($19-25^{\circ}\text{C}$). Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απορριπτόταν και το ίζημα που προέκυπτε επαναδιαλυόταν μέσα σε θρεπτικό DMEM, υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5mg/ml) και εμπλουτισμένου με 1% v/v 200mM L-γλουταμίνη (L-Glut), 1% v/v πενικιλίνη/στρεπταμυκίνη (P/S) και 10%v/v FBS, παρουσία ερυθρού της φαινόλης. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνταν για ανάπτυξη στον επωαστήρα, όπου

επικρατούσαν συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και υγρασίας 5% CO₂ κι αφήνονταν εκεί μέχρι η πληρότητα της φλάσκας (confluency) να φτάσει το 80-85%.

2.2.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Σε ποσοστό πληρότητας της φλάσκας περίπου 80% πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων, με χρήση διαλύματος πρωτεολυτικών ενζύμων, όπου: αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την επιφάνεια της φλάσκας, έπειτα, προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,25%, αφήνεται να δράσει στον επωαστήρα. Αμέσως μόλις παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων προστίθεται τετραπλάσια (4×) ποσότητα θρεπτικού, ώστε να σταματήσει η θρυψινοποίηση, κι ακολουθεί σχολαστική επαναιώρηση/ανακίνηση των κυττάρων, για να σπάσουν συσσωματώματα κυττάρων που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί. Το 1/4 έως και το 1/10 της αρχικής καλλιέργειας χρησιμοποιείται για ανακαλλιέργεια και συμπληρώνεται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού.

2.2.3 Πάγωμα κυττάρων

Μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις, γίνεται ,συνήθως, πάγωμα κάποιων κυττάρων έτσι ώστε να υπάρχουν μελλοντικά διαθέσιμα stock στους -80°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα FBS και καθορίζεται από την αναλογία FBS/DMSO = 9/1. Συγκεκριμένα, σε κάθε cryovial προστίθενται: 0,9ml διαλύματος FBS μαζί με κύτταρα + 0,1ml DMSO (SIGMA), που είναι κρυοπροστατευτικός παράγοντας. Αμέσως μόλις γίνει η προσθήκη του DMSO, πραγματοποιείται γρήγορη ανακίνηση και μεταφορά-αποθήκευση των vials στους -80°C.

2.2.4 Μέτρηση & Στρώσιμο κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια *αιμοκυτταρόμετρου* (πλάκα *Neubauer*). Αρχικά, γίνεται θρυψινοποίηση των κυττάρων, όπως αυτή ήδη περιγράφηκε. Μόλις επαναδιαλυθεί το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση, λαμβάνονται 10μl, μετά από καλή ανακίνηση του περιεχομένου και μεταφέρονται στη μία πλευρά της πλάκας *Neubauer*, όπου και γίνεται η μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στα 4 τεταρτημόρια.

Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των ζωντανών κυττάρων στα τεταρτημόρια αυτά και επειδή ο αριθμός που προκύπτει αντιστοιχεί στα 10μl, γίνεται αναγωγή στο

1ml, δίνοντας έτσι την ποσότητα αρχικής καλλιέργειας που πρέπει να φυγοκεντρηθεί για 5min στα 1000 rpm σε RT (19-25°C). Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι και το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου.

Το θρεπτικό με το οποίο έγιναν όλα τα πειράματα ήταν το DMEM cis, με σύσταση:

-10% CIS (Charcoal Inactivated Fetal Bovine Serum)

-1% L-Glut και DMEM without phenol red, high glucose (4.5mg/ml), εμπλουτισμένο με 1% P/S.

2.3 Western- Blot Analysis

2.3.1. Προετοιμασία των δειγμάτων

Day 1: Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και μέτρηση κυττάρων HeLa. Ακολουθεί στρώσιμο των κυττάρων σε 6wells-plate, μετά από διαλυτοποίηση σε DMEM cis (2ml/well).

Day 3: Αφαίρεση DMEM cis και προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών στα wells. Η σύσταση των ουσιών δίνεται παρακάτω:

Control: 2ml DMEM cis + 2μl DMSO + 2μl EtOH 100%

DEX: 2ml DMEM cis + 2μl DMSO + 2μl DEX 10⁻³ M

Δείγματα με ουσίες: 2ml DMEMcis + 2μl υπό εξέταση ουσίας + 2μl EtOH 100%

για τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 48 ώρες και έπειτα απομακρύνονται από τον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και μεταφέρονται στο εργαστήριο, όπου από εδώ και πέρα η υπόλοιπη διαδικασία συνεχίζεται στον πάγο.

2.3.2. Συλλογή των κυττάρων

Αρχικά γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού από τα πηγαδάκια (wells) και μία πλύση με παγωμένο κι αποστειρωμένο διάλυμα PBS 1× (1ml/well), το διάλυμα απορρίπτεται από τα wells και ξαναπροστίθεται η ίδια ποσότητά του. Με τη χρήση ειδικού scraper γίνεται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα και το εσωτερικό των wells κι ακολουθεί η μεταφορά του κάθε δείγματος σε αριθμημένο eppendorf του 1.5ml. Προστίθεται μία επιπλέον ποσότητα περίπου 250μl PBS 1× και επαναλαμβάνεται ότι περιγράφηκε, προκειμένου να διασφαλιστεί η πλήρης αποκόλληση-συλλογή των κυττάρων. Ακολουθεί φυγοκέντριση των εναιωρημάτων

στα 1.200 rpm για 6min στους 4°C, μετά την οποία, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προέκυψε είτε μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C ή διαλυτοποιείται εκείνη τη στιγμή σε Lysis Buffer και ακολουθεί λύση των κυττάρων.

2.3.3. Λύση των κυττάρων

Το Lysis Buffer (LB), στο οποίο επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα, που είναι το Buffer A, φυλάσσεται στους 4°C και αποτελείται από:

- ✓ 20mM Tris pH 7.5
- ✓ 0.5% Triton X-100
- ✓ 250mM NaCl
- ✓ 3mM EDTA

Στο 1ml του διαλύματος αυτού προστίθενται:

- 10μl Protease Inhibitors 1/100
- 2μl DTT 1M, το οποίο χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας
- 0.5μl PMSF 20mM

Συνήθως, σε κάθε erpendorf η ποσότητα LB που προστίθεται είναι 50-70μl. Τα κύτταρα επωάζονται με το LB για διάστημα 40-60min και αποφεύγονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, λόγω της ύπαρξης του PMSF στο διάλυμα.

2.3.4. Ομογενοποίηση των κυττάρων

Με τη βοήθεια υπερήχων, τα κύτταρα υφίστανται 5 κύκλους sonication, διάρκειας 1 sec στο 40% ATT, με ενδιάμεσα διαστήματα παύσεων διάρκειας 28-30sec.

2.3.5. Ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα προηγούμενα στάδια πραγματοποιείται με τη μέθοδο *Bradford*, μέσω της οποίας είναι δυνατός ποσοτικός προσδιορισμός δειγμάτων με συγκέντρωση 1-1.500mg/ml.

Για τον έλεγχο του κάθε δείγματος: Αρχικά, προστέθηκε 1μl του υπό εξέταση δείγματος και στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1×. Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 20min, σε RT απουσία φωτός. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 595nm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο. Τα δείγματα που επρόκειτο να

ηλεκτροφορηθούν φυλάσσονταν στους -20°C , ενώ τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στους -80°C .

2.4 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Πραγματοποιούταν περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η β-μερκαπτοαιθανόλη και με θέρμανση στους 95°C , ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πηκτή της ηλεκτροφόρησης αποτελείται από δύο τμήματα: α. την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), και β. την πηκτή διαχωρισμού (separating gel), που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή για να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού συγκέντρωσης 10%, καθώς στη συγκεκριμένη πυκνότητα γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 17-70kDa.

Πηκτή Διαχωρισμού (10%) (separating gel)	Πηκτή Επιστοίβαξης (stacking gel)
ddH ₂ O 2.425ml	ddH ₂ O 2.025ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8 1.25ml	Tris-HCl 1.5M pH 6.8 0.21ml
SDS 10% 50μl	SDS 10% 25μl
Bis- Acrylamide 40% 1.25ml	Bis- Acrylamide 40% 0.25ml
APS 10% 25μl	APS 10% 12.5μl
TEMED 2.5μl	TEMED 2.5μl

Πριν γίνει η φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή επιστοίβαξης, αν ηλεκτροφορούνται για πρώτη φορά, απαιτείται θέρμανσή τους στους 95°C για 5min.

Σε περίπτωση που έχουν υποστεί ξανά θέρμανση και κατ' επέκταση ηλεκτροφόρηση θερμαίνονται για 2-3min. Μέσω της θέρμανσης επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αμέσως μετά τη θέρμανση, υποβάλλονται σε μία φυγοκέντρηση (spin) διάρκειας δευτερολέπτων, στη μέγιστη ταχύτητα, με σκοπό τα δείγματα να έχουν ομοιογενή σύσταση πριν τη φόρτωση στην πηκτή. Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων. Η συνήθης ποσότητα είναι 15-20μl. Μαζί με τα δείγματα φορτώνονται και 1-2μl μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (Marker). Η πηκτή τρέχει σταθερά στα 0.02A παρουσία Running Buffer 1×, με σύσταση: 1) 900ml dH₂O, 2) 100ml Running Buffer 10×, 3) 10ml SDS 10%.

2.4.1 Ανοσοαποτύπωση Western

Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η πηκτή αφαιρείται από την ειδική συσκευή, και τοποθετείται για εξισορρόπηση σε παγωμένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer). Ταυτόχρονα εξισορροπούνται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τέσσερα χαρτιά Whatman (W.B. filter papers) και δύο υδροαπορροφητικά σφουγγάρια Transfer Buffer για 10-15min. Αμέσως μετά τοποθετούνται όλα τα παραπάνω στην ειδική κασέτα ηλεκτρομεταφοράς σε μία διάταξη τύπου sandwich. Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς λαμβάνει χώρα παρουσία φρέσκου Transfer Buffer σε συνθήκες σταθερής έντασης ρεύματος, στα 0.35A, για 70min. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% σε PBST 1× για 1h, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση, ώστε να αποκλειστούν οι θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος (blocking). Μετά το πέρας της 1h, η μεμβράνη μπορεί είτε να αποθηκευτεί προστατευμένη στους -20°C, ή να επωαστεί εκείνη τη στιγμή με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Όταν γίνεται η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος, η μεμβράνη επωάζεται με αυτό Over Night, στους 4°C και υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα, γίνεται η απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος κι ακολουθούν 5 πλύσεις με PBST 1× διάρκειας 5min. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα, που είναι χημικά σημασμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) ο οποίος επιτρέπει την ανίχνευση του. Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα εμπεριέχονται σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 2% με PBST 1% (clear) και φυλάσσονται στους -20°C. Η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα για 1h, σε RT και

υπό ανάδευση. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος γίνονται 3 πλύσεις με PBST 1× διάρκειας 5min (η τελευταία συνήθως 8min).

Εμφάνιση του σήματος σε film

Επόμενο στάδιο είναι η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP Γίνεται ανάμιξη ίσου όγκου των διαλυμάτων ECL A και B και προσθήκη του τελικού τους διαλύματος στην μεμβράνη για 3 min στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης, έτσι ώστε να αποκλειστεί η διέλευση του φωτός, καθώς τα ECL είναι φωτοευαίσθητα.

Η εμφάνιση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο, με χρήση των εμπορικών αντιδραστηρίων του εμπορικού kit της Kodak. Ένα κομμάτι φιλμ τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη για χρονικό διάστημα που ορίζει ο ερευνητής. Ακολουθεί εμφάνιση του σήματος με επώαση διάρκειας 1min σε διάλυμα Developer, ενδιάμεση πλύση με νερό για περίπου 10sec, ξανά επώαση του φιλμ διάρκειας 1min με διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) και τέλος, σύντομη πλύση με νερό. Μόλις τελειώσει η διαδικασία της εμφάνισης, η μεμβράνη εκπλένεται με PBST 1×για περίπου 10-15 min έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ECL. Στο στάδιο αυτό μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για νέο κύκλο εμφανίσεων ή να αποθηκευτεί προστατευμένη στους -20°C.

2.5 Ανοσοϊστοχημεία

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε 24 well-plate, στο οποίο τοποθετήθηκαν 5 καλυπτρίδες (coverslips), σε 5 πηγαδάκια (1 coverslip/well). Ακολούθησε αποστείρωση των wells με 2 πλύσεις με 70% EtOH (χημική απολύμανση) και ακολούθησε έκθεση του plate σε UV ακτινοβολία για 30min (αποστείρωση με ακτινοβολία). Μετά το πέρας των 30min, το plate τοποθετήθηκε κλειστό στον κλίβανο μέχρι τη στιγμή της χρησιμοποίησής του.

Day 0: Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση, μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων. [Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν 13.000cells/well. Άρα 13.000x5 wells= 65.000 cells]. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε DMEM cis(0.5ml/well) κι ακολούθησε διανομή στα πηγαδάκια (wells), στα οποία έχουν

προηγουμένως προστεθεί οι καλυπτρίδες (coverslips). Τα plates τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για επώαση.

Day 3: Πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσιών στα coverslips. Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα:

Mix: 1 ml DMEM cis + 0.2μl CMX 200nM (1:5.000)

Control: 200μl Mix + 0.2μl EtOH 100% + 0.2μl DMSO

Dex: 200μl Mix + 0.2μl DEX 10-3M + 0.2μl DMSO

Δείγματα με ουσίες: 200μl Mix + 0.2μl EtOH 100% + 0.2μl υπό εξέταση ουσία

Το θρεπτικό που υπάρχει μέσα στα wells απομακρύνεται και αντικαθίσταται από 200μl κάθε δείγματος. Ακολούθησε τοποθέτηση του plate στον επωαστήρα, κι επώαση των κυττάρων με τις ουσίες για 2h.

Μετά το πέρας του διαστήματος των 2h, το plate απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα (incubator) και από το σημείο αυτό και έπειτα, η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται στον πάγκο του εργαστηρίου, όπου και εφαρμόζεται το πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων, ως εξής:

Αρχικά, γίνεται αφαίρεση των ουσιών από τα πηγαδάκια. Ακολουθούν 2 πλύσεις με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1× (450ml ddH₂O + 50ml PBS 10×), προσθήκη μεθανόλης για 10min και ψύξη στους -20°C. Έπειτα, η μεθανόλη αφαιρείται και γίνεται προσθήκη ακετόνης για 1min. Στη συνέχεια, αφαιρείται η ακετόνη και στο plate γίνεται 2 φορές πλύση με τPBS 1×.

Στο σημείο αυτό, μπαίνει και το 1^ο αντίσωμα, το οποίο, στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αντίσωμα έναντι του GR. Έγινε χρήση του GR-H300 σε αραιώση 1/50 (GR-H300/PBST). Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1h. Μετά το πέρας της 1h, οι καλυπτρίδες επανατοποθετούνται στο plate και γίνονται 2 πλύσεις με PBS 1×, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος.

Ακολουθεί προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος το οποίο αποτελείται από:

1. 500μl PBST
2. 1μl χρωστικής Hoechst 33342 10 mg/ml, σε αραιώση 1/1000, η οποία χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων.
3. 1μl αντισώματος (anti-Rabbit alexa488) σε αραιώση 1/500. Η χρωστική 488 δίνει την πράσινη φθορίζουσα, κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Η επώαση με το 2ο αντίσωμα διήρκησε 1h, σε RT απουσία φωτός. Μετά το πέρας της 1h, τα coverslips επανατοποθετούνται στο plate και γίνονται 2 πλύσεις με PBS 1×. Στη συνέχεια, τα coverslips τοποθετούνται σε ένα πλακάκι μικροσκοπίου, στο οποίο και έχει τοποθετηθεί διάλυμα PVA, και μονιμοποιούνται. Ακολουθεί τοποθέτησή τους σε ειδική κασετίνα και φυλάσσονται στους 4°C, απουσία φωτός.

Τέλος, αμέσως μόλις στεγνώσει το PVA, είναι δυνατή η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού και η λήψη φωτογραφιών. Το μικροσκόπιο του φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε, είναι το DM 2000 της εταιρίας LEICA και είναι εξοπλισμένο με Qimaging ortiMOS κάμερα, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη.

Όσον αφορά τη σύσταση των δειγμάτων:

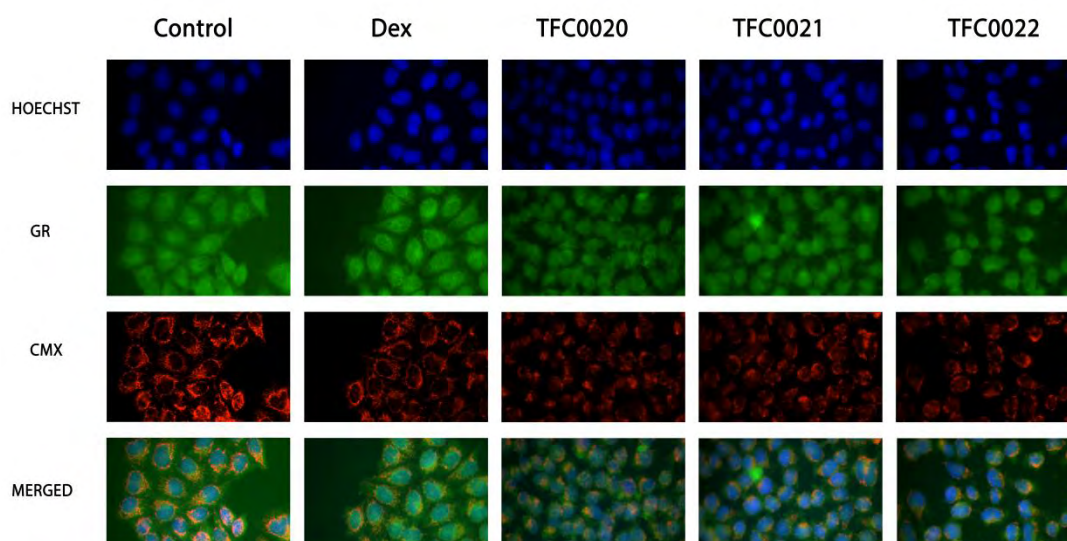
- Η DEX, είναι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη, για την οποία και είναι γνωστό πως προσδένεται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και προκαλεί την μετατόπιση του στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τελικά την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων στόχων των γλυκοκορτικοειδών [Haridas V et al., 2011]. Γενικά βρίσκεται διαλυμένη σε EtOH 100% και αποθηκευμένη στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM, αλλά στα πειράματα, χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1μM.
- Οι ουσίες που μελετήθηκαν είναι διαλυμένες σε DMSO, φυλάσσονται στους -20°C σε συγκέντρωση 10mM και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 10μM.
- Το CMXROS (CMX) αποτελεί ζωτική χρωστική, η οποία ενσωματώνεται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων και η χρήση της σε μικρότερη αραίωση ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το ενδεδειγμένο (στην προκειμένη περίπτωση 2h) μπορεί να αποβεί καταστροφική για τα κύτταρα. Αποθηκεύεται επίσης στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 200nM.

3. Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

3.1 Οι ουσίες Cucurbitacin A, Cucurbitacin D, Cucurbitacin E

Τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας που εκπονήθηκαν είχαν ως σκοπό τη μελέτη και την εξέταση της ικανότητας των ουσιών Cucurbitacin A, Cucurbitacin D, Cucurbitacin E να προκαλούν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, GR, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Καθώς και μεταβολές στη μιτοχονδριακή δομή και λειτουργία. Οι συντομογραφίες των ουσιών που μελετήθηκαν είναι:

TFC 0020	Cucurbitacin D
TFC 0021	Cucurbitacin E
TFC 0022	Cucurbitacin A



Εικόνα 15 . Κύτταρα HeLa, που έχουν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1 μ M DEX (διαλυμένη σε EtOH) ή 10 μ M από τις ουσίες Cucurbitacin D, E, A (διαλυμένα σε DMSO) για 2 ώρες. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως control επώαστηκαν με EtOH (1/1000) και DMSO (1/1000). Τα κύτταρα κατεργάστηκαν με χρωστικές ανοσοϊστοχημείας. Ο GR απεικονίζεται με πράσινη χρωστική και ο πυρήνας με μπλε χρωστική. Τα κύτταρα επίσης επώαστηκαν με την μιτοχονδριακή χρωστική CMX για ανίχνευση και έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Οι εικόνες ανοσοϊστοχημείας λήφθηκαν μέσω κάμερας Qimaging optiMOS (ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη).

Προκειμένου να γίνει σήμανση και χαρακτηρισμός των λειτουργικών μιτοχονδρίων, χρησιμοποιήθηκε (όπως φαίνεται στην Εικόνα 15) η χρωστική CMX, μέσω της οποίας τα μιτοχόνδρια απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Αντίστοιχα, η χρώση των πυρήνων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωστικής Hoechst 33342, οι οποίοι απεικονίζονται με μπλε χρώμα. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτιοειδών GR (anti-GR) για να επιτευχθεί η ανάλυση και να εξαχθούν τα αντίστοιχα συμπεράσματα που αφορούν την επίδραση των τριτερπενοειδών ουσιών Cucurbitacin D, E, A στην επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR (ο οποίος απεικονίζεται με πράσινο χρώμα).

Στην προκειμένη περίπτωση δεν παρατηρείται πυρηνική μετατόπιση του GR, παρουσία των υπό μελέτη ουσιών. Στα κύτταρα στα οποία έχει προστεθεί δεξαμεθαζόνη (DEX) είναι η μόνη περίπτωση όπου διακρίνουμε πυρηνική μετατόπιση του GR.. Αυτό είναι λογικό, καθώς γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι η DEX προκαλεί πυρηνική μετατόπιση του GR [Psarra & Sekeris 2008]. Αντιθέτως, παρουσία των ουσιών TFC 0020, TFC 0021 και TFC 0022 δε διακρίνουμε μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Παρόλα αυτά, παρατηρήσαμε ότι οι ουσίες αυτές προκαλούν συρρίκνωση των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια στα κύτταρα-control έχουν μια πιο καλοσηματισμένη μορφή σε σύγκριση με αυτή των μιτοχονδρίων των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τις συγκεκριμένες με τις ουσίες. Φαίνεται χαρακτηριστικά ότι μετά την επίδραση των ουσιών TFC 0020, TFC 0021 και TFC 0022 στα κύτταρα, τα μιτοχόνδριά τους εμφανίζονται με μια πιο συρρικνωμένη μορφή. Ουσιαστικά βλέπουμε μια ακτινωτή δομή του κυττάρου σε σχέση με τη φυσιολογική, όπου έχουμε ομοιόμορφη κατανομή των μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα και σε ορισμένες περιπτώσεις ενίσχυση της περιπυρηνικής τους εντόπισης. Η διαφορετική αυτή δομή που αποκτούν τα κύτταρα και η διαφορά στη μορφολογία τους υποδηλώνει το γεγονός ότι, πιθανόν, οι ουσίες αυτές προκάλεσαν τη μεταβολή αυτή. Με τον τρόπο αυτό, οι ουσίες TFC 0020, TFC 0021 και TFC 0022 δίνουν μια ένδειξη για πιθανή αποπτωτική δράση τους στα κύτταρα στα οποία μελετήθηκαν.

Παρατηρούμε, επίσης, ότι η μορφολογία των μιτοχονδρίων διαφέρει, ακόμα και μεταξύ των κυττάρων που έχουν επωαστεί με μία από τις παραπάνω ουσίες. Στην εικόνα 15, παρατηρούμε ότι τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που έχουν επωαστεί με την ουσία TFC 0020, παρουσιάζονται εμφανώς πιο συρρικνωμένα σε σχέση με αυτά

που έχουν επωαστεί με τις άλλες δύο ουσίες. Το γεγονός αυτό είναι πολύ πιθανό να μαρτυρά μια πιο έντονα αποπτωτική δράση της συγκεκριμένης ουσίας έναντι των άλλων. Επιπρόσθετα, διαφορά στη μορφή των μιτοχονδρίων παρατηρείται και στα κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί με τις ουσίες TFC 0021 και TFC 0022. Τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που επώαστηκαν με την ουσία TFC0021 εμφανίζονται ελαφρώς πιο συρρικνωμένα σε σύγκριση με την μιτοχόνδρια των κυττάρων που επώαστηκαν με την TFC 0022. Επομένως, η ουσία TFC0021 πιθανόν να έχει, ισχυρότερη αποπτωτική δράση από αυτή της TFC0022, γεγονός που θα μπορούσε και εδώ να αποδοθεί στη διαφορετική πλευρική αλυσίδα, αλλά και στη διαφορά στη στερεοϊσομέρεια της χημικής δομής τους.

3.2. Οι ουσίες PCUPO 4 και PCUPO 12

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποπτωτική δράση των ουσιών PCUPO 4 και PCUPO 12 σε κύτταρα HeLa, μέσω της διαδικασίας της ανοσοαποτύπωσης Western Blot. Πραγματοποιήθηκε γι' αυτό, μελέτη των επιπέδων της έκφρασης μορίων που συνιστούν σημεία κλειδιά στο μονοπάτι της απόπτωσης.

3.2.1. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη-ρυθμιστή της επαγωγής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης και την αναστολή των δράσεων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ως αντιαποπτωτικό μόριο (Schlossmacher et al., 2011).



Εικόνα 16. Επίπεδα έκθρασης των πρωτεϊνών Bcl-2 και προκασπάσης 9 σε κύτταρα HeLa με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά western.

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 16, τα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 δε μεταβάλλονται υπό την επίδραση των ουσιών, αντιθέτως είναι παρόμοια με αυτά του control, λαμβάνοντας υπ όψιν και τα επίπεδα της ακτίνης. Το γεγονός ότι παρουσία των ουσιών μας δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 πιθανόν υποδηλώνει ότι οι ουσίες μας δεν έχουν αποπτωτική δράση.

3.2.2. *Pro-Casp 9*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ανενεργού ενζύμου προ-κασπάση 9 (που αποτελεί το προένζυμο της κασπάσης 9), υπό την παρουσία της DEX και των ουσιών PCUPO 4 και PCUPO 12. Η κασπάση 9, είναι η ενεργός μορφή ενός ενζύμου που παίζει σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή εξαρτώμενη απόπτωση και ως προκασπάση, αποτελεί προαποπτωτικό μόριο. Μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης 9, μαρτυρούν τη μετατροπή της σε κασπάση 9 και κατ' επέκταση, επαγωγή της απόπτωσης. Όπως μπορούμε να δούμε και στην εικόνα 16, τα επίπεδα της προκασπάσης δεν παρουσιάζουν και εδώ στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσία των ουσιών PCUPO 4 και PCUPO 12, σε σύγκριση με το control. Το γεγονός αυτό, πιθανόν υποδηλώνει ότι οι ουσίες δεν επάγουν την απόπτωση στα κύτταρα.

4. Συζήτηση

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, απαραίτητες για την ανθρώπινη ζωή και ρυθμίζουν μια σειρά από σημαντικές διεργασίες που συμβαίνουν στον οργανισμό. Πραγματοποιούν τις διεργασίες αυτές, μετά την δέσμευσή τους, στον αντίστοιχο υποδοχέα τους, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή, χρησιμοποιούνται εδώ και πολλές δεκαετίες σε μια ποικιλία ασθενειών, όπως φλεγμονώδεις νόσοι, αλλεργικές διαταραχές και νοσήματα όπως ο καρκίνος. Παρ' όλα αυτά, η διαδεδομένη χρήση τους παρεμποδίζεται από ένα σύνολο παρενεργειών που μπορούν να επιφέρουν. Για το λόγο αυτό, προέκυψε η ανάγκη για ανακάλυψη επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAS). Οι τριτερπενοειδείς ενώσεις αποτελούν φυτοχημικές ουσίες, που βρίσκονται σε αφθονία στο φυτικό βασίλειο. Μοιάζουν, δομικά, με τα γλυκοκορτικοειδή και το γεγονός αυτό αποτέλεσε το ερέθισμα για περεταίρω μελέτη και αξιολόγησή τους ως προς την

αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, προκειμένου να διερευνησουμε το κατά πόσο ορισμένες τριτερπενοειδείς ενώσεις μπορούν να δράσουν ως SEGRAS, μελετήσαμε, την επίδραση των συγκεκριμένων ενώσεων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa, είτε με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας είτε με ανοσοαποτύπωση κατά western. Μέσω της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας εξετάστηκε, αρχικά, το ενδεχόμενο μετατόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα υπό την επίδραση των τριτερπενοειδών ουσιών Cucurbitacin A, Cucurbitacin D και Cucurbitacin E. Με τη βοήθεια αντισωμάτων έναντι του GR αλλά και ειδικών χρωστικών, προσδιορίστηκε κατά πόσο οι ουσίες μας προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR, καθώς και η επίδραση αυτών των ουσιών στα μιτοχόνδρια. Οι ουσίες Cucurbitacins δεν προκάλεσαν μετατόπιση του GR, όμως παρατηρήθηκε ότι προκάλεσαν συρρίκνωση των λειτουργικών μιτοχονδρίων. Το γεγονός αυτό, αποτελεί μια αξιόλογη ένδειξη για πιθανή αποπτωτική δράση των ουσιών αυτών στα καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν πιθανή αποπτωτική δράση, αλλά απαιτείται περισσότερη διερεύνηση για τον χαρακτηρισμό των μηχανισμών επιτέλεσης αυτής της δράσης. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της ανοσοαποτύπωσης Western Blotting, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μορίων στόχων του GR, που αποτελούν σταθμούς στο μονοπάτι της απόπτωσης, υπό την επίδραση των ουσιών PCUPO 4 και PCUPO 12. Μετά από καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων HeLa και επώασή τους με τις ουσίες αυτές, πραγματοποιήθηκε διαδικασία προετοιμασίας τους και στη συνέχεια αποδιάταξη των πρωτεϊνών τους (SDS-PAGE), έτσι ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης της αντιαποπτωτικής και προαποπτωτικής Bcl-2 και Pro-casp 9, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, τα επίπεδα έκφρασης της αντιαποπτωτικής Bcl-2 και της προαποπτωτικής προκασπάσης 9, παρέμεναν σταθερά και όμοια με αυτά του control. Έτσι οι ουσίες αυτές συμπεραίνουμε ότι πιθανόν, δεν έχουν αποπτωτική δράση. Παρόλα αυτά, για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα είναι αναγκαία η διεξαγωγή πειραμάτων επαναλήψεων του πειράματος, ώστε να αξιολογηθεί το κατά πόσο οι ουσίες αυτές όντως δεν έχουν αποπτωτική δράση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alangari A. Abdullah, (2010), “Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma”, *Annals of Thoracic Medicine*, 5(3): 133–139
2. Alghasham Abdullah A., (2013), “Cucurbitacins-A Promising Target for Cancer Therapy”, *International journal of health Sciences*, Vol. 7, No. 1
3. Beck, I. M., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Yamamoto, K. R., Haegeman, G., & De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 30, 830–882.
4. Bishayee Anupam, Shamima Ahmed, Brankov Nikoleta, Perloff Marjorie, (2011), “Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer”, *National Institute of Health*, 16: 980–996
5. Georgatza D, Gorgogietas VA, Kylindri P, Charalambous MC, Papadopoulou KK, Hayes JM, Psarra AM, (2016), “The triterpene echinocystic acid and its 3-Oglucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists”, *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, Vol 79, 277-287
6. Gruver-Yates L. Amanda, Cidlowski A. John, (2013), “Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword”, *Cells*, 2, 202-223
7. Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J. A. and Kaptein, R. (1990). “Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain.”, *Science* 249, 157-160.
8. Kaushik Ujjwal , Aeri Vidhu, Mir R. Showkat, (2015), “Cucurbitacins – An insight into medicinal leads from nature”, *Pharmacognosy Review*, 9(17): 12–18
9. Liby KT, Yore MM, Sporn MB, (2007), “Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer.”, *Nat Rev Cancer*, 7:357–369.
10. Mitre-Aguilar B.Irma, Cabrera-Quintero Alberto Jose, Zentella-Dehesa Alejandro (2015), “Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids:

- Implications for breast cancer”, *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(1):1-10
11. Moras, D. and Gronemeyer, H. (1998). “The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function.” *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 384-391.
 12. Ortsäter Henrik, Sjöholm Åke and Rafacho Alex. (2012) “Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess” *InTeck*.
 13. Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Masuda SP, (2006), “Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization”, *Curr Opin Plant Biol.*, 9:305–314.
 14. Psarra AM, Sekeris C, (2007) “Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment”, *Biochimica et Biophysica Acta, ELSEVIER*, 1783, 1 – 11
 15. Robinson-Rechavi Marc, Escriva Garcia Hector, Laudet Vincent, (2003)“The nuclear receptor superfamily”, *Journal of Cell Science* 116, 585-586
 16. Schlossmacher George , Stevens Adam, White Anne, “Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells” (2011), *Journal of Endocrinology* 211, 17–25
 17. Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). “Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes”, *Prog Brain Res* 182, 1–30.
 18. Sundahl Nora, Bridelance Jolien, Libert Claude, De Bosscher Karolien , Beck Ilse M. (2015) “Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds”, *Pharmacology & Therapeutics* 152, ELSEVIER, 28-41