

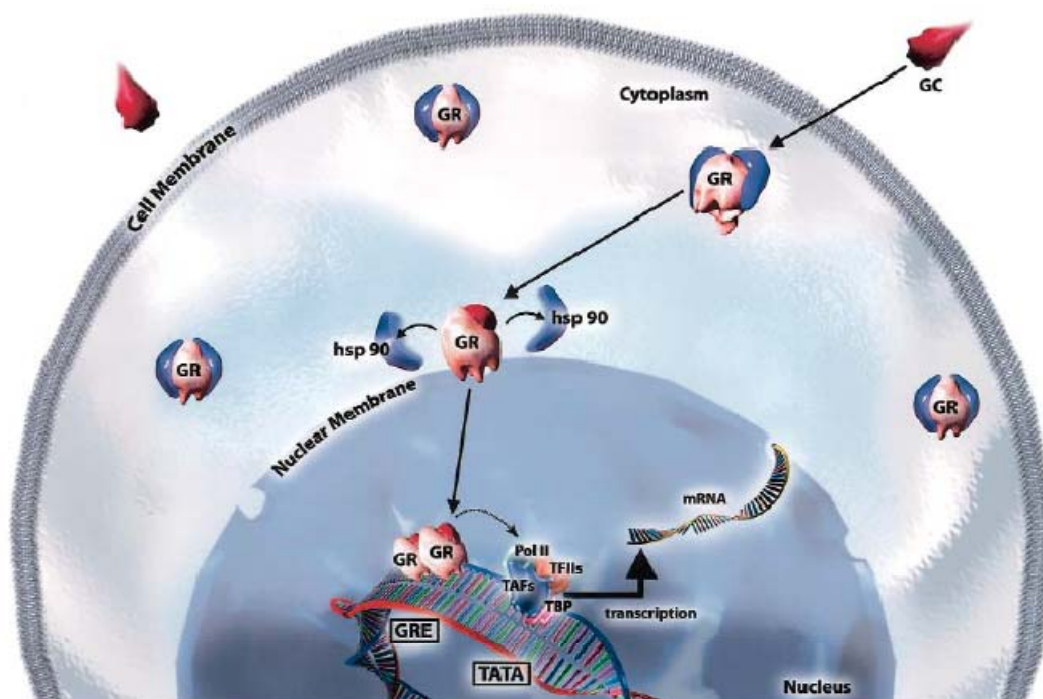


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια: Κυλινδρή Παρασκευή

Διπλωματική Εργασία: Το boswellic acid και τα παράγωγα του ως ρυθμιστές της δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε καρκινικά κύτταρα HeLa & HepG2.



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Α.Μ.

Λάρισα, Ακαδημαϊκό Έτος 2015

Διπλωματική Εργασία

To boswellic acid και τα παράγωγα του ως ρυθμιστές της δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε καρκινικά κύτταρα HeLa & HepG2.

Diploma Project

Boswellic acids and their derivatives are potent glucocorticoid receptor regulators

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Α. Μ., Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

Ψαρρά Α. Μ., Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας.

Λεωνίδας Δ. Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα Ψαρρά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στην ομάδα της, για τις πολύτιμες συμβουλές της όλο αυτό το χρονικό διάστημα καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου όλο αυτό το διάστημα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδακτορικό φοιτητή, Βύρων Γοργογιέτα για τη στήριξη και την πολύτιμη βοήθεια του όλο το χρονικό διάστημα που διήρκησε η μεταπτυχιακή μου εργασία, όπως επίσης και την μετα-διδακτορική Αφροδίτη Κροκίδα για τη συνεργασία και την παροχή πληροφοριών που αφορούσαν το κομμάτι των ενώσεων, και τον διδακτορικό φοιτητή Αθανάσιο Κυρίτη για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθεια που προσέφερε σε κομβικά σημεία της εργασίας. Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας της κα Ψαρρά αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο όλο αυτό το διάστημα. Κλείνοντας, θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου, για την μεγάλη τους υποστήριξη, και στην οικογένεια μου για την κατανόηση, τη στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν όλα τα χρόνια που διήρκησαν οι σπουδές μου στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Περιεχόμενα

<i>Abstract</i>	6
<i>Περίληψη</i>	7
<i>1. Εισαγωγή</i>	8
1.1 Τα γλυκοκορτικοειδή- Γενικές πληροφορίες.....	8
1.2 GR - Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών	12
1.2.1 Δομικές πληροφορίες.....	12
1.2.2 Μηχανισμός GR σηματοδότησης.....	17
1.3 Απόπτωση & Γλυκοκορτικοειδή.....	24
1.4 Γλυκοκορτικοειδή & Κιρκάδιοι ρυθμοί.....	28
1.5 Τα γλυκοκορτικοειδή ως θεραπευτικό μέσο	30
1.6 Η επαγόμενη από GCs απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα & οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας	31
1.7 Τα τριτερπένια ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες	34
1.8 Τα <i>boswelllic acids</i> ως μελλοντικά φαρμακευτικά σκευάσματα.....	35
1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας	36
<i>2. Υλικά & Μέθοδοι</i>	37
2.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές <i>HeLa</i> & <i>HepG2</i> - Γενικές πληροφορίες.....	37
2.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών.....	38
2.2.1 Απόψυξη κυττάρων.....	38
2.2.2 Θρυψινοποίηση των κυττάρων.....	39
2.2.3 Πάγωμα των κυττάρων.....	40
2.2.4 Μέτρηση & Στρώσιμο κυττάρων.....	40
2.3 Ανοσοϊστοχημεία	41
2.4 Western- Blot Analysis	44
2.4.1 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	44
2.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)	47
2.4.3 Ανοσοαποτύπωση Western	50
2.4.4 Western Blot για <i>PEPCK</i> , <i>GR</i> , <i>Caspase 3</i> , <i>Caspase 9</i> & <i>β-actin</i>	53
2.5 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων	54
2.5.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων.....	54

2.5.2	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με pSV40- βGal & pMMTV-GRE-Luc	55
2.5.3	Πρωτόκολλο λουσιφεράσης	57
2.5.4	Πρωτόκολλο β-γαλακτοζιδάσης	58
2.5.3	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με pSV40- βGal & pMMTV- NF-κB-Luc	59
2.5.4	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με pSV40- βGal, pMMTV- NF-κB-Luc, PEGFPC ₂ & PEGFPC ₂ -GR.....	61
3.	Αποτελέσματα.....	64
3.1	Τα boswellic acids (BAs) επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα.....	64
3.2	Επαγωγή της μιτοχονδριακής απόπτωσης από συγκεκριμένα παράγωγα των BAs	66
3.3	Η επίδραση των BAs στην GR μεταγραφική δραστηριότητα.....	69
3.4	Η επίδραση των BAs στην μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB	71
3.5	Η επίδραση του 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) στην μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB	72
4.	Συζήτηση	75
5.	Συντμήσεις.....	83
6.	Βιβλιογραφία.....	85

Abstract

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones which exert their actions via the Glucocorticoid Receptor (GR). GR acts mainly as a ligand-dependent transcription factor. GCs regulate many cellular functions such as cell growth and metabolism, immune response and apoptosis. Due to their anti-inflammatory actions, GCs are used systemically to control chronic inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, psoriasis, multiple sclerosis, or they are also administered locally to patients suffering from asthma, allergic rhinitis and skinallergies. Due to the central role of GCs in the regulation of cellular metabolism and human physiology, the chronic use of GCs gives rise to adverse side effects such as diabetes, osteoporosis, muscle wasting, growth retardation in children, disturbed water balance, fat redistribution, mood disordersand suppression of the HPA axis. Thus, there is a high need for selective glucocorticoid receptor agonist (SEGRA) as effective as classic GCs, but with a reduced side effect profile. Boswellic acids (BA) are triterpene that show structural similarities with GCs and exhibit anti-inflammatory and anti-cancer activity. In this study we examined whether BA alpha and beta and certain BAs derivatives exert their actions, at least partially, through the regulation of GR activities. We showed that certain boswellic acids and their derivatives exert potent GR activities through the regulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation, glucocorticoid receptor transrepressional activity on NF- κ B, and control of expression of certain glucocorticoid receptor target genes involved in glucose metabolism and in the GCs induced apoptosis. Our results indicate that certain BAs are potent selective glucocorticoid receptor regulators and could have great potential for therapeutic use.

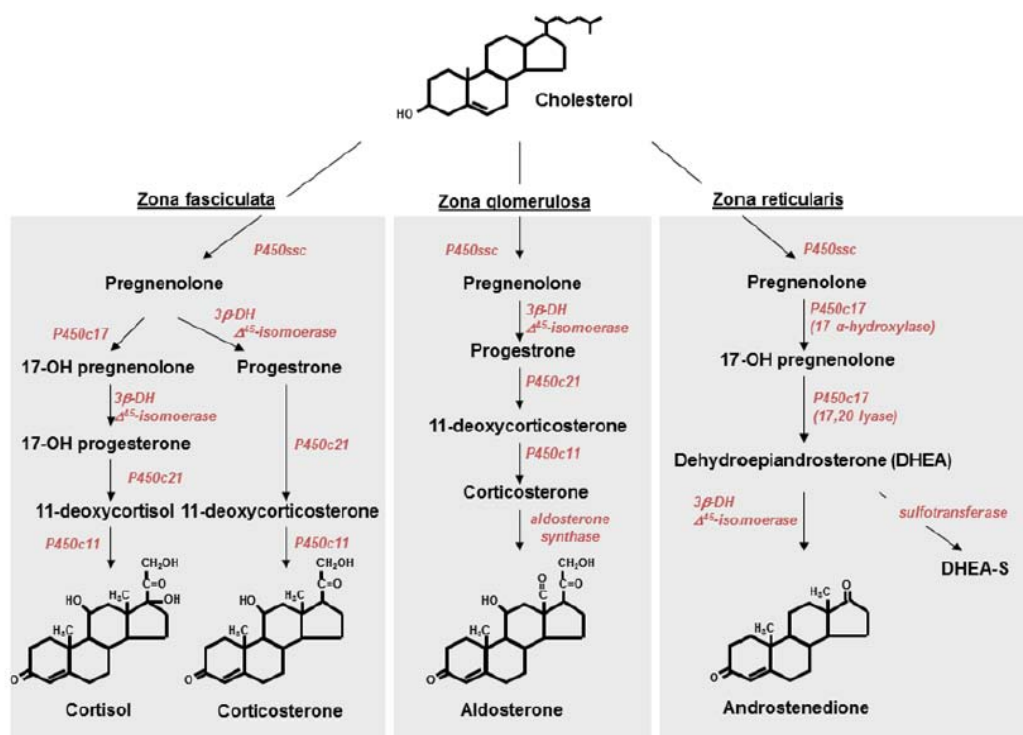
Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCS) είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR δρα κυρίως ως μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από τον υποκαταστάτη. Τα GCs ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη και ο μεταβολισμός, η ανοσολογική απόκριση και η απόπτωση. Λόγω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους, τα GCs χρησιμοποιούνται συστηματικά για τον έλεγχο χρόνιων φλεγμονωδών διαταραχών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου, η ψωρίαση, η σκλήρυνση κατά πλάκας, ή χορηγούνται επίσης τοπικά για ασθενείς που πάσχουν από άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα και δερματικές αλλεργίες. Λόγω του κεντρικού ρόλου των GCs στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού και την ανθρώπινη φυσιολογία, η χρόνια χρήση των GCs προκαλεί δυσμενείς παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η μυϊκή εξασθένηση, η εμφάνιση καθυστερημένης ανάπτυξης στα παιδιά, διαταραχές στο ισοζύγιο του νερού, ανακατανομή του λίπους, διαταραχές στη διάθεση και καταστολή του άξονα HPA. Έτσι, υπάρχει μία μεγάλη ανάγκη για εκλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA) το ίδιο αποτελεσματικούς με τα GCs, αλλά με μειωμένο προφίλ παρενεργειών. Τα Boswellic acids (BAs) είναι τριτερπένια που δείχνουν δομικές ομοιότητες με τα GCs και εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε αν τα άλφα και βήτα BAs και ορισμένα παράγωγά τους ασκούν τις δράσεις τους, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της ρύθμισης των δραστηριοτήτων του GR. Δείξαμε ότι ορισμένα boswellic acids και τα παράγωγά τους ασκούν ισχυρές δράσεις στον GR μέσω της ρύθμισης της πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα, της μεταγραφικής απενεργοποίησης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NF-κΒ, μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα, και του ελέγχου της έκφρασης ορισμένων γονιδίων-στόχων των GRs που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην απόπτωση που επάγεται από τα GCs. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι ορισμένα BAs είναι ισχυροί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών κι επιλεκτικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αρκετά αποτελεσματικά για θεραπευτικούς σκοπούς.

1. Εισαγωγή

1.1 Τα γλυκοκορτικοειδή- Γενικές πληροφορίες

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs), με γνωστότερο εκπρόσωπο τους την κορτιζόλη, ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν τόσο τα αλατοκορτικοειδή όσο και οι σεξότροπες στεροειδής ορμόνες με τα οποία τα γλυκοκορτικοειδή, όπως είναι αναμενόμενο, μοιράζονται πολλές δομικές ομοιότητες, όπως ο δακτύλιος του κυκλοπεντανοφαιναθρενίου. Πρόδρομη ουσία όλων αυτών των ορμονών είναι η χοληστερόλη [Εικόνα 1] [(Σμοκοβίτης, 2007); (Ortsäter H, 2012)].

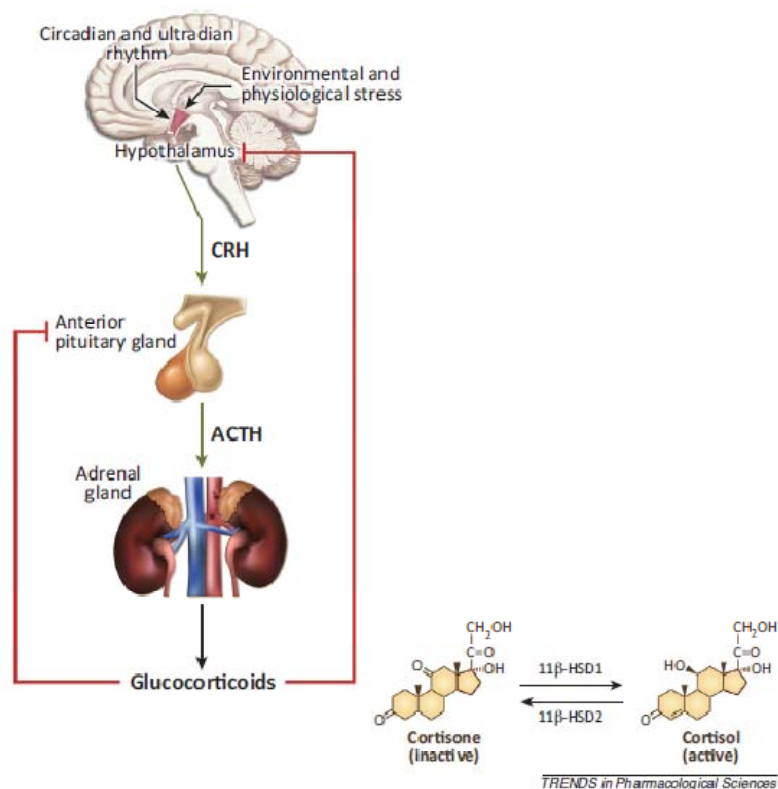


Εικόνα 1: Η σύνθεση των στεροειδών ορμονών γίνεται από τη χοληστερόλη, η οποία μέσω μίας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων δίνει γένεση στα γλυκοκορτικοειδή, στα αλατοκορτικοειδή, στα οιστρογόνα και στα ανδρογόνα.

Η παραγωγή και η απελευθέρωση τους συντελείται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων ακολουθώντας έναν κυκλικό ρυθμό, ο οποίος υπόκειται σε ρύθμιση από τον άξονα του υποθαλάμου-υπόφυσης και των επινεφριδίων (HPA axis). Ειδικότερα, στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως επίσης και στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς, η υψηλότερη έκκριση γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες, ενώ ακολουθεί σταδιακή μείωση των επιπέδων αυτών στην διάρκεια της ημέρας, καταλήγοντας τελικά στα μικρότερα επίπεδα τις απογευματινές-πρώτες βραδινές ώρες. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των φυσικών γλυκοκορτικοειδών στους

ιστούς καθορίζεται από τα επίπεδα της προσδεσμένης με κορτικοστεροειδή σφαιρίνης στον ορό καθώς επίσης και από τα επίπεδα των τοπικά εκφρασμένων ενζύμων της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης (11βHSD).

Τα γλυκοκορτικοειδή εκκρίνονται μετά από διέγερση από την κορτικοτροπίνη ή επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH), που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με τη σειρά της, η έκκριση της ACTH καθορίζεται από την απελευθερωτική ορμόνη της επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης του υποθαλάμου (CRH), η οποία απελευθερώνεται κάτω υπό την επίδραση δυσμενών για τον οργανισμό συνθηκών [Εικόνα 2]. Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί το εξής: τα εκκρινόμενα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν αρνητικά τόσο την απελευθέρωση της ACTH όσο και της CRH, γεγονός που μαρτυρά πως τα στεροειδή ρυθμίζουν την έκκριση τους σε ένα βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης [(Σμοκοβίτης, 2007); (Ortsäter H, 2012; (Cidlowski, 2013); (Feek, 1983); (Vegiopoulos, 2007)].



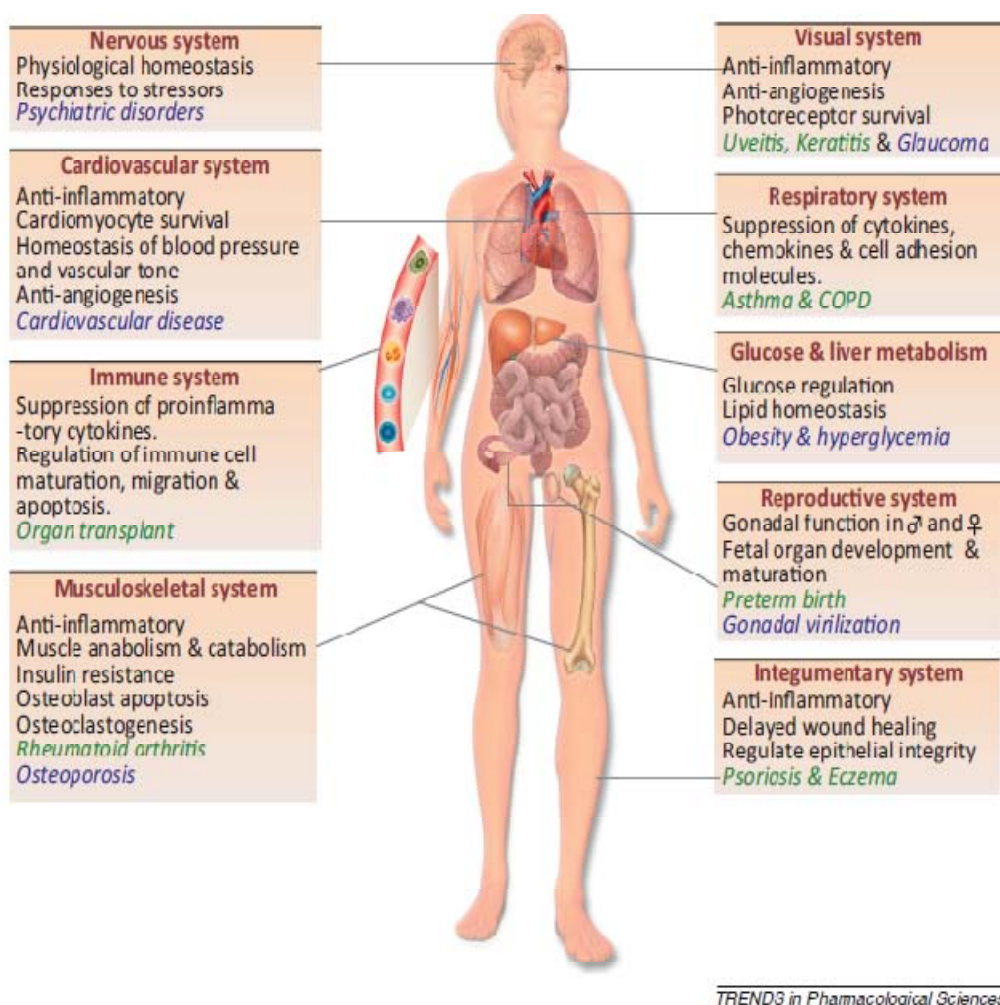
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis). Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε κυκλικά ρύθμιση από τον περικοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Η ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH), που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο διεγείρει την απελευθέρωση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει την σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από το φλοιό των επινεφριδίων στο αίμα. Στο αίμα, η μεγαλύτερη ποσότητα της κορτιζόλης παραμένει δεσμευμένη στις σφαιρίνες του πλάσματος. Η βιολογικά ενεργή μορφή του γλυκοκορτικοειδούς είναι η αδέσμευτη από σφαιρίνες κορτιζόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί στην αδρανή μορφή της, την κορτιζόνη, από τον τύπο 2 της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης. Ο τύπος 1 της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης καταλύει την αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη. Η ομοιοστάση στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών διατηρείται μέσω του βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης που ενεργοποιείται όταν παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της ACTH στην πρόσθια υπόφυση και της CRH στον υποθάλαμο (Cidlowski, 2013).

Γενικά, οποιαδήποτε αδυναμία ρύθμισης των επιπέδων των GCs από τον οργανισμό, όπως είναι η χρόνια αύξηση των επιπέδων ή ανεπάρκεια, συνδέεται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων -νόσος Cushing και Addison, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τον φυσιολογικό τους ρόλο, τα γλυκοκορτικοειδή είναι κυρίως υπεύθυνα για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Σε πρώτο στάδιο, αυξάνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ενώ όσον αφορά το ήπαρ, η κορτιζόλη αυξάνει τη γλυκονεογένεση κι ενισχύει τη δράση άλλων υπεργλυκαιμικών ορμονών, όπως είναι η γλυκαγόνη, οι κατεχολαμίνες και η αυξητική ορμόνη, πάνω στον καταβολισμό του γλυκογόνου, οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα. Στους σκελετικούς μύες και στον λιπώδη ιστό, η κορτιζόλη αναστέλλει την πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης μέσω παρεμβολής στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Επίσης, η ίδια ορμόνη προκαλεί χάλαση των μυών μέσω της επιβράδυνσης στον αναβολισμό των πρωτεϊνών και επιτάχυνσης του καταβολισμού των πρωτεϊνών, προκαλώντας τελικά αυξημένη απελευθέρωση αμινοξέων. Επιπλέον, η πυροδοτούμενη από την κορτιζόλη διάσπαση των τριγλυκεριδίων σε λιπώδεις ιστούς καταλήγει τόσο σε περεταίρω αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όσο και σε ενίσχυση της παροχής ενέργειας και υποστρωμάτων για τη γλυκονεογένεση. Επιπρόσθετα, η αυξημένη ταχύτητα του μεταβολισμού των πρωτεϊνών οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση αζώτου και επαγωγή των ενζύμων του κύκλου της ουρίας. Εκτός από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στον μεταβολισμό, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν καθοριστικά και τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω παρεμπόδισης εμφάνισης και εξέλιξης της φλεγμονής και, γενικότερα, παρεμπόδιση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Όλες αυτές οι ανοσοκατασταλτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-αλλεργικές επιδράσεις των GCs πάνω σε πρωτογενή και δευτερογενή κύτταρα του ανοσοποιητικού, ιστούς και όργανα, σε συνδυασμό με τη μείωση των δυσάρεστων επιπτώσεων διαφόρων σχημάτων χημειοθεραπειών πάνω σε ασθενείς, κατέστησε τα γλυκοκορτικοειδή ικανά να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη συστηματική όσο και για την τοπική θεραπεία (Ortsäter H, 2012).

Με βάση όλα τα παραπάνω, τέθηκε ένα σοβαρό ερώτημα. Μπορούν τα κορτικοστεροειδή, και κατ' επέκταση κάποια γλυκοκορτικοειδή να χρησιμοποιηθούν ως θεραπείες ενάντια στον καρκίνο; Πράγματι, ένας μεγάλος αριθμός GCs έχει αξιοποιηθεί για τις αντι-πολλαπλασιαστικές και αντιο-αγγειογενετικές του ιδιότητες. Για τον ίδιο σκοπό έχει κατασκευαστεί μεγάλος αριθμός συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, όπως είναι η πρεδνιζόνη ή πρεδνιζολόνη, η βουδεσοδίνη και η δεξαμεθαζόνη. Τα συνθετικά GCs διαφέρουν από τα φυσικά GCs όσον αφορά την ισχύ της δράσης τους και την ικανότητα τους να μεταβολίζονται από τον οργανισμό, γι αυτό άλλωστε και χορηγούνται σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που παρατηρούνται κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό. Επιπρόσθετα, τα συνθετικά GCs αδυνατούν να δεσμευτούν με τη σφαιρίνη του πλάσματος, επομένως δεν είναι σε θέση να ρυθμίσουν μόνα τους τα επίπεδα τους στον οργανισμό. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η δεξαμεθαζόνη, η οποία δεν υπόκειται σε απενεργοποίηση από την 11b-HSD2 αυξάνοντας έτσι την τοπική διαθεσιμότητα της (Cidlowski, 2013).

Κλείνοντας την υποενότητα αυτή, δίνεται η **Εικόνα 3** και ο **Πινάκας1**, όπου γίνεται ορατός ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών σε μεγάλα συστήματα οργάνων του ανθρώπινου σώματος, ο ευεργετικός τους ρόλος στην καταπολέμηση διαφόρων παθήσεων και, τέλος, κάποιες από τις δυσμενείς συνέπειες που αυτά προκαλούν στον οργανισμό όταν η συγκέντρωσή τους στον ορό του αίματος διαφέρει από το επιθυμητό.



Εικόνα 3: Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην υγεία και την ασθένεια. Η παραπάνω σχηματική αναπαράσταση αντιπροσωπεύει τους ρόλους των γλυκοκορτικοειδών σε μεγάλα συστήματα οργάνων του ανθρώπινου σώματος (μαύρο κείμενο), τον ευεργετικό ρόλο των γλυκοκορτικοειδών στην κλινική (πράσινο κείμενο), και τις δυσμενείς συνέπειες σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών (μπλε γράμματα) (Cidlowski, 2013).

Πίνακας 1: Ορισμένες τυπικές παρενέργειες σε ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν γλυκοκορτικοειδή σε συγκεκριμένα προσβεβλημένα όργανα [(Ortsäter H, 2012); (Schacke, 2002)].

Ιστός/ Όργανο	Δυσμενείς συνέπειες
Δέρμα	Ατροφία, καθυστέρηση στην επούλωση πληγών
Μύες/ Σκελετός	Οστεοπόρωση, μυϊκή ατροφία/ μυοπάθεια
Οφθαλμός	Γλαύκωμα, Καταράκτης
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	Διαταραχή στη διάθεση, τη συμπεριφορά, τη μνήμη και τη γνωστική λειτουργία
Ενδοκρινικό Σύστημα/ Μεταβολισμός	Δυσλιπιδαιμία, αντοχή στην ινσουλίνη ή/ και δυσανεξία στη γλυκόζη, δυσλειτουργία των β-κυττάρων (ευπαθή άτομα)
Κυκλοφορικό Σύστημα	Υπέρταση
Ανοσοποιητικό Σύστημα	Αύξηση του κινδύνου λοιμώξεων, επαν-ενεργοποίηση ιών
Γαστρεντερικό Σύστημα	Πεπτικό έλκος, παγκρεατίτιδα

1.2 GR- Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

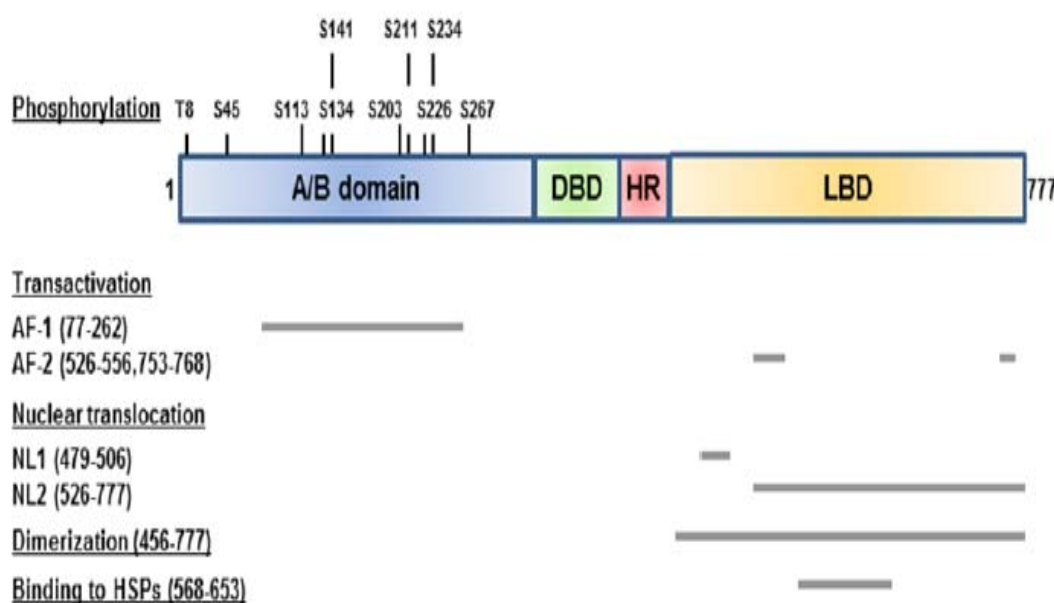
1.2.1 Δομικές πληροφορίες

Τα γλυκοκορτικοειδή, είτε είναι φυσικά είτε είναι συνθετικά, ακούν τις δράσεις τους μετά από πρόσδεση στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, τον GR.

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιείται κατόπιν πρόσδεσης. Ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, και του έχει αποδοθεί διττός ρόλος, αυτός του μεταγραφικού παράγοντα που προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης του γλυκοκορτικοειδούς (GREs) σε πυρηνικό και μεταγραφικό DNA και εκείνος του ρυθμιστή άλλων παραγόντων μεταγραφής [(Ortsäter H, 2012); (Mangelsdorf, 1995); (PsarraAM, 2011)].

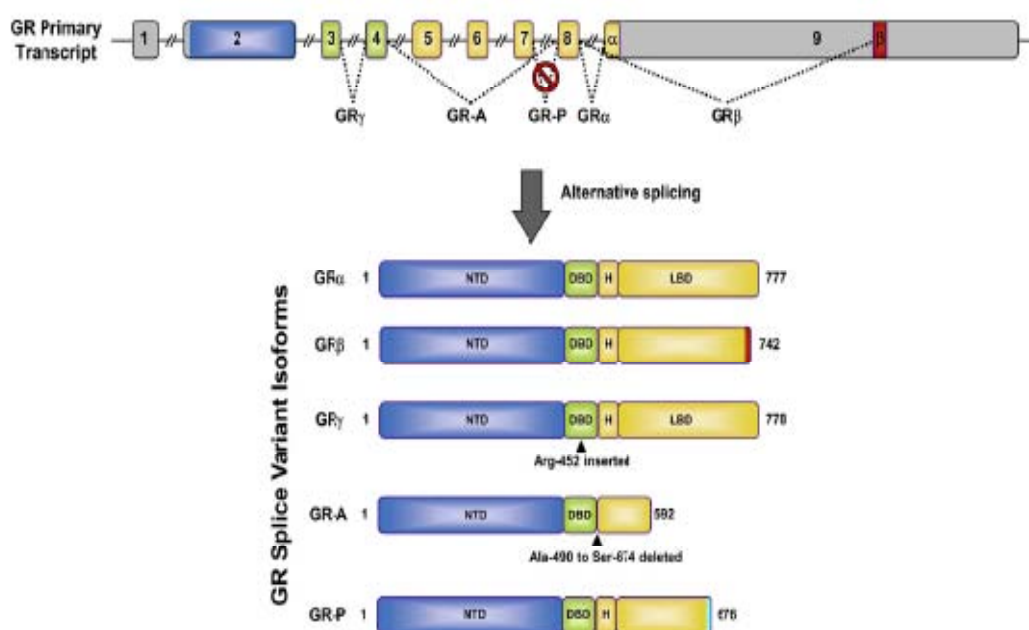
Για τον άνθρωπο, το γονίδιο του GR (hGR, κωδικός για το NCBI NR3C1) αποτελείται από 9 εξόνια, εδράζεται στο 5^ο χρωμόσωμα (περιοχή 5p31-32q), και αποτελείται από διακριτές υπομονάδες. Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, είναι η περιοχή A/B, όπου εμπεριέχεται η ανεξάρτητη από ορμόνη μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης-1 (AF-1). Η AF-1 σε πολλές περιπτώσεις δρα συνεργικά με την εξαρτώμενη από τον υποκαταστάτη AF-2 που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με τον προσδέτη (LBD). Η περιοχή αυτή περιέχει αρκετές θέσεις φωσφορύλωσης και είναι ο στόχος ποικίλων κινάσων σηματοδότησης, όπως είναι οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες

(Cdk). Κεντρικά του υποδοχέα εντοπίζεται το πιο συντηρημένο τμήμα του γονιδίου, η περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με το DNA (DBD), καθώς επίσης και μια εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης (HR). Η DBD, αποτελεί εκείνο το τμήμα του υποδοχέα που εξειδικεύεται για στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs). Η DBD αποτελείται από δύο ιόντα ψευδαργύρου και σχηματίζει σύμπλοκο με 8 κυστεΐνες, σχηματίζοντας έτσι το γνωστό μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου, το οποίο και αλληλεπιδρά με τη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Επιπλέον, στην κεντρική περιοχή βρίσκεται η περιοχή διμερισμού, η οποία σχηματίζει μία έλικα που αντιδρά με την αντίστοιχη περιοχή σε έναν ταυτόσημο υποδοχέα προκειμένου να επέλθει διμερισμός. Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται η LBD, η οποία ξεκινά με την περιοχή αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins, HSP) και τελειώνει με μία δεύτερη AF-2. Η περιοχή αυτή περιέχει, επίσης, αλληλουχίες που διμερισμού και πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα [**Εικόνα 4**] [(Ortsäter H, 2012); (Mitre-Aguilar IB, 2015); (Ma H, 1999)].



Εικόνα 4: Η δομή και οι περιοχές του ανθρώπινου GR (hGR). Ο hGR είναι πρωτεΐνη αποτελούμενη από διακριτές περιοχές. Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, είναι η περιοχή A/B, όπου εμπεριέχεται η ανεξάρτητη από ορμόνη μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης-1 (AF-1). Η AF-1 σε πολλές περιπτώσεις δρα συνεργικά με την εξαρτώμενη από τον υποκαταστάτη AF-2, που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με τον προσδέτη (LBD). Η περιοχή αυτή περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Στη συνέχεια ακολουθεί η περιοχή δέσμευσης με DNA (DBD) και μία εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης (HR). Στο καρβοξυτελικό άκρο είναι η LBD που ξεκινά με τη σημαντική περιοχή αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) και τελειώνει με μια δεύτερη περιοχή μεταγραφικής λειτουργίας ενεργοποίησης-2 (AF-2). Η περιοχή αυτή περιέχει, επίσης, αλληλουχίες διμερισμού και πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα (Ortsäter H, 2012).

Η μεταγραφή του hGR βρίσκεται υπό τον έλεγχο τριών υποκινητών, πάνω στους οποίους εντοπίζονται θέσεις πρόσδεσης ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων. Στο ώριμο mRNA, το εξόνιο 1 κωδικοποιεί για την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR) και τα υπόλοιπα εξόνια (2-9) κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR). Εναλλακτικό μάτισμα του hGR [*Εικόνα 5*] στο ένατο και τελευταίο εξόνιο οδηγεί στο σχηματισμό δύο ομόλογων ισομορφών του υποδοχέα, που ονομάζονται α (hGRα) και β (hGRβ). Αυτές είναι πανομοιότυπες μέχρι το 727^ο αμινοξύ, όμως στη συνέχεια διαφοροποιούνται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, με την α ισομορφή να αποκτά 50 επιπλέον αμινοξέα (MB_{hGRα}=97kDa) και την β ισομορφή να αποκτά 15 πρόσθετα, μη ομόλογα αμινοξέα (MB_{hGRβ}=94kDa).



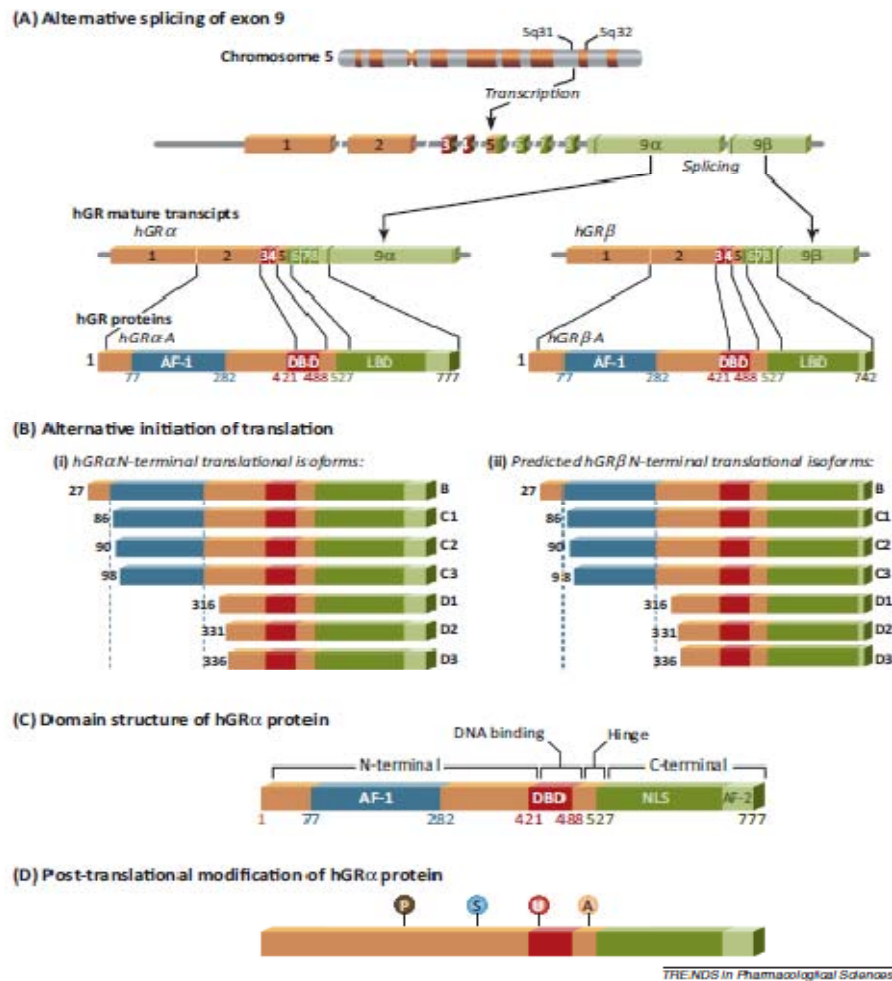
Εικόνα 5: Οι ισομορφές του hGR που δημιουργούνται μετά από εναλλακτικό μάτισμα. Το αρχικό μετάγραφο του hGR αποτελείται από 9 εξόνια, με το εξόνιο 2 να κωδικοποιεί για το μεγαλύτερο μέρος της NTD, τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν την DBD και τα εξόνια 5-9 να κωδικοποιούν για την εύκαμπτη περιοχή (H) και την LBD. Η hGRα προκύπτει από τομάτισμα του εξονίου 8 μέχρι την αρχή του εξονίου 9. Η hGRβ παράγεται από μία εναλλακτική θέση έναρξης ματίσματος, η οποία συνδέει το άκρο του εξονίου 8 με τις καθοδικές αλληλουχίες του εξονίου 9. Με αυτόν τον τρόπο, προκύπτει ένα εναλλακτικό μετάγραφο με ένα μοναδικό καρβοξυτελικό άκρο μήκους 15αα (θέσεις 728 έως 742). Ο hGRγ προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στην αλληλουχία του εσωνίου που διαχωρίζει τα εξόνια 3 και 4, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας πρωτεΐνης στην οποία έχει εισαχθεί μία αργινίνη (Arg-452) μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου της DBD. Η hGR-Α παράγεται από εναλλακτικό μάτισμα που συνδέει το εξόνιο 4 έως το εξόνιο 8, και κατόπιν διαγραφής των γειτονικών 185αα της LBD (Ala-490-Ser-674) που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 5-7. Ο hGR-P προκύπτει μετά από ένα μη επιτυχημένο μάτισμα του εξονίου 7 στο εξόνιο 8. Η αλληλουχία ιντρονίων που εξακολουθεί να υπάρχει, εισάγει ένα κωδικόνιο τερματισμού, οδηγώντας στον σχηματισμό ενός μεταγράφου του υποδοχέα από το οποίο λείπει η μισή LBD (OakleyRH, 2011).

Η hGRα, είναι η επικρατούσα μορφή του hGR, αφού είναι η ισομορφή εκείνη που συνδέεται με τα γλυκοκορτικοειδή στο διαλυτό κυταρόπλασμα, μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου στρατολογεί διάφορους συμπαράγοντες και ασκεί τελικά τη δράση της. Αντίθετα, η hGRβ βρίσκεται σε μόνιμη βάση στον πυρήνα όπου δρα ως φυσικός αναστολέας της hGRα. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί πως η hGRβ ρυθμίζει τις λειτουργίες των γονιδίων που δεν υπόκεινται σε ρύθμιση από την hGRα, αποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο την ανεξάρτητη δράση της δεύτερης ισομορφής σε σχέση με την πρώτη. Αξίζει να αναφερθεί, πως παρόλο που δεν έχει παρατηρηθεί ικανότητα δέσμευσης γλυκοκορτικοειδών στην hGRβ, ο συνθετικός ανταγωνιστής γλυκοκορτικοειδών RU486 (Μιφεπριστόνη) πιθανολογείται πως δεσμεύεται σε αυτήν και ρυθμίζει την μεταγραφική της ενεργότητα, γεγονός που παρατηρείται ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη της hGRα. Όσον αφορά το τελευταίο, παρουσία της hGRα παρατηρείται αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα της hGRα από τον αναστολέα.

Μέσω εναλλακτικής θέσης έναρξης της μετάφρασης του αντίστοιχου mRNA της hGRα ισομορφής μπορούν να προκύψουν οκτώ επιπλέον ισομορφές του GR. Οι ισομορφές αυτές χαρακτηρίζονται από αμινοτελικά άκρα τα οποία έχουν υποστεί κοπή, και συναντώνται βιβλιογραφικά με τις εξής ονομασίες: GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, και GRα-D3. Αντίστοιχα, για τον hGRβ είναι δυνατόν μέσω εναλλακτικής θέσης έναρξης της μετάφρασης του αντίστοιχου mRNA να προκύψουν με αυτόν τον τρόπο 8 β ισομορφές. Όλες οι hGRα ισομορφές διέπονται από παρόμοια δεσμευτική ικανότητα για GCs και αλληλεπίδρασης με GREs. Το γεγονός που προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το εξής: οι ισομορφές GRα-C είναι οι πλέον βιολογικά ενεργές, σε αντίθεση με τις GRα-D ισομορφές, οι οποίες είναι οι λιγότερο λειτουργικές. Αυτό συμβαίνει επειδή, η GRα-D ισομορφή βρίσκεται ιδιосύστατα στον πυρήνα και δεσμεύεται σε ορισμένα μόνο GREs, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους. Παρακάτω, δίνεται η **Εικόνα 6**, όπου συνοψίζονται όλα όσα έχουν περιγραφεί παραπάνω.

Οι υπόλοιπες ισομορφές του hGR, δηλαδή οι GR-γ, GR-A, και GR-P, έχουν χαρακτηριστεί σε πολύ μικρότερο βαθμό κι έχουν συσχετιστεί με μηδαμινή απόκριση απέναντι στα γλυκοκορτικοειδή.

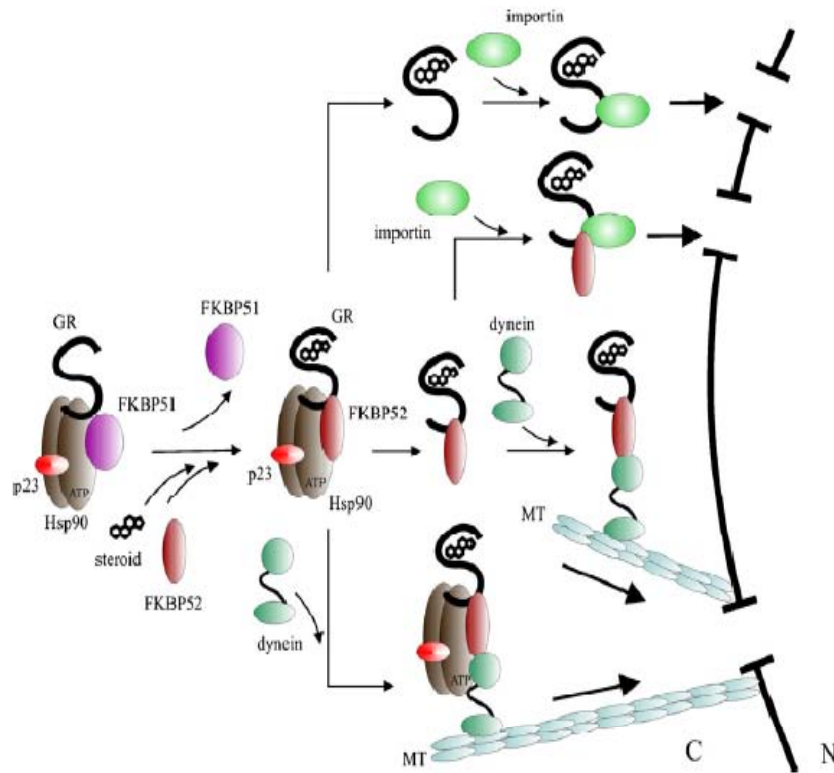
Σε κάθε περίπτωση, όμως, ευρεία κατανομή στους ιστούς όλων των πιθανών ισομορφών του GR έχει οδηγήσει στο καλύτερο για τον οργανισμό αποτέλεσμα της GR σηματοδότησης, βάση πάντα της σχετικής διαθεσιμότητας τους σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο ή ιστό [(Ortsäter H, 2012); (Ma H, 1999); (Weinberger C, 1986); (Hollenberg SM, 1986); (Oakley RH, 2011)].



Εικόνα 6: Θέση στο γονιδίωμα κι οργάνωση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR). Το γονίδιο του hGR εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q31-32. (A) Ο GR υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα αποδίδοντας έτσι πλήθος λειτουργικών διακριτών υπότυπων. Ο GR περιέχει 9 εξόνια, με τα εξόνια 2-9 να κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη. Το εξόνιο 1 αποτελεί την 5'αμετάφραστη περιοχή (5'UTR). Εναλλακτικό μάτισμα του hGR δημιουργεί τις hGRα και hGRβ ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στα C άκρα τους. (B) Η ισομορφή hGRα μέσω εναλλακτικής θέσης έναρξης της μετάφρασης στο εξόνιο 2 οδηγεί στη δημιουργία 8 επιπλέον ισομορφών του GR με κομμένα N-τελικά άκρα (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, και GRα-D3). Από την hGRβ επίσης προκύπτουν 8 επιπλέον ισομορφές, όπως ακριβώς συμβαίνει και με την hGRα (C). Ο GR είναι πρωτεΐνη αποτελούμενη από διακριτές υπομονάδες. Περιέχει ένα N-τελικό άκρο διενεργοποίησης (NTD), μία κεντρική περιοχή σύνδεσης με DNA (DBD), μία περιοχή σύνδεσης με συνδέτη (LBD), και μία εύκαμπτη περιοχή (Hinge) που χωρίζει το DBD από το LBD. Το NTD έχει μια ισχυρή μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης (AF1) που επιτρέπει την πρόσληψη συμπαραγόντων και της μεταγραφικής συσκευής. Τα γλυκοκορτικοειδή δεσμεύονται στον υδρόφοβο θύλακα της LBD, προκαλώντας την ενεργοποίηση της δευτέρας μεταγραφικής λειτουργίας ενεργοποίησης (AF2), που βρίσκεται στο ίδιο το LBD, και την αλληλεπίδρασή της, τελικά, με διάφορους συμπαραγόντες. Η DBD/Hinge και η LBD περιέχουν η κάθε μια ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού που επιτρέπει τη μετατόπιση στον πυρήνα. (D) Ο GR υπόκειται σε πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένων φωσφορυλίωσης (P), σήμανση με μικρές πρωτεΐνες ουβικουΐνης που σχετίζονται με σουμουλίωση (S), ουβικιτινίωση (U), και ακετυλίωση (A) (Cidlowski, 2013).

1.2.2 Μηχανισμός GR σηματοδότησης

Απουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αποτελώντας μέρος ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με ποικίλες πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς, όπως η Hsp90 (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Η μεταφορά του GR στον πυρήνα. Απουσία συνδέτη, το σύμπλοκο GR-Hsp90 βρίσκεται συνδεδεμένο με την ανοσοφιλίνη FKBP51. Αμέσως μετά την πρόσδεση της ορμόνης, παρατηρείται αντικατάσταση της FKBP51 από την FKBP52. Η συνεργική δράση της FKBP52 με τη δυνεΐνη έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του συμπλόκου GR-Hsp90 στους μικροσωληνίσκους για τη μεταφορά προς τον πυρήνα. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό αν σε αυτά τα σύμπλοκα μεταφοράς εξακολουθεί να είναι παρούσα η Hsp90 ή αν η συνδεδεμένη με τον GR FKBP52 συνδέεται με τη δυνεΐνη και τους μικροσωληνίσκους, χωρίς την Hsp90. Εναλλακτικά, ο GR μόνος του ή σε σύμπλοκο με την FKBP52 μπορεί να δεσμεύεται σε ιμφορτίνες και να μεταφέρεται μέσω των πυρηνικών πόρων. (MT: μικροσωληνίσκος, C: κυτταρόπλασμα, N: πυρήνα.) (Grad I, 2007).

Γενικά, η μοίρα του GR είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς, γεγονός που παρατηρείται από τη στιγμή της σύνθεσής του και διαρκεί μέχρι την αποσύνθεση του υποδοχέα. Μεταξύ όλων των συνοδών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις διάφορες φάσεις της ζωής του υποδοχέα, δύο από αυτές ξεχωρίζουν: η Hsp70 και η Hsp90. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, αν και είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικές, υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στον οργανισμό και συμμετέχουν σε πληθώρα λειτουργιών, ξεκινώντας από την αναδίπλωση και καταλήγοντας στην μεταγωγή σήματος. Η Hsp70 δεσμεύει μικρά υδρόφοβα πεπτίδια και βοηθά στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων. Αντίθετα, η Hsp90 δεσμεύει πρωτεΐνες που ήδη έχουν

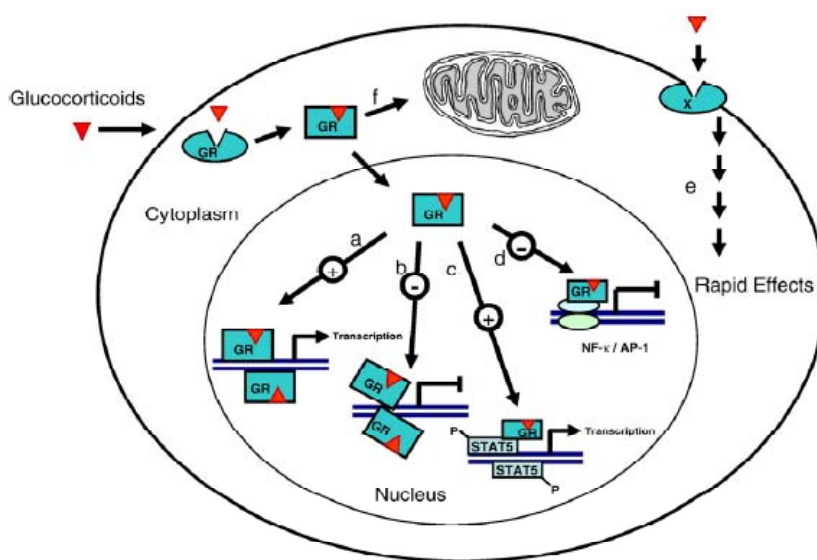
υποστεί πλήρη ή μερική αναδίπλωση και τις βοηθά να αποκτήσουν ή να διατηρήσουν την ενεργή τους κατάσταση (Grad I, 2007).

Στον **Πίνακα 2** που ακολουθεί δίνονται οι πρωτεΐνες μοριακές συνοδοί οι λειτουργίες των οποίων επηρεάζουν κάποιο ή κάποια από τα στάδια της ζωής του GR και τα χαρακτηριστικά τους. Όσον αφορά τον πίνακα αυτόν, να σημειωθεί πως ο κατάλογος των μοριακών συνοδών που βρίσκονται σε στενή συνεργασία με τον GR ανανεώνεται κι εμπλουτίζεται μέρα με τη μέρα.

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας των μοριακών συνοδών που επηρεάζουν κάποιο ή κάποια από τα στάδια ζωής του GR και τα χαρακτηριστικά τους. Στον πίνακα αναγράφονται τα εξής: συντομογραφία, πλήρες όνομα και τα χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης. Τροποποιημένος πίνακας από Grad I, 2007.

Συντομογραφία	Πλήρες Όνομα	Χαρακτηριστικά
Hsp90	Heat-shock protein 90	Μοριακή συνοδός που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης
Hsp70, Hsc70	Heat-shock protein 70	Μοριακή συνοδός που εμπλέκεται στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης
Hsp40	Heat-shock protein 40	Συν- συνοδός της Hsp70:ενεργοποιεί τη δράση της Hsp70 ATPάσης
Hop, p60	Hsp70–Hsp90 organizing protein	Συνδέει τις Hsp70 και Hsp90 μέσω των πολλαπλών TRR περιοχών
Hip, p48	Hsp70 interacting protein	Συν-συνοδός της Hsp70: σταθεροποιεί το σύμπλοκο Hsp70-ADP & παρατείνει την αλληλεπίδραση του με τον GR
Bag-1, Hap46, RAP46		Συν-συνοδός της Hsp70: ενεργοποιεί την ανταλλαγή του ADP με ATP & την απελευθέρωση του GR
p23, cPEGS3, tebp	Hsp90 co-chaperone p23; cytosolic prostaglandin E2 synthase; telomerase-binding protein p23	Συν-συνοδός της Hsp90: σταθεροποιεί το σύμπλοκο ATP-δεσμευμένου Hsp90 και την πρόσδεση του GR
Aha1		Συν-συνοδός της Hsp90: διεγείρει την Hsp90 ATPάση
FKBP51, FKBP52	FK506-binding proteins 51 and 52	Συν-συνοδοί της Hsp90: περιέχουν μία περιοχή πεπτιδυλο-προλυλο-ισομεράσης

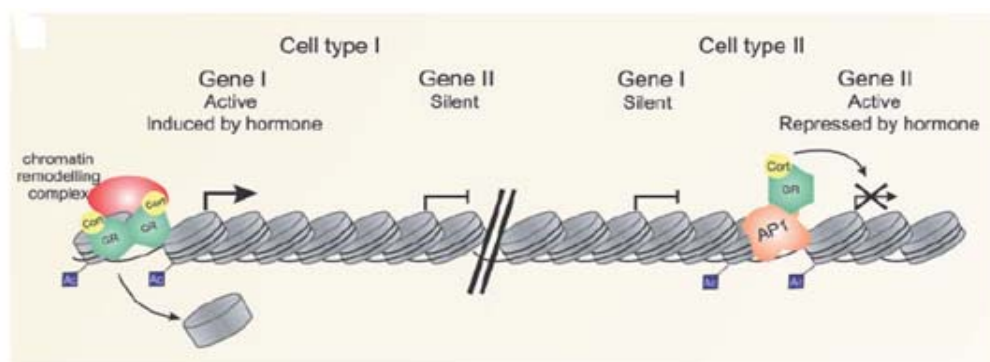
Παρουσία γλυκοκορτικοειδούς, ο GR διαχωρίζεται από κάποιες μοριακές συνοδούς με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο, διμερίζεται και μεταφέρεται τελικά στον πυρήνα, όπου και ασκεί την πλειονότητα των δράσεων του. Αυτός ο τύπος δράσης ονομάζεται γενωμικός, με σημαντικότερους του μηχανισμούς την ενεργοποίηση και καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Επιπλέον, είναι αποδεδειγμένο πως η GR σηματοδότηση μπορεί να ακολουθήσει μία εναλλακτική οδό, ταχύτερη αλλά λιγότερο αποτελεσματική, την μη-γενωμική. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται ενεργοποίηση μονοπατιών σήματος όπως αυτά που συνδέονται με G πρωτεΐνες είτε από κυτταροπλασματικό GR ή από δεσμευμένο στην μεμβράνη GR [Εικόνα 8]. Τέτοιου είδους ταχείες αποκρίσεις έχουν διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και καρδιαγγειακού συστήματος [(Psarra AM, 2008); (Collingwood TN, 1999); (Kino T, 2005); (Ayroldi E, 2012); (Lee SR, 2012); (Jiang CL, 2014); (Schäcke H, 2007); (Morimoto RI., 2002)].



Εικόνα 8: Μηχανισμοί δράσης των στεροειδών ορμονών, στην εικόνα δίνεται το παράδειγμα των γλυκοκορτικοειδών. Οι στεροειδείς ορμόνες, μέσω της πρόσδεσής τους σε συγγενείς υποδοχείς και την αλληλεπίδρασή τους τα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (HREs), μπορούν (a) να ενεργοποιήσουν ή (b) να καταστείλουν τη μεταγραφή του γονιδίου στόχου. Μέσω της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, η ορμόνη μπορεί (c) ενεργοποιήσει ή (d) εμποδίσει τη μεταγραφή του γονιδίου στόχου του αντίστοιχου μεταγραφικού παράγοντα. Η ορμόνη μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε ταχείες, μη γονιδιωματικές επιδράσεις (e) με τις κλασικές μορφές του υποδοχέα, με υποδοχείς σε συνδυασμό με τη δράση G-πρωτεϊνών ή ακόμη μέσω αγνώστων μορίων και μηχανισμών μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μέσω της αλληλεπίδρασης με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. GR: υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, NF-κB: Nuclear Factor κB, AP-1:Ενεργοποιητής Πρωτεΐνη-1, STAT5: μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 5 (Psarra AM, 2008).

Επειδή, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η γενωμική δράση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, παρακάτω δίνεται αναλυτικά ο μηχανισμός δράσης του GR μέσω αυτής της οδού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο GR δρα ρυθμίζοντας είτε θετικά είτε αρνητικά την μεταγραφή κάποιου γονιδίου στόχου.

Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή στην περίπτωση της *επαγωγής*, το διμερές του GR προσδένεται άμεσα στο DNA, μετά από αναγνώριση συγκεκριμένου τμήματος του εκάστοτε γονιδίου. Το τμήμα αυτό είναι γνωστό ως GRE αποτελεί μία αλληλουχία DNA με ελλειπείς παλινδρομικές αλληλουχίες. Εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή ή του ενισχυτή του γονιδίου και περιέχει δύο μισές εξαμερείς περιοχές οι οποίες διαχωρίζονται από τρία ζεύγη βάσεων. Από αυτές, μόλις το 1/3 είναι συντηρημένο, ενώ τα υπόλοιπα 2/3 διαφέρουν, χαρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πολυπλοκότητα στην αλληλουχία του DNA εσωτερικά του GRE που οδηγεί στην διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα του GR (Meijnsing SH, 2009). Στην βιβλιογραφία αναφέρονται τρεις κατηγορίες GREs: τα απλά, τα σύνθετα και τα προσδεδεμένα (tethering) GREs, γεγονός που υποδηλώνει διαφορές στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της κάθε ομάδας. Οι δύο πρώτες ομάδες, τα απλά και σύνθετα GREs δηλαδή, απαιτούν διμερισμό του υποδοχέα και άμεση πρόσδεση πάνω στο DNA (Lefstin JA, 1998). Αμέσως μόλις επιτευχθεί η πρόσδεση αυτή, ο GR στρατολογεί τους συν-παράγοντες εκείνους που συμμετέχουν στην τροποποίηση της χρωματίνης και την μεταγραφική συσκευή, συμπεριλαμβανομένου της RNA πολυμεράσης II (Pol II) για την έναρξη της μεταγραφής. Η πρόσληψη των συν-παραγόντων αυτών, όπως του Brg1, ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT) CBP/p300 και άλλων μελών της οικογένειας των p160 πρωτεϊνών- όπως οι SRC1 και PGC- από τον GR μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης κάνοντας την προσιτή στην επικείμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου [*Εικόνα 9*]. Παραδείγματος χάρη, η δράση του συν-παραγόντα Brg-1 πιστεύεται πως μεταβάλλει την τοποθέτηση και την σύνθεση των νουκλεοσωμάτων, ενώ οι ακετυλοτρανσφεράσες (HATs) προκαλούν ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί, πιστεύεται πως μεταβάλλουν τις επαφές μεταξύ DNA και νουκλεοσωμάτων, κάνοντας το DNA ευάλωτο στη δέσμευση με κάποιον ρυθμιστικό παράγοντα (Biddie SC, 2012).



Εικόνα 9: Ειδικές δράσεις του GR σε επίπεδο κυττάρου και γονιδίου. Η προσβασιμότητα της χρωματίνης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στη σύνδεση του υποδοχέα με τη χρωματίνη. Τα ενεργά γονίδια φαίνεται πως έχουν προσβάσιμο DNA και ακετυλιωμένες (Ac) ιστόνες. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον GR απαιτούν ομοδιμερή που προσδένονται απευθείας στο DNA στα GREs. Η ορμόνη-εξαρτώμενη καταστολή του γονιδίου μπορεί να διαμεσολαβείται από την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση ομομερών GR με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο AP1. Τροποποιημένη εικόνα από Biddie SC, 2012.

Να αναφερθεί πως σε αντίθεση με το κλασικό μοντέλο σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων πάνω στο DNA όπου παρατηρείται ο σχηματισμός σταθερών συμπλόκων, στην περίπτωση του GR παρατηρείται μία παροδική δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων πάνω στη χρωματίνη, η οποία αποδεδειγμένα διαρκεί από δευτερόλεπτα έως λεπτά. Ο GR δρα εξαιρετικά γρήγορα και απαγκιστρώνει το εκμαγείο που έχει σχηματιστεί γύρω από τη χρωματίνη, ενώ την ίδια στιγμή η χρωματίνη που έχει αναδιαμορφωθεί από τον Brg-1 υφίσταται δυναμική ανταλλαγή [(Biddie SC, 2012); (Lefstin JA, 1998); (Schlossmacher G, 2011); (McNally JG, 2000); (Nagaich AK, 2004); (Fletcher TM, 2002)].

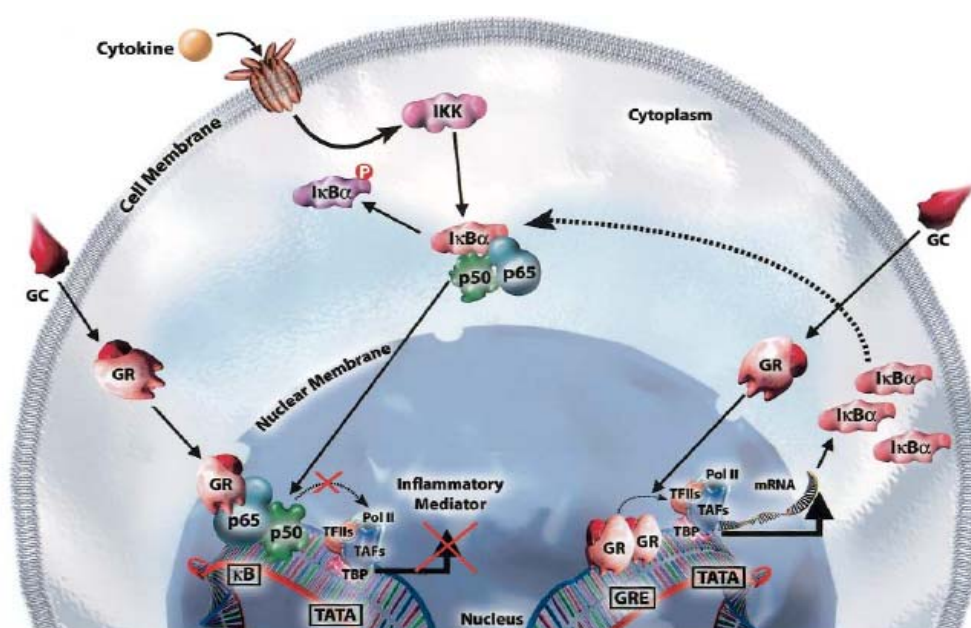
Στην περίπτωση των προσδεδωμένων (tethering) GREs παρατηρείται ένας εναλλακτικός μηχανισμός ενεργοποίησης. Στην οδό αυτή, η αλληλεπίδραση με το DNA μέσω της βοήθειας μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο STAT5, ενώ αξίζει να σημειωθεί, πως μέσω αυτής της οδού ενεργοποίησης, δεν είναι απαραίτητος ο διμερισμός του υποδοχέα προκειμένου να επέλθει ενεργοποίηση [(Schäcke H, 2007); (Schlossmacher G, 2011)].

Κλείνοντας το θέμα του μηχανισμού ενεργοποίησης να αναφερθεί πως, εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην περιοχή διμερισμού του υποδοχέα, απέδειξε *in vitro* πως απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας πολλών εξαρτώμενων από GCs γονιδίων είναι ο διμερισμός του GR (Schäcke H, 2007). Πειραματόζωα, ειδικότερα ποντίκια, που έφεραν την μετάλλαξη αυτή, παρουσίαζαν αισθητά μειωμένα επίπεδα ενεργοποιημένων από GR ηπατικών γονιδίων (Reichardt HM, 1998). Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί πως ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων εξακολουθεί να επάγεται ακόμα και παρουσία ενός μεταλλαγμένου στην περιοχή διμερισμού υποδοχέα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών ενεργοποίησης, ενδεχομένως μέσω των AF-1 και AF-2 περιοχών του υποδοχέα (Hudson WH, 2013).

Όμοια με τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της μεταγραφής, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών διαθέτει μηχανισμούς καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής. Η καταστολή επέρχεται μετά από πρόσδεση του υποδοχέα σε αρνητικά GREs (negative GREs, nGREs). Τα στοιχεία αυτά διαφέρουν από τα κλασικά GREs που συναντώνται στους μηχανισμούς ενεργοποίησης τόσο δομικά- αποτελούν ανάστροφες αλληλουχίες με ένα ενδιάμεσο κενό μήκους 0-2bp- όσο και λειτουργικά. Τα στοιχεία αυτά είναι διάσπαρτα στις περιοχές κοντά στον υποκινητή. Η πρόσδεση του υποδοχέα πάνω στα nGREs ακολουθείται από άμεση στρατολόγηση συν-καταστολέων, όπως είναι οι NCoR και SMRT, οι οποίοι με τη σειρά τους στρατολογούν αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Με αυτόν τον τρόπο η χρωματίνη αποκτά πλέον μία κλειστή δομή που δεν ευνοεί την μεταγραφή. Εναλλακτικά, είναι δυνατή η πρόκληση καταστολής μέσω DNA αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ακριβώς συμβαίνει στην περίπτωση της μεσολαβούμενης από γλυκοκορτικοειδή αναστολή της έκφρασης του γονιδίου της κορτικοτροπίνης [(Schlossmacher G, 2011); (Hudson WH, 2013); (Dostert A, 2004); (Perissi V, 2010)].

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ελάχιστα γονίδια φαίνεται πως καταστέλλονται βάσει του μηχανισμού που μόλις περιγράφηκε. Ωστόσο, παραμένει ασαφής η συνεισφορά αυτού του είδους αρνητικής ρύθμισης στο σύνολο των αντιφλεγμονωδών δράσεων που παρατηρούνται σε έναν οργανισμό και στην πρόκληση διαφόρων παρενεργειών (Schäcke H, 2007).

Ο κύριος μηχανισμός καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής βασίζεται στην ικανότητα του υποδοχέα να καταστέλλει τη δράση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων όντας προσδεδεμένος πάνω σε αυτούς. Να σημειωθεί πως, ο μηχανισμός αυτός είναι πλήρως λειτουργικός ακόμα και παρουσία GR που φέρει μετάλλαξη στην περιοχή διμερισμού, γεγονός που υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσω GR μονομερών. Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων στους οποίους προσδένεται ο GR, είναι ο NF-κΒ (nuclear factor-κΒ), ο IRF3 (interferon regulatory factor 3) και ο AP-1 (activator protein 1). Όσον αφορά την καταστολή του NF-κΒ, αυτή γίνεται μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης της σερίνης 2 σε μία από τις δύο περιοχές του καρβοξυτελικού άκρου της RNA πολυμεράσης II από τον υποδοχέα, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής (Schäcke H, 2007) ή μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων GR και NF-κΒ [Εικόνα 10].



Εικόνα 10: Η GR διαμεσολαβούμενη καταστολή της δράσης του NF-κΒ. Σε ανενεργή κατάσταση, ο NF-κΒ έχει τη μορφή ετεροδιμερούς αποτελούμενος από τις υπομονάδες p65 και p50 κι είναι αγκυροβολημένος στο κυτταρόπλασμα από τον παράγοντα IκΒα. Σήματα ενεργοποίησης μέσω υποδοχών της κυτταρικής επιφάνειας έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της IκΒ κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα IκΒα. Μετά τη φωσφορυλίωση, ο IκΒα υφίσταται πρωτεολυτική αποδόμηση, και το ετεροδιμερές NF-κΒ p65/p50 είναι ελεύθερο να περάσει μέσα στον πυρήνα, όπου συνδέεται στις B περιοχές του υποκινητή φλεγμονωδών γονιδίων που παίζουν ρόλο μεσολαβητή, κι ενισχύει τη μεταγραφή. Ο GR μπορεί να εμποδίσει τη δράση του NF-κΒ μέσω 2 μηχανισμών. Αναστολή μπορεί να προκύψει μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδότη-ενεργοποιημένου GR και του NF-κΒ. Ένας δεύτερος λιγότερο πιθανός μηχανισμός για GR-διαμεσολαβούμενη καταστολή του NF-κΒ είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου IKBA από τον GR. Η ενισχυμένη σύνθεση του IκΒα αντικαθιστά το αποικοδομημένο IκΒ και εξουδετερώνει τον ελεύθερο NF-κΒ (Leung DY, 2003).

Ο NF-κB, αρχικά, χαρακτηρίστηκε και στη συνέχεια απέκτησε τη συγκεκριμένη ονομασία από την ικανότητα του να ρυθμίζει την κ ανοσοσφαιρινική αλυσίδα στα B κύτταρα. Είναι ετεροδιμερές μιας υπομονάδας 50kDa, της NFκB1 (p50) και μίας δεύτερης υπομονάδας 65kDa, της RelA (p65). Όπως φαίνεται και στην εικόνα σε ανενεργή κατάσταση, ο NF-κB έχει τη μορφή ετεροδιμερούς αποτελούμενος από τις υπομονάδες p65 και p50 κι είναι αγκυροβολημένος στο κυτταρόπλασμα από τον παράγοντα IκBa. Σήματα ενεργοποίησης μέσω υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας οδηγούν στην ενεργοποίηση της IκB κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα IκBa. Μετά τη φωσφορυλίωση, ο IκBa υφίσταται πρωτεολυτική αποδόμηση, και το ετεροδιμερές NF-κB p65/p50 περνά στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου συνδέεται στις B περιοχές του υποκινητή φλεγμονωδών γονιδίων. Στην φάση αυτή, ο NF-κB παίζει ρόλο μεσολαβητή κι ενισχύει τη μεταγραφή. Ο GR μπορεί να εμποδίσει τη δράση του NF-κB μέσω δύο μηχανισμών. Αναστολή μπορεί να προκύψει μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη-ενεργοποιημένου GR και του NF-κB. Ένας δεύτερος λιγότερο πιθανός μηχανισμός της GR-διαμεσολαβούμενης καταστολής του NF-κB είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου IKBA από τον GR. Η ενισχυμένη σύνθεση του IκBa αντικαθιστά το αποικοδομημένο IκB και εξουδετερώνει τον ελεύθερο NF-κB (Leung DY, 2003).

Όπως γίνεται κατανοητό, όμοια δράση με τους φυσικούς προσδέτες του GR, τα γλυκοκορτικοειδή δηλαδή, έχουν και ορισμένα συνθετικά. Παραδείγματος χάρη, η ικανότητα της δεξαμεθαζόνης να καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίου της p65 υπομονάδας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η υπομονάδα αυτή αποδεδειγμένα παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω πρόσδεσης του στα GREs. Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η δεξαμεθαζόνη και ο GR παρεμποδίζουν την πρόσδεση των υπομονάδων p65 και p50 στο DNA, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της φλεγμονής. Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν διάφορες καρκινικές σειρές. Ειδικότερα, στη HeLa κυτταρική σειρά, η ενεργοποίηση του ενδογενούς GR μπορεί να καταστείλει την ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNFα και την IL-1 τόσο όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσής του πάνω στο DNA όσο και στο επίπεδο έναρξης της μεταγραφής του γονιδιώματος του. Επιπλέον, χορήγηση δεξαμεθαζόνης στα ίδια κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα σημαντικής μείωσης των επιπέδων της πυρηνικής p65 υπομονάδας κι ελαφριά αύξηση της κυτταροπλασματικής (Scheinman RI, 1995). Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν και σε πειράματα με την L-929 κυτταρική σειρά (ινοβλάστες ποντικού). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά πρότειναν άλλον έναν μηχανισμό μέσω του οποίου η δεξαμεθαζόνη μπορεί να καταστείλει τη δράση του NF-κB. Προτείνεται, πως η DEX ενισχύει την παραγωγή του ανασταλτικού μορίου IκB, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύει και αφαιρεί από τον πυρήνα του κυττάρου τα ενεργοποιημένα και δεσμευμένα στο DNA σύμπλοκα του NF-κB. Επίσης, βρέθηκε πως η δεξαμεθαζόνη μπορεί και μπλοκάρει τη μεσολαβούμενη από TNF αύξηση των επιπέδων της IL-6, μέσω ενός μηχανισμού που δρα απευθείας πάνω στη εξαρτώμενη από NF-κB μεταγραφή, αφήνοντας αναλλοίωτα τα επίπεδα του IκB (DeBosscher K, 1997).

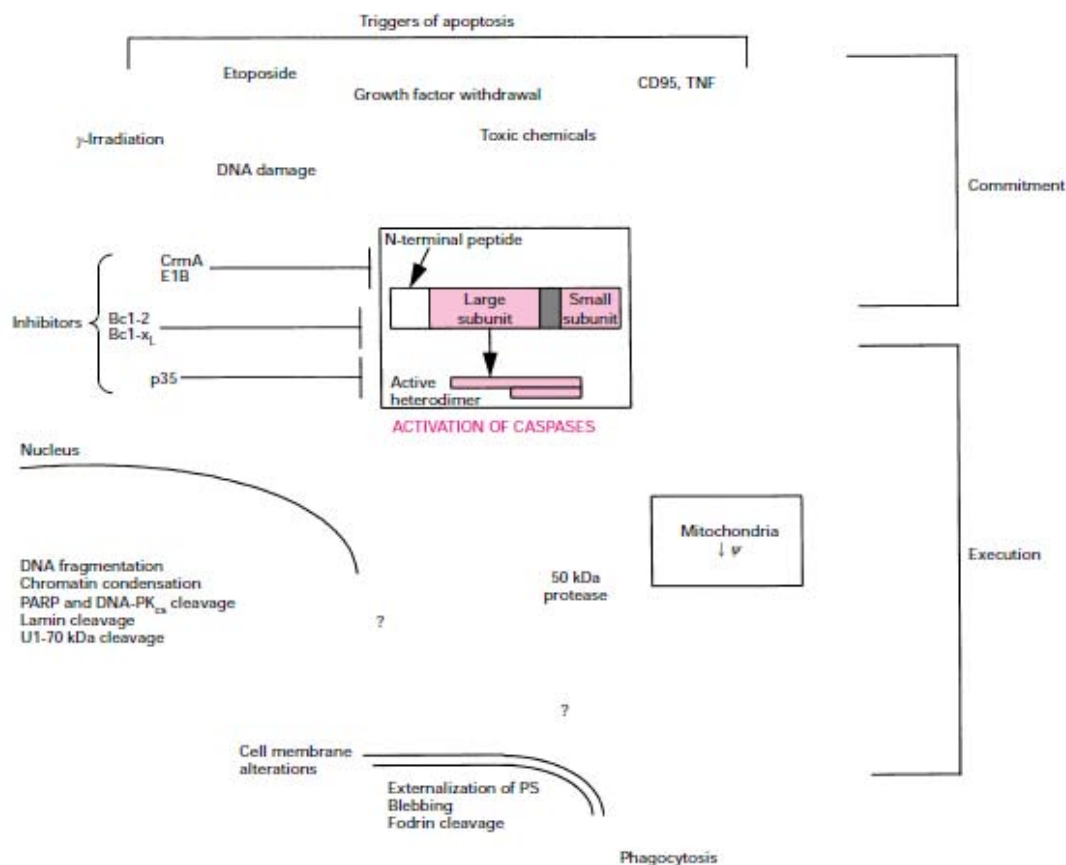
Σε κάθε περίπτωση πολύ σημαντική είναι η επίδραση του περιβάλλοντος όσον αφορά την κατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών πάνω στον NF-κΒ και στον AP-1, καθώς η ευαισθησία στη δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον τύπο του κυττάρου-στόχου αλλά και με την έκφραση-δραστικότητα των προφλεγμονωδών πρωτεϊνών και συν-ρυθμιστών. Παραδείγματος χάρη, υπερέκφραση του AP-1 έχει αρνητική επίδραση πάνω στην κατασταλτική δράση του GR, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι στα γλυκοκορτικοειδή (Jacques E, 2010). Κλείνοντας την υποενότητα αυτή, αξίζει να τονιστεί πως πιθανότατα ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με τους στόχους του μέσω διαφορετικών περιοχών, καθώς μεταλλάγματα τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα τους να καταστέλλουν τη δράση του NF-κΒ εξακολουθούσαν να καταστέλλουν τη δράση του AP-1, ενώ ταυτόχρονα οι μηχανισμοί ενεργοποίησης ήταν πλήρως λειτουργικοί. Όπως γίνεται κατανοητό, η αρνητική ρύθμιση των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων αποτελεί απόδειξη της αντιφλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών (Schäcke H, 2007).

1.3 Απόπτωση& Γλυκοκορτικοειδή

Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος περιλαμβάνει την γενετικά καθορισμένη εξάλειψη των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης κι αποτελεί μηχανισμό ομοιόστασης απέναντι σε οποιαδήποτε πιθανότητα αλλαγής του πληθυσμού των κυττάρων στους ιστούς. Επιπλέον, αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού σε περιπτώσεις ανοσολογικών αντιδράσεων ή καταστροφής των κυττάρων από επιβλαβείς ή παθογόνους παράγοντες. Παρά την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ερεθισμάτων και συνθηκών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών, που μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, δεν πρόκειται όλα τα κύτταρα να ακολουθήσουν αυτή την οδό κάτω υπό την επίδραση του ίδιου ερεθίσματος. Παραδείγματος χάρη, η παρουσία κορτικοστεροειδών μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς- όπως είναι τα θυμοκύτταρα, αλλά να αφήσει ανεπηρέαστους άλλους [(Elmore S., 2007); (Debnath J, 2005)].

Ορισμένα κύτταρα, εκφράζουν στην επιφάνεια τους Fas ή TNF υποδοχείς, οι οποίοι μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση. Κάποια άλλα κύτταρα, έχουν μία προκαθορισμένη μοίρα όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο, η οποία πρέπει να παρεμποδιστεί από τον παράγοντα επιβίωσης- για παράδειγμα από μία ορμόνη ή έναν αυξητικό παράγοντα. Στο σημείο αυτό, θα ήταν χρήσιμο να γίνει διάκριση μεταξύ δύο εννοιών: της απόπτωσης και της νέκρωσης, καθώς είναι δύο διαφορετικές διαδικασίες, ικανές να συμβούν σε ένα κύτταρο ανεξάρτητα, διαδοχικά αλλά και ταυτόχρονα. Συνήθως, το είδος αλλά και η ισχύς του ερεθίσματος καθορίζουν αν θα κύτταρα θα ακολουθήσουν την οδό της απόπτωσης ή της νέκρωσης. Σε χαμηλές δόσεις ένας μεγάλος αριθμός ζημιογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της θερμότητας και

της ακτινοβολίας, μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, αλλά τα ίδια ερεθίσματα σε υψηλότερες δόσεις μπορούν να το οδηγήσουν σε νέκρωση. Με άλλα λόγια, η νέκρωση χαρακτηρίζεται από εκτενή κυτταρική λύση οξέων και μη φυσιολογικών τραυματισμών [(Debnath J, 2005); (Formigli L, 2000)].



Εικόνα 11: Η ενεργοποίηση των κασπασών αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό σημείο ελέγχου στην απόπτωση. Η απόπτωση περιλαμβάνει μια αρχική φάση δέσμευσης που ακολουθείται από μία φάση εκτέλεσης. Η ενεργοποίηση των κασπασών έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στον πυρήνα, στην πλασματική μεμβράνη και στα μιτοχόνδρια. Το τελευταίο περιλαμβάνει την απελευθέρωση μίας πρωτεάσης 50 kDa, η οποία μπορεί να είναι υπεύθυνη για ορισμένες από τις κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με την απόπτωση. W, δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης, PS, φωσφατιδυλοσερίνη (Cohen GM, 1997).

Γυρίζοντας πίσω στο θέμα της απόπτωσης, αξίζει να αναφερθεί πως αποτελεί μια πολύ καλά συντονισμένη διαδικασία και συχνά ενεργειακά εξαρτώμενη διαδικασία, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, γνωστές ως κασπάσες, κι ένα σύνολο γεγονότων που συνδέουν το αρχικό έναυσμα με την τελική λύση του κυττάρου. Στα περισσότερα κύτταρα, οι κασπάσες απαντώνται ως ανενεργά προένζυμα, γνωστά ως προκασπάσες. Αυτά τα ανενεργά προένζυμα περιλαμβάνουν ένα πεπτίδιο στο αμινοτελικό τους άκρο, καθώς επίσης και μία μεγάλη και μία μικρή υπομονάδα. Ενεργοποίηση παρατηρείται μετά από πρωτεόλυση του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο, γεγονός που συντελείται είτε από άλλες κασπάσες ή από τις

ίδιες [*Εικόνα II*]. Με τη σειρά τους, οι ενεργές πλέον κασπάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν άλλες ανενεργές προκασπάσες, ενισχύοντας έτσι το αρχικό αποπτωτικό σήμα και οδηγώντας το κύτταρο σε ταχύ και μη αναστρέψιμο πλέον κυτταρικό θάνατο. Οι κασπάσες που διαθέτουν αυτήν την πρωτεολυτική δράση μπορούν να διασπούν πρωτεΐνες σε υπολείμματα ασπαρτικού οξέος. Ωστόσο, οι κασπάσες διαφέρουν όσον αφορά την ειδικότητα αναγνώρισης των γειτονικών αμινοξέων [(Cohen GM, 1997); (Rai NK, 2005)].

Απόπτωση μπορεί να προκληθεί σε ένα κύτταρο μέσω δύο κυρίως μονοπατιών, τα οποία αποδεδειγμένα πλέον συνδέονται σε βαθμό που η δράση του ενός επηρεάζει το άλλο. Το πρώτο είναι το εξωγενές μονοπάτι ή το μονοπάτι του θανάτου του υποδοχέα και το δεύτερο είναι το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Igney FH, 2002).

Εξωγενές μονοπάτι

Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπερικογένεια του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF). Το συγκεκριμένο μονοπάτι μελετήθηκε με τη βοήθεια των μοντέλων FasL/FasR και TNF- α /TNFR1. Αμέσως μόλις συνδεθεί ο προσδέτης στον υποδοχέα στρατολογούνται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς, οι οποίες κάνουν ορατές τις αντίστοιχες περιοχές «θανάτου» που συνδέονται με τους υποδοχείς. Η πρόσδεση του Fas προσδέτη (FasL) με τον Fas υποδοχέα (FasR) οδηγεί στην πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογέα FADD, και η πρόσδεση του TNF προσδέτη στον TNF υποδοχέα οδηγεί στην πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογέα TRADD και στην στρατολόγηση των FADD και RIP. Στη συνέχεια, ο FADD αλληλεπιδρά με την προκασπάση 8 μέσω διμερισμού της περιοχής «θανάτου» του τελεστή. Στο σημείο αυτό σχηματίζεται στο σύμπλοκο επαγωγής θανάτου DISC (death-inducing signaling complex) οδηγώντας στην αυτό-καταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης 8. Αμέσως μόλις ενεργοποιηθεί η κασπάση 8, ενεργοποιεί με τη σειρά της την κασπάση 3 και ξεκινά η απόπτωση (Hsu H, 1995).

Ενδογενές μονοπάτι

Το ενδογενές μονοπάτι πυροδοτεί απόπτωση μέσω ενός μεγάλου αριθμού ερεθισμάτων, τα οποία μπορούν και δρουν απευθείας στα κύτταρα στόχους χωρίς να είναι αναγκαία η πρόσδεσή τους σε κάποιον υποδοχέα. Τα ερεθίσματα αυτά πηγάζουν από το μιτοχόνδριο και τα σήματα που παράγουν είναι ικανά να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις. Η ύπαρξη ενός αρνητικού σήματος προϋποθέτει την απουσία συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών, προκειμένου να είναι σε θέση να καταστήσει το κύτταρο ανίκανο να καταστείλει την επικείμενη απόπτωση. Μεταξύ των σημάτων με θετική επίδραση συναντώνται η ακτινοβολία, οι τοξίνες, η υποξία, η υπερθερμία, οι ιογενείς λοιμώξεις, και οι ελεύθερες ρίζες (Elmore S, 2007).

Όλα αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που οδηγούν στον σχηματισμό πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (MPT). Αυτή η

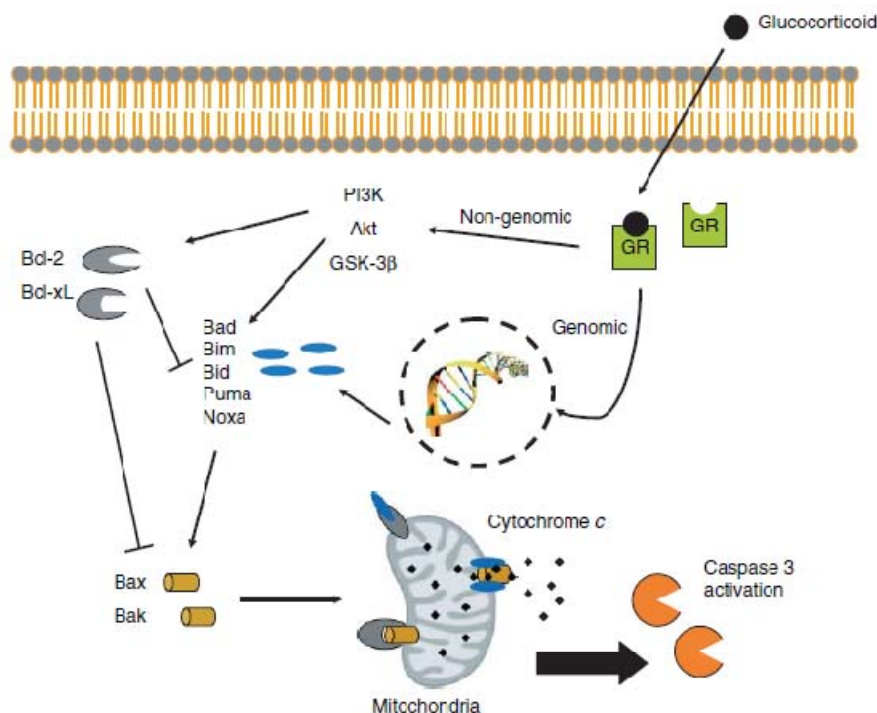
αλλαγή στην διαπερατότητα της μεμβράνης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και την απελευθέρωση δύο κύριων ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυτοσόλιο (Saelens X, 2004).

Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών απαρτίζεται από το κυτόχρωμα c, τη Smac/DIABLO και την πρωτεάση της σερίνης HtrA2/Omi. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν το εξαρτώμενο από τις κασπάσες μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Smac/DIABLO και HtrA2/Omi προωθούν την απόπτωση μέσω καταστολής της δράσης των αναστολέων της απόπτωσης (IAP). Με τη σειρά του, το κυτόχρωμα c προσδένεται στην Araf-1 και την ενεργοποιεί και ομοίως κάνει και για την προκασπάση 9, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο το αποπτώσωμα. Τα βήματα αυτά οδηγούν στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9, και τελικά στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3 [(Garrido C, 2006); (Du C, 2000)].

Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αποτελείται από τις AIF, ενδονουκλεάση G και CAD, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, αφού δηλαδή έχει προγραμματιστεί ο θάνατος του κυττάρου. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη AIF μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA και τη συμπύκνωση της περιφερικής πυρηνικής χρωματίνης. Η ενδονουκλεάση G μεταναστεύει κι εκείνη στον πυρήνα όπου και διασπά την πυρηνική χρωματίνη βοηθώντας, έτσι, τον σχηματισμό θραυσμάτων ολιγονουκλεοσωματικού DNA. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία κασπασών. Τέλος, παρατηρείται απελευθέρωση της πρωτεΐνης CAD από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή της στον πυρήνα όπου, μετά από διάσπαση της από την κασπάση 3, προκαλεί κατακερματισμό των DNA ολιγονουκλεοσωμάτων και περεταίρω συμπύκνωση της χρωματίνης [(Susin SA, 2000); (Enari M, 1998)].

Η οδός αυτή ελέγχεται από μέλη της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας. Οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ οι ίδιες υπόκεινται σε έλεγχο από την κατασταλτική πρωτεΐνη p53. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός ελέγχου δεν είναι ακόμη γνωστός. Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας είναι τόσο προ-αποπτωτικά-παραδείγματος χάρι οι παράγοντες Bim, Bid και Bad-όσο και αντι-αποπτωτικά-παραδείγματος χάρι οι παράγοντες Bcl-2, Mcl-1 και Bcl-xL, γεγονός που επεξηγεί την ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να καθορίζουν αν το κύτταρο βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης ή όχι. Για παράδειγμα, σε καταστάσεις stress, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των προαποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους προκαλούν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την έναρξη του αποπτωτικού μονοπατιού [(Ploner C, 2008); (Adams JM, 1998); (Schuler M, 2001)].

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, γενικά δρουν γενωμικά και μη γενωμικά. Ωστόσο, όσον αφορά την απόπτωση, δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη τα μονοπάτια που πυροδοτούνται σε κάθε περίπτωση. Παρόλα αυτά, είναι σχεδόν βέβαιο πως υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών τύπων [*Εικόνα 12*].



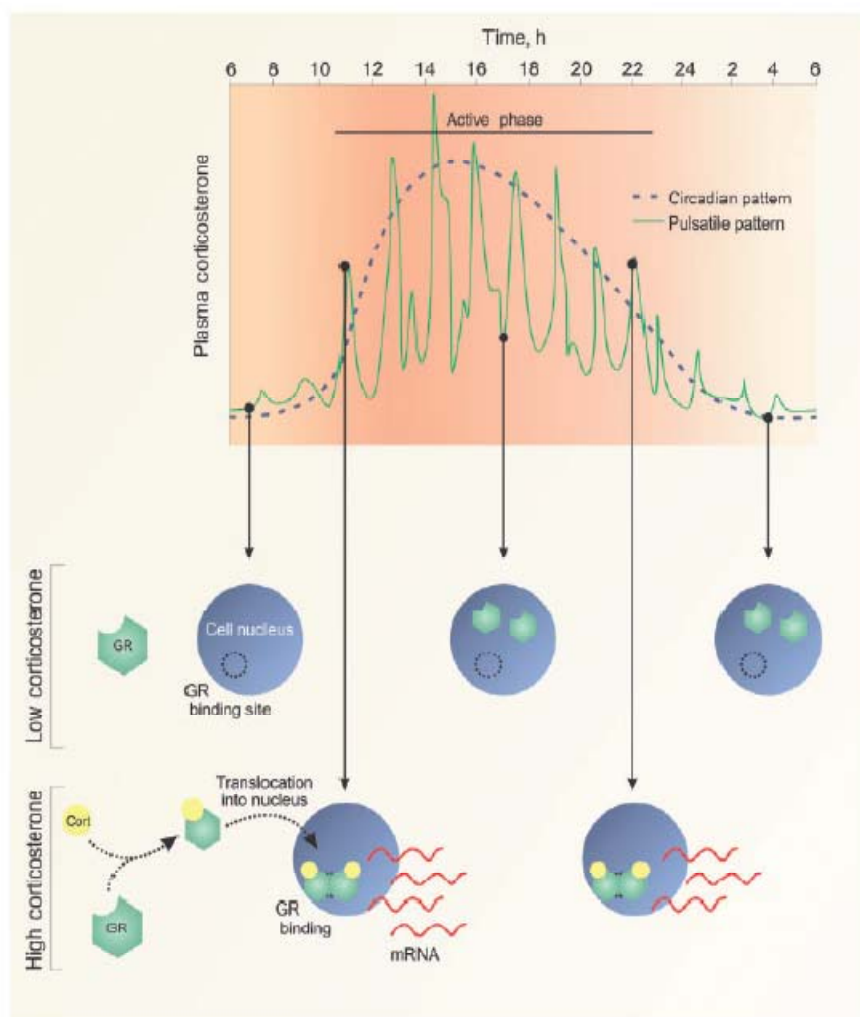
Εικόνα 12: Μηχανισμοί επαγωγής απόπτωσης από τα GCs. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους είτε γενωμικά ή μη γενωμικά. Ενώ η ακριβής οδός δεν είναι σαφής και μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων πιστεύεται ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω της μιτοχονδριακής οδού ενεργοποιώντας την κασπάση 3 (Schlossmacher G, 2011).

Βάση μελετών, στην πλειοψηφία των υπό εξέταση κυτταρικών τύπων τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν απόπτωση μέσω του ενδογενούς μονοπατιού. Αυτό γίνεται μέσω επαγωγής των προ-αποπτωτικών μελών της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας ή/και καταστολής των αντι-αποπτωτικών της μελών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν αναφορές για τη δράση των γλυκοκορτικοειδών μέσω της εξωγενής οδού σε υβριδώματα των T κυττάρων. Ειδικότερα, έχει βρεθεί πως ο GR επεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό των Th κυττάρων, ευνοώντας ιδιαίτερα την ανάπτυξη των Th2 κυττάρων. Επιπλέον, παρεμβαίνει στην έκφραση του FasL υποδοχέα μέσω παρεμπόδισης μίας επικείμενης ενεργοποίησης του, χωρίς ωστόσο να παρεμβαίνει στη Fas σηματοδότηση, γενικότερα [(Lu NZ, 2007); (Han J, 2001); (Ashwell JD, 2000)].

1.4 Γλυκοκορτικοειδή & Κιρκάδιοι ρυθμοί

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο, καθώς αυξομειώσεις στα επίπεδα τους συνδέονται με την εμφάνιση διάφορων παθήσεων. Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ακολουθεί έναν κιρκάδιο ρυθμό ο οποίος έχει ως αφετηρία τις πρώτες πρωινές ώρες, δηλαδή τη στιγμή όπου αγγίζει και τη μέγιστη τιμή του. Ειδικότερα, οι παλμοί εκκριτικής δραστηριότητας εμφανίζονται κάθε 60-90min κατά τη διάρκεια της ημέρας, προκειμένου να μπορέσει ο οργανισμός να ανταπεξέλθει στις δραστηριότητές του. Με αυτόν τον τρόπο,

αποκαλύπτεται ένα υπό-ημερήσιο μοτίβο έκκρισης, το οποίο διαταράσσεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις [Εικόνα 13].



Εικόνα 13: Η αυξομείωση στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών έχει ως αποτέλεσμα την παροδική ενεργοποίηση των GR γονιδίων. Τα επίπεδα των κορτικοστεροειδών (cort) στον ορό ποντικού αυξάνονται εν αναμονή της ενεργού φάσης. Τα επίπεδα των ορμονών ακολουθούν ένα κιρκάδιο ρυθμό, αν και το υποκείμενο μοτίβο έκκρισης της ορμόνης είναι υπό-ημερήσιο, όπου τα γλυκοκορτικοειδή απελευθερώνονται περίπου κάθε ώρα. Κατά τη διάρκεια ενός παλμού, η έκθεση στην ορμόνη οδηγεί στην μετατόπιση του GR στον πυρήνα, όπου συνδέεται με γενωμικά στοιχεία για την έναρξη της μεταγραφής. Όταν η ορμόνη βρίσκεται στα χαμηλότερα της επίπεδα παρατηρείται αποσύνδεση του GR από τη χρωματίνη και απελευθέρωση του υποδοχέα στο πυρηνόπλασμα. Στο σημείο αυτό, ο υποδοχέας είναι έτοιμος να αρχίσει τη μεταγραφή κατά τη διάρκεια της περαιτέρω αύξησης στα επίπεδα των ορμονών. Η δυναμική του υποδοχέα και τα μοτίβα έκκρισης της ορμόνης επιτρέπουν την ταχεία απόκριση στις ταχέως μεταβαλλόμενες κυτταρικές και φυσιολογικές συνθήκες (Biddie SC, 2012).

Από ένα τέτοιο μοτίβο δεν θα μπορούσε να μείνει ανεπηρέαστος και ο GR, καθώς όσο διαρκεί μία αύξηση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα, πρόσδεση τους στα αντίστοιχα γενωμικά στοιχεία κι έναρξη της μεταγραφής. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα των ορμονών μειωθούν, ο υποδοχέας

αποδεδειγμένο από τα στοιχεία αυτά και μετατοπίζεται στο πυρηνόπλασμα αναμένοντας μία νέα αύξηση στα επίπεδα των GCs για να ξεκινήσει εκ νέου τη μεταγραφή. Κλασικό παράδειγμα διαταραχής αυτού του μοτίβου έκκρισης αποτελεί η φλεγμονή που σχετίζεται με χρόνια ενεργοποίηση του HPA άξονα. Να αναφερθεί πως αυτό το κινκάρδιο μοτίβο έκκρισης, παρά τις διαφορές που παρουσιάζει στη συχνότητα και το εύρος των παλμών, είναι εξελικτικά συντηρημένο στα θηλαστικά, αποδεικνύοντας πως αυτή η παλμικότητα είναι απαραίτητο στοιχείο στη GR σηματοδότηση [(Windle RJ, 1998); (Windle R, 2001)].

1.5 Τα γλυκοκορτικοειδή ως θεραπευτικό μέσο

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως ως αποτελεσματικές θεραπείες της οξείας και χρόνιας φλεγμονής καθώς επίσης και για την αντιμετώπιση πολυάριθμων αυτοάνοσων παθήσεων. Όλα ξεκίνησαν το 1936 όταν έγινε για πρώτη φορά αντιληπτό πως μία ορμόνη των επινεφριδίων, η κορτιζόλη, είναι σε θέση να αντιστρέψει τα συμπτώματα και τις δυσλειτουργίες που προκαλεί η Νόσος του Addison, ενώ το 1949 έγιναν ανάλογες παρατηρήσεις για τη δράση της ίδιας ορμόνης πάνω στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA). Αυτά τα δύο γεγονότα αποτέλεσαν αφετηρία όχι μόνο για τη χρήση των κορτικοειδών για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά και για τη σύνθεση νέων και πιο αποτελεσματικών ενώσεων. Ωστόσο, η συστηματική χρήση των GCs έχει συνδυαστεί με την εμφάνιση ανεπιθύμητων και πολλές φορές μη αναστρέψιμων επιδράσεων στον οργανισμό, με γνωστότερες την οστεοπόρωση, τον διαβήτη και το γλαύκωμα Cushing. Η συχνότητα εμφάνισης των παρενεργειών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Ισχύς του χορηγούμενου GC
- ✓ Οδός χορήγησης
- ✓ Ενδείξεις που συνοδεύουν το χορηγούμενο GC
- ✓ Τον ασθενή.

Σε ασθένειες όπου είναι δυνατή η τοπική χορήγηση του γλυκοκορτικοειδούς, όπως σε δερματολογικές παθήσεις, παρατηρήθηκαν αισθητά λιγότερες κι ασθενέστερες παρενέργειες μετά τη χορήγηση. Παρόλα αυτά, η τοπική χρήση δεν αποτελεί λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα για δύο κυρίως λόγους: α) σοβαρές παροξύνσεις της νόσου είναι αδύνατον να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά μέσω της συγκεκριμένης οδού, και β) συστηματική χρήση επιθεμάτων συσχετίζεται με την ανάπτυξη ατροφίας στο δέρμα.

Με βάση όλα τα παραπάνω, έγιναν εκτενείς προσπάθειες χημικής βελτιστοποίησης των ήδη υπάρχοντων ενώσεων. Οι προσπάθειες αυτές επικεντρώθηκαν σε δύο διαφορετικούς στόχους, στην βελτίωση της δραστηριότητας της ένωσης ή της βιοαδιαθέσιμότητάς του. Το τελευταίο έγινε μέσω εντοπισμού προ-φαρμάκων με βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες από της αντίστοιχης δραστικής ένωσης. Όμως, παρά τις προσπάθειες που κατεβλήθησαν, το πρόβλημα με την εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών εξακολουθούσε να υπάρχει. Έτσι, σύντομα προέκυψε η ανάγκη εύρεσης

ή σύνθεσης ενώσεων με ανάλογη αντιφλεγμονώδη κι ανοσοτροποποιητική δράση με αυτή των διαθέσιμων εμπορικά GCs, αλλά με σαφώς μειωμένο τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων επιδράσεων στον οργανισμό.

Τρεις κύριες προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν είτε για την δημιουργία νέων γλυκοκορτικοειδών ή για την αντικατάσταση κάποιων υποομάδων στα ήδη υπάρχοντα GCs. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση σκευασμάτων που χρησιμοποιούνταν στη συστηματική κυκλοφορία με απώτερο σκοπό μία στοχευμένη απελευθέρωση του φαρμάκου. Κλασικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτέλεσε ο σχηματισμός κάψουλας στεροειδών με τη βοήθεια λιποσωμάτων για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Στην δεύτερη προσέγγιση, έγινε συνδυασμός μονοξειδίου του αζώτου (NO) με γνωστό στεροειδές- προσδέτη του GR προκειμένου να ενισχυθούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της ουσίας, χωρίς όμως να αυξηθεί η χορηγούμενη δόση ή η ισχύς του στεροειδούς. Τέλος, μία από τις πλέον υποσχόμενες προσεγγίσεις των τελευταίων ετών αφορά τη βελτιστοποίηση των προσδετών του GR, με απώτερο σκοπό τη ρύθμιση της GR σηματοδότησης με πολύ ειδικό τρόπο. Αυτό θα οδηγήσει στην εμφάνιση GR αγωνιστών (GR agonists, SEGRAs) οι οποίοι και πολύ πιθανό να βρεθούν σύντομα στη φάση των κλινικών δοκιμών (Schäcke H, 2007).

1.6 Η επαγόμενη από GCs απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα & οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Σε όλους τους τύπους όγκων υπάρχουν παραδείγματα ανθεκτικότητας στις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Ωστόσο, οι περισσότερες πληροφορίες που έχουν έρθει μέχρι σήμερα στο φως όσον αφορά τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα GCs επάγουν απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα πηγάζουν από τη μελέτη τριών τύπων καρκίνου: της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, του οστεοσαρκώματος και του καρκίνου των μικρών κυττάρων στον πνεύμονα. Η ανθεκτικότητα αυτή αποδίδεται στην απώλεια λειτουργίας του GR ή/και στη μειωμένη δράση του υποδοχέα, γεγονότα που εμποδίζουν την επαγωγή απόπτωσης από GCs και στους τρεις τύπους καρκίνου. Η απώλεια λειτουργίας του GR έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του GR, γεγονός που πιθανότατα επηρεάζει αρνητικά οποιονδήποτε λειτουργικό GR που ενδεχομένως υπάρχει ακόμη. Η μειωμένη δραστηριότητα του υποδοχέα έχει συσχετιστεί με τις εξής περιπτώσεις: μειωμένη ενεργοποίηση του GR υποκινητή, αυξημένη μεθυλίωση του GR υποκινητή ή αυξημένη έκφραση των ισομορφών του GR που εμφανίζουν μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα (Herr I, 2009).

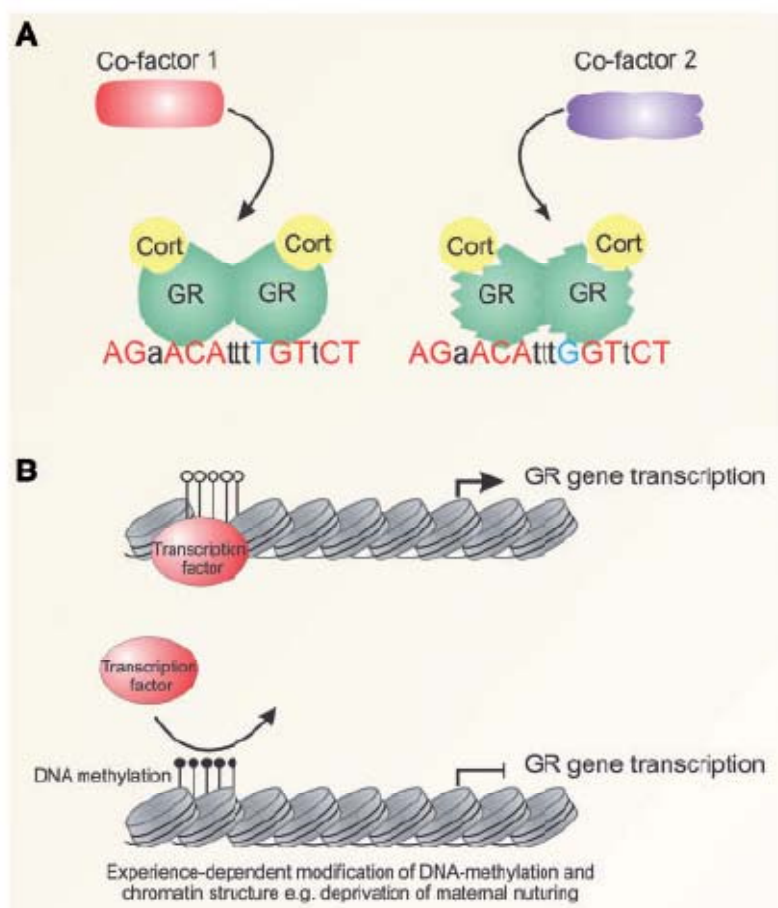
Αξίζει να αναφερθεί, πως βιβλιογραφικά μελετάται η πιθανότητα τα GCs να προκαλούν την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα κύτταρα στερεών όγκων, ενώ σε λεμφοειδής κακοήθειες να παρουσιάζουν μία προ-αποπτωτική δράση. Το γεγονός αυτό είναι ζωτικής σημασίας καθώς, καθώς μία αγωγή με GCs έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία ανάπτυξη και μετάσταση ενός στερεού όγκου, δίνοντάς του έτσι ένα πλεονέκτημα επιλογής. Ωστόσο, το πιθανότερο είναι η ανθεκτικότητα αυτή να εμφανίζεται λόγω των

χαρακτηριστικών ανάπτυξης ενός στερεού όγκου, σε αντίθεση με έναν λεμφοειδή καρκίνο ο οποίος λόγω μορφολογίας χρειάζεται πολύ περισσότερο χρόνο να αναπτύξει ανθεκτικότητα (Schlossmacher G, 2011).

Εξετάζοντας το θέμα της ανθεκτικότητας στα GCs από μία γενετική κι επιγενετική σκοπιά, αξίζει να αναφερθεί πως μεταλλάξεις σε γονίδια συν-παράγοντες του GR οδηγούν στην εμφάνιση ανοχής στα γλυκοκορτικοειδή. Παράδειγμα αποτελεί η μετάλλαξη του παράγοντα Brg-1 η οποία εμφανίζεται συχνά στον καρκίνο του πνεύμονα κι έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ανθεκτικότητας στην χορηγούμενη θεραπεία με GCs [(Rodriguez-Nieto S, 2011); (New MI, 2001)].

Σε γενικές γραμμές, περίπου το 1/3 του πληθυσμού εμφανίζει ανθεκτικότητα σε μία θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή κι ως εκ τούτου αναμένεται να μην εμφανίσει κάποια αντίδραση μετά τη χορήγηση του γλυκοκορτικοειδούς. Είναι γνωστό πως οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (SNPs) παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση ποικιλομορφίας μέσα σε έναν πληθυσμό. Αυτοί σε συνδυασμό με πολυμορφισμούς των γονιδίων της CS- δεσμευτικής σφαιρίνης (CS-binding globulin, CBG), των υποδοχέων TLR (Toll-like receptors, TLRs) και του παράγοντα αναστολής μετανάστευσης των μακροφάγων (macrophage emigration inhibitory factor, MIF) συνδέονται με αλλοιωμένα επίπεδα κορτιζόλης στον ορό και με διαφορές στην απόκριση στα GCs. Στο επίπεδο δέσμευσης στο DNA, αποδεδειγμένα πλέον τα SNPs προκαλούν διαφορετική προσέλκυση μεταγραφικών παραγόντων. Με βάση το γεγονός αυτό, είναι πολύ πιθανό τα SNPs να μεταβάλλουν τις συνθήκες πρόσδεσης στον GR και την ευαισθησία στα GCs σε συγκεκριμένα κύτταρα-στόχους. Επιπλέον, η ποικιλομορφία των GRE αλληλουχιών μεταβάλλει τη δομή του GR δρώντας ως αλλοστερικός διαμορφωτής. Αυτές οι δομικές διαφορές είναι δυνατόν να προωθήσουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ GR και διάφορων συν-παραγόντων, επηρεάζοντας έτσι τη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων [**Εικόνα 14Α**]. Επομένως, η ύπαρξη SNPs μέσα σε GREs είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει τη δράση του GR ανάλογα με το γονίδιο και το υπό εξέταση άτομο [(Biddie SC, 2012); (Leung DY, 2003); (Rahimov F, 2008); (Meijsing SH, 2009)].

Η μεθυλίωση του DNA, γνωστός επιγενετικός μηχανισμός που σχετίζεται με τη συμπίκνωση της χρωματίνης και με τη σίγηση των γονιδίων, τροποποιεί και εκείνη με τη σειρά της την έκφραση του GR γονιδίου. Μεθυλίωση του DNA στον υποκινητή του GR σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα και κατ' επέκταση εμφάνιση ανοχής στα GCs. Έρευνα που έγινε με τη βοήθεια πειραματόζωων απέδειξε πως τρωκτικά τα οποία είχαν στερηθεί τη μητρική γαλούχηση εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του GR στην περιοχή του ιππόκαμπου, ένα πρότυπο το οποίο μεταβιβάστηκε και στις επόμενες γενιές. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως η μεθυλίωση αποτελεί έναν δυναμικό και προγραμματιζόμενο μηχανισμό [**Εικόνα 14Β**] (Biddie SC, 2012).



Εικόνα 13: Γενετικοί κι επιγενετικοί μηχανισμοί στη δράση του GR. (Α) Το DNA είναι ένας αλλοστερικός διαμορφωτής, μεταβάλλοντας τη δομή του υποδοχέα όταν δεσμεύεται σε αυτόν. Τα SNPs (μπλε) σε GREs (κόκκινο) θα μπορούσαν να μεταβάλουν τις αλληλεπιδράσεις με συν-παραγόντες μέσω μεταβολής της δομής του GR. Αυτές οι επιπτώσεις θα μπορούσαν να συμβάλουν σε μία ειδική γονιδιακή ρύθμιση ανάλογα με το άτομο και το γονίδιο. (Β) Η DNA μεθυλίωση, ένας επιγενετικός μηχανισμός, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική σίγηση του γονιδίου μέσω αλλαγής στη δομή της χρωματίνης. Ατομικές εμπειρίες, όπως η μητρική ανατροφή, μπορούν να μεταβάλλουν τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, δημιουργώντας κληρονομήσιμα πρότυπα έκφρασης μεταξύ των γενεών. Η μειωμένη έκφραση του GR προκαλεί ανοχή στην ορμονική δράση σε συγκεκριμένους ιστούς. Cort: κορτιζόλη (Biddie SC, 2012).

Ανάλογα πρότυπα μεθυλίωσης παρατηρήθηκαν στον ιππόκαμπο κακοποιημένων στην παιδική ηλικία ατόμων που είχαν διαπράξει αυτοκτονία, γεγονός που υποδηλώνει αλληλεπίδραση μεταξύ του προτύπου μεθυλίωσης κι ατομικής εμπειρίας. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό πως γενετικές κι επιγενετικές τροποποιήσεις σε συνδυασμό με καλύτερη κατανόηση των βασικών σημείων ελέγχου της GR σηματοδότησης αναμένεται να συμβάλουν καθοριστικά στην κατανόηση της απόκρισης των ατόμων στα GCs αλλά και στην εύρεση πιο στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων [(Schlossmacher G, 2011); (Weaver IC, 2004); (McGowan PO, 2009)].

1.7 Τα τριτερπένια ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες

Τα τριτερπένια αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που υπάρχουν στην επίγεια και θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα. Η διατήρηση τους, κυρίως στο φυτικό βασίλειο, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τόσο εξελικτικά όσο και λειτουργικά (Bhatti HN, 2014). Είναι ολιγομερείς μεταβολίτες του πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου, αποτελούμενοι από έξι μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8). Οι σκελετοί του άνθρακα κυκλοποιούνται από την οικογένεια των κυκλάσων του οξειδοσκουαλενίου, η οποία είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στα φυτά. Οι κυκλάσες αυτές μετατρέπουν το οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες κυκλικές αλκοόλες τριτερπενίου με έως και έξι καρβοκυκλικούς δακτυλίους. Το απλούστερο τριτερπένιο βάση του οποίου σχηματίζονται τα απλούστερα τριτερπενοειδή είναι το σκουαλένιο (C_{30}). Βάση του σκουαλενίου, προκύπτει μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων, αποτελούμενη από περισσότερα από 20.000 γνωστά μέλη. Μερικοί πολύ γνωστοί εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι οι ομάδες αμυντικών μεταβολιτών του φυτού, δηλαδή οι σαπωνίνες, τα καρδιακά γλυκοζίδια ή καρδενολίδια, τα στεροειδή και τα λεμονοειδή [(Petronelli A, 2009); (Γαλάτης Β., 2009); (Phillips DR, 2006); (Yan XJ, 2014)].

Τα τριτερπενοειδή έχουν προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες. Σε γενικές γραμμές τα τριτερπένια συγκεντρώνουν έναν μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών. Όσον αφορά την ικανότητα τους να καταστέλλουν την ογκογένεση, αυτό γίνεται μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

- ✓ Παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ
- ✓ Επάγοντας απόπτωση,
- ✓ Αναστέλλοντας τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- ✓ Αναστέλλοντας την αγγειογένεση
- ✓ Προκαλώντας μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες
- ✓ Διαμορφώνοντας την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην χορήγηση πολλαπλών σκευασμάτων (reversing multidrug resistance, MDR), τα οποία βρίσκονται στους περισσότερους όγκους.

Επιπλέον, διάφοροι κυτταρικοί υποδοχείς εμπλέκονται στις αντικαρκινικές ιδιότητες των τριτερπενίων. Κάποιοι από αυτούς είναι ο υποδοχέας των ανδρογόνων και ο αγγειο-ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).

Όσον αφορά το ρόλο των τριτερπενοειδών στην επαγωγή απόπτωσης αυτή μπορεί να γίνει μέσω καταστολής της δράσης του Bcl-2 γονιδίου κι επαγωγής της κασπάσης 3. Εναλλακτικά, μπορούν να επάγουν την εμφάνιση απόπτωσης μέσω του μιτοχονδιακού μονοπατιού ή μέσω ενίσχυσης του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF). Επιπρόσθετα, βρίσκεται υπό εξέταση ένα νέο μονοπάτι επαγωγής απόπτωσης μέσω καταστολής της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης hTERT, και κατ' επέκταση μέσω αναστολής της δράσης της αντίστοιχης τρανσφεράσης των τελομερών.

Εκτός από αντικαρκινικές δράσεις, στα τριτερπένεια έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, αντικές, αντιμυκητιακές, ανοσορυθμιστικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η αιμολυτική και κυτταροστατική δράση πολλών τερπενείων έχει περιορίσει δραματικά τη φαρμακευτική τους χρήση κι έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην τροποποίησή τους με τη βοήθεια χημικών και βιοτεχνολογικών τεχνικών. Τέλος, αποτελούν ικρίωμα για τη σύνθεση πολλών νέων χημικών σκευασμάτων, γεγονός που αποδίδεται στον ομοιογενή ανθρακικό τους σκελετό [(Yan XJ, 2014); (Shah SA, 2014); (Malinowska M, 2013); (Salminen A, 2008); (Molnár J, 2006)].

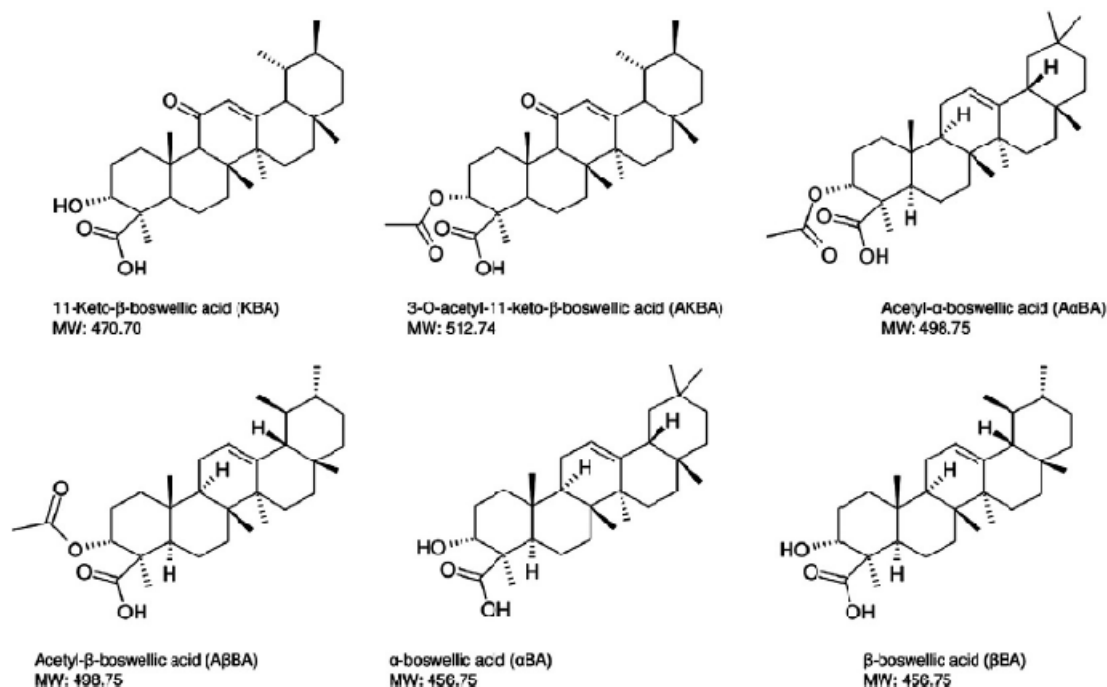
1.8 Τα boswellic acids ως μελλοντικά φαρμακευτικά σκευάσματα

Σε βάθος χρόνου, το λιβάνι έχει εξεταστεί για τον πλούτο των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων. Γι αυτό τον σκοπό, έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί εδώ και αιώνες στην Ινδία, την Κίνα και σε πολλές αφρικανικές χώρες, και έχει γίνει δημοφιλές στις δυτικές χώρες τις δύο τελευταίες δεκαετίες. Το λιβάνι είναι το κοινό όνομα που δίνεται στις ρητίνες του είδους *Boswellia*. Ειδικότερα, οι δύο σημαντικότερες πηγές αυτής της λιβανιού είναι τα είδη *Boswellia serrata*, που συναντάται στη βορειοδυτική Ινδία, και *Boswellia carterii*, που συναντάται στη Βόρεια Σομαλία, το Σουδάν, την Ερυθραία και την Αιθιοπία. Τα φυτά του γένους *Boswellia* ανήκουν στην οικογένεια των *Burseraceae*. Η οικογένεια αυτή εκπροσωπείται στο φυτικό βασίλειο με 17 γένη και 600 διάσπαρτα στις τροπικές περιοχές είδη, από τα οποία τα 25 ανήκουν στο γένος *Boswellia*.

Ανάλυση του ελαίου που απομονώνεται από το τμήμα της ρητίνης του γένους *Boswellia serrata* αποκάλυψε πως αποτελείται από 30-60% ρητίνη, 5-10% αιθέρια έλαια, τα οποία είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, και από πολυσακχαρίτες. Τα εκχυλίσματα του γένους αυτού έχουν χρησιμοποιηθεί στη λαϊκή ιατρική για αιώνες για τη θεραπεία διαφόρων χρόνιων φλεγμονωδών νόσων. Ειδικότερα, το ρητινώδες τμήμα του *Boswellia serrata* αποτελείται από μονοτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια, τετρακυκλικά τριτερπενικά οξέα και τέσσερις μεγάλα πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα, το β-boswellic acid, το ακετυλο-β-boswellic acid, το 11-κετο-β-boswellic acid και το ακετυλο-11-κετο-β-Boswellic acid. Πειραματικά δεδομένα που πηγάζουν από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τόσο in vitro όσο και σε ζωικά μοντέλα καταδεικνύουν πως η δραστική ουσία των διαφόρων εκχυλισμάτων από λιβάνι είναι τα οξέα αυτά, στα οποία και έχουν αποδοθεί πολλές δράσεις, κυριότερες από τις οποίες είναι η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική. Άλλες λοιπές φαρμακολογικές δράσεις είναι: ανοσορυθμιστικές, κατά του έλκους και της παχυσαρκίας, υπολιπιδαιμικές και αντιβακτηριακές.

Δομικά, τα boswellic acids (BAs) ορίζονται ως ένα βιοενεργό μείγμα 4 μεγάλων βήτα- και 2 άλφα-πεντακυκλικών οξέων τριτερπενίου, ενώ μεγαλύτερη ποικιλία μπορεί να επιτευχθεί από την παρουσία ή την απουσία μιας ομάδας καρβονυλίου στον C-11 και μίας ακετοξυ-ομάδας ή μία υδροξυλόμαδας στον C-3. Στην **Εικόνα 15** δίνονται οι δομές των κυριότερων BAs. Κλείνοντας το δομικό κομμάτι, φαρμακολογικές μελέτες έχουν

δείξει πως τα BAs τύπου β παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα BAs τύπου α [(PoeckelD, 2006); (Satpathy R, 2015); (Siddiquii M.Z.,2011); (Du Z, 2015); (Ammon HP., 2010)].



Εικόνα 15: Οι δομές των κυριότερων BAs (Ammon HP., 2010).

1.9 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

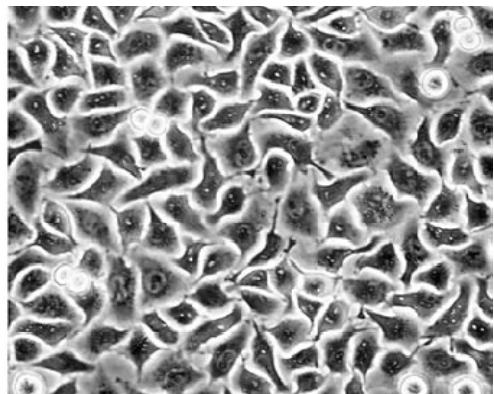
Δεδομένων των δομικών ομοιοτήτων που παρατηρούνται μεταξύ των Bas και των GCs, των προβλημάτων που έχουν παρουσιαστεί σε ασθενείς μετά τη χορήγηση των τελευταίων αλλά και της ανάγκης εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA) αποτελεσματικών στον ίδιο βαθμό με τα γλυκοκορτικοειδή, όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση, αλλά με σαφώς μειωμένες τις ανεπιθυμητές επιβλαβείς για τον οργανισμό δράσεις όπως αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, καταβολισμός πρωτεϊνών και οστεοπόρωση, αποφασίστηκε να εξεταστεί κατά πόσο το α-και β-boswellic acid, καθώς επίσης και κάποια παράγωγά τους, ασκούν τη δράση τους έστω και εν μέρει μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Προκειμένου, λοιπόν, να εξεταστεί η συνεισφορά των BAs στην ενεργοποίηση και πυρηνική μετατόπιση του GR, καθώς επίσης και στην προκαλούμενη από τον υποδοχέα απόπτωση μέσω μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, αναλύσεις Western Blot και luciferase reporter gene assays στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa, ενώ ένα πολύ μικρό τμήμα των μελετών διεξήχθη και στην ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά HepG2.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa&HepG2- Γενικές πληροφορίες

Αρωγός στις προσπάθειες κατανόησης των βιοχημικών μηχανισμών εξέλιξης διαφόρων ασθενειών είναι οι συνεχείς κυτταρικές σειρές. Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές αποτελούν κύτταρα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον όταν καλλιεργούνται κάτω υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Τις περισσότερες φορές, αυτό αποτελεί ένα σπάνιο γεγονός, αφού η πλειονοψηφία των κυττάρων, ακόμη και αυτά που βρίσκονται σε έναν καρκινικό ιστό, σταματά να πολλαπλασιάζεται μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Ωστόσο, μία συνεχής κυτταρική σειρά μπορεί να υποστεί ανακαλλιέργεια άπειρες φορές, χωρίς να χάσει κάποια ιδιότητα του κυτταρικού τύπου ή του ιστού απ' όπου προέρχεται. Το γεγονός αυτό, καθιστά τις συνεχείς κυτταρικές σειρές ένα εξαιρετικό σύστημα μελέτης διαφόρων κυτταρικών διεργασιών (Capes-Davis A, 2010). Γενικά, οι κυτταρικές σειρές προκύπτουν μετά από ασηπτική αφαίρεση κυττάρων τμημάτων του υπό μελέτη ιστού, διαχωρισμό των κυττάρων με ενζυμική κατεργασία του ιστού, για την καταστροφή του διακυτταρικού πλέγματος, και τέλος επίχριση του προκύπτοντος εναιωρήματος σε μία επίπεδη επιφάνεια, όπως είναι ο πυθμένας μίας φιάλης ή ένα τρυβλίο Petri. Η προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα μίας φιάλης ή σε ένα τρυβλίο στηρίζεται στην ύπαρξη γλυκοπρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων μέσα στο κυτταρικό εναιώρημα (Madigan T. Michael, 2007).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όλα τα πειράματα που θα περιγραφούν στη συνέχεια αυτής της ενότητας πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa [**Εικόνα 16**]. 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.



Εικόνα 16: Τα κύτταρα HeLa έτσι όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο (Carson SD, 2013).

Όλα ξεκίνησαν μετά την παρατήρηση του Gey 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, ο ερευνητής απομόνωσε ένα και μόνο κύτταρο από το οποίο και προέκυψε ολόκληρη η κυτταρική σειρά. Να αναφερθεί πως τα HeLa αποτελούν την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που απομονώθηκε κι η καλλιέργεια τους αποτέλεσε αναπόσπαστο κομμάτι κάθε έρευνας που είχε σχέση με τον καρκίνο

παγκοσμίως [(Carson SD, 2013); (O'Brien SJ, 2001); (Callaway, 2013); (Callaway, 2013b)].

Ωστόσο, ένα πολύ μικρό ποσοστό των πειραματικών διαδικασιών διεξήχθησαν στην ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά HepG2. Τα κύτταρα HepG2 αποτελούν μία καθαρή καρκινική κυτταρική σειρά, απομονωμένη από ανθρώπινο ηπατικό καρκίνωμα. Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου καυκάσιου Αμερικανού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα HepG2 είναι επιθηλιακά στη μορφολογία τους κι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους είναι 55. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα κατά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, μιας θανατηφόρας ασθένειας που μαστίζει εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Σε γενικές γραμμές, το προφίλ της γονιδιακής τους έκφρασης αποτελεί για πολλά εγαστήρια καλό δείκτη στα πλαίσια προσυμπτωματικών ελέγχων (Costantini S, 2013).

2.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

Πριν ξεκινήσει η περιγραφή των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, να αναφερθεί πως η HeLa κυτταρική σειρά με την οποία εκπονήθηκαν τα περισσότερα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω ήταν ευγενική χορηγία του ΕΙΕ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Επιπλέον, όσον αφορά το πρακτικό τμήμα των κυτταροκαλλιιεργειών, αξίζει να τονιστούν τα εξής:

- ✓ Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εκπονούνται μέσα στον απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ψεκάζεται με 70% EtOH πριν εισαχθεί στον απαγωγό.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιιεργειες ανοίγει και κλείνει αυστηρά μέσα στον απαγωγό
- ✓ **ΠΑΝΤΑ** αφού λήξει η εργασία στον απαγωγό, εφαρμόζεται UV ακτινοβολία για 30min για εσωτερικό καθαρισμό του χώρου. Συνίσταται έλεγχος καθαρότητας και πριν την έναρξη της εργασίας στον απαγωγό.

2.2.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C ή σε υγρό άζωτο μέσα σε ειδικά φιαλίδια, τα cryovials. Η απόψυξη τους λαμβάνει χώρα στο υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37°C, κι αφού ξεπαγώσει το εσωτερικό του vial, εισάγεται στο εσωτερικό του απαγωγού, όπου και ανοίγεται το vial. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το εσωτερικό του vial σε ένα πλαστικό σωλήνα τύπου falcon μαζί με περίπου 10ml θρεπτικού κι όλο μαζί φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε RT (19-25°C). Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης, υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5mg/ml) εμπλουτισμένου με 1% v/v 200mM L-γλουταμίνη (L-Glut), 1% v/v

πενικυλλίνης/στρεπταμυκίνης (P/S) και 10% v/v FBS. Η ποσότητα του θρεπτικού που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την επαναδιαλυτοποίηση εξαρτάται από τη φλάσκα που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια. Ειδικότερα, για T₂₅ (φλάσκα επιφάνειας 25cm²) χρησιμοποιούνται 5ml DMEM, ενώ για T₇₅ (φλάσκα επιφάνειας 75cm²) χρησιμοποιούνται 15ml DMEM. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται για ανάπτυξη στον επωαστήρα, όπου επικρατούν οι εξής συνθήκες: $\theta = 37^{\circ}\text{C}$ και συνθήκες υγρασίας 5% CO₂, κι αφήνονται εκεί μέχρι η πληρότητα της φλάσκας (confluency) να φτάσει το 80-85%. Το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να φτάσουν τα κύτταρα σε αυτό το ποσοστό πληρότητας διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών, κι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι ο αριθμός των περασμάτων που έχει υποστεί η χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, καθώς επίσης και από το πόσο καλά έχει χειριστεί τα συγκεκριμένα κύτταρα ο χρήστης. Σε κάθε περίπτωση, συνίσταται τακτική παρακολούθηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης), ούτως ώστε να αποφευχθεί πληρότητα μεγαλύτερη του 90%. Σε περίπτωση που συμβεί κάτι τέτοιο κάποια από τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση stress, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αλλοιώσεις σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Με άλλα λόγια, παύουν πλέον να είναι αξιόπιστα για την διεξαγωγή πειραμάτων και συνίσταται η απόρριψή τους. Τέλος, να τονιστεί πως σε περίπτωση που δεν έχει παρατηρηθεί το επιθυμητό confluency μέσα σε περίπου 48h συνοδευόμενη ή μη από χρωματική αλλαγή στο θρεπτικό μέσο συνίσταται αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

2.2.2 Θρυψινοποίηση των κυττάρων

Μόλις το ποσοστό πληρότητας της φλάσκας αγγίξει περίπου το 80% πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με χρήση διαλύματος πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την επιφάνεια της φλάσκας και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.25% κι αφήνεται να δράσει στον επωαστήρα. Να αναφερθεί πως η ποσότητα της θρυψίνης που θα προστεθεί πρέπει να είναι τόση ώστε να διαβρέχει το εσωτερικό της φλάσκας, ενώ το χρονικό διάστημα επώασης της με τα κύτταρα εξαρτάται από το πόσο γρήγορα θα παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας. Γι αυτό τον λόγο, τα κύτταρα ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο στάδιο αυτό, καθώς επώαση της θρυψίνης με τα κύτταρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, στρεσάρει τα κύτταρα και στην χειρότερη περίπτωση προκαλεί καταστροφή τους. Αμέσως μόλις παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων, προστίθεται τετραπλάσια (4x) ποσότητα θρεπτικού, προκειμένου να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη. Η αδρανοποίηση αυτή γίνεται μέσω αλλαγής του pH της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα μέσα στη φλάσκα. Ακολουθεί σχολαστική επαναιώρηση των κυττάρων έτσι ώστε να σπάσουν συσσωματώματα κυττάρων που πιθανότατα έχουν δημιουργηθεί, ενώ ταυτόχρονα διαβρέχεται καλά και η επιφάνεια της φλάσκας προκειμένου να αποκολληθούν τυχόν εναπομείναντα πάνω σε αυτήν κύτταρα. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το εσωτερικό της φλάσκας σε σωλήνα τύπου falcon για 5min στα 1000rpm σε RT (19-25°C). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος στο μέσο καλλιέργειας (DMEM). Και σε αυτήν την

περίπτωση η ποσότητα του θρεπτικού που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται τόσο από τη φλάσκα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα όσο και από το σκοπό που γίνεται η ανακαλλιέργεια. Σε περίπτωση που έχει προγραμματιστεί κάποιο πείραμα σε άμεσο χρονικό διάστημα, επιστρέφεται μεγάλη ποσότητα αρχικής καλλιέργειας και συμπληρώνεται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Αντίθετα, όταν σκοπός είναι απλά η διατήρηση της καλλιέργειας, επιστρέφεται πολύ μικρή ποσότητα για ανακαλλιέργεια και συμπληρώνεται με κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Αυτό γίνεται επειδή σε γενικές γραμμές τα κύτταρα ταλαιπωρούνται με τη θρυψινοποίηση, οπότε και αποφεύγεται όταν δεν συντρέχει λόγος. Μετά από κάθε θρυψινοποίηση σημειώνεται στην επιφάνεια της φλάσκας το νέο πέρασμα (+1 από το προηγούμενο πέρασμα) καθώς και η ημερομηνία διεξαγωγής της θρυψινοποίησης.

2.2.3 Πάγωμα των κυττάρων

Μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις γίνεται συνήθως πάγωμα κάποιων κυττάρων, έτσι ώστε να υπάρχουν μελλοντικά διαθέσιμα stock στους -80°C . Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση που πραγματοποιείται στη θρυψινοποίηση, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλη ποσότητα FBS. Η ποσότητα που θα επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα αυτό εξαρτάται από τον αριθμό των cryovials που πρόκειται να παγώσουν, και καθορίζεται από τον λόγο $\text{FBS/DMSO} = 9/1$. Με άλλα λόγια, σε κάθε cryovial προστίθενται 0,9ml διαλύματος FBS μαζί με κύτταρα και 0,1ml DMSO (SIGMA). Αμέσως μόλις γίνει η προσθήκη του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (DMSO), γίνεται γρήγορη ανακίνηση και μεταφορά-αποθήκευση 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 περιγράφεται και παραπάνω. Αμέσως μόλις επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρεται μία πολλή μικρή ποσότητα κυττάρων σε ένα erpendorf απ' όπου γίνεται λήψη 10μl με πιπέτα και μεταφορά στην πλάκα Neubauer. Στο στάδιο αυτό δίνεται προσοχή στην καλή ανακίνηση του περιεχομένου του erpendorf, καθώς τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν, και η ποσότητα των 10μl που θα ληφθεί πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική. Τα 10μl κυττάρων μεταφέρονται στη μία πλευρά της πλάκας, 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. Ο αριθμός που προκύπτει αντιστοιχεί στα 10μl, επομένως όπως γίνεται κατανοητό γίνεται αναγωγή στο 1ml. Κατόπιν, γίνεται υπολογισμός ο όγκος του εναιωρήματος των κυττάρων λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των wells που χρειάζονται για το πείραμα. Ο αριθμός αυτός διαιρείται με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που είναι διαθέσιμα στην καλλιέργεια, δίνοντας έτσι την ποσότητα αρχικής καλλιέργειας που πρέπει να φυγοκεντρηθεί για 5min στα 1000rpm σε RT ($19-25^{\circ}\text{C}$). Και στην περίπτωση αυτή, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου. Παρακάτω δίνεται ένα παράδειγμα για να γίνουν κατανοητά όσα περιγράφηκαν στην ενότητα αυτή.

Έστω, ότι σε ένα 24well-plate θέλουμε να στρώσουμε 5.000 κύτταρα σε 6wells. Τα ζωντανά κύτταρα στα 4 τεταρτημόρια βρέθηκαν πως ήταν: $52+66+37+40=195$. Άρα, ο μέσος όρος ισούται με $195/4=48,75$ cells/10μl. Άρα, για το 1ml ισχύει: $48,75 \times 10.000 = 487.500$ cells.

Εφόσον θέλουμε 5000cells/well, για τα 6wells ισχύει: $5.000 \times 6 = 30.000$ cells. Άρα, φυγοκεντρώνονται $30.000/487.500 = 0,0615$ ml ή 61,5μl αρχικής καλλιέργειας.

Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλυτοποιείται σε: $0,5\text{ml/well} \times 6 = 3\text{ml}$ κατάλληλου θρεπτικού. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως το θρεπτικό με το οποίο έγιναν όλα τα πειράματα ήταν το DMEM cis, το οποίο αποτελούνται από 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.

Το FBS cis προέκυψε μετά από κατεργασία του FBS με ενεργό άνθρακα. Η κατεργασία αυτή αποσκοπούσε στην απενεργοποίηση του FBS και έγινε με βάση αναφορά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Γενικά ο ενεργός άνθρακας προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια, μπορώντας με αυτόν τον τρόπο να αφαιρεί ορμόνες ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα τους από το FBS. Η αφαίρεση των ορμονών αυτών είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη.

2.3 Ανοσοϊστοχημεία

Με τη βοήθεια της μεθόδου αυτής, γίνεται ανίχνευση βιολογικών μορίων μέσα σε μία κυτταρική καλλιέργεια. Βασίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση του αντιγόνου με το αντίστοιχο αντίσωμα και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος. Το συγκεκριμένο πείραμα εκπονήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία έτσι ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο τα υπό εξέταση BAs μπορούν να επάγουν μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Τα BAs που εξετάστηκαν, καθώς επίσης και οι συντομογραφίες με τις οποίες θα αναφέρονται παρακάτω δίνονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Τα boswellicAcids (BAs) και οι συντομογραφίες τους.

Όνομα Boswellic Acid (BA)	Συντομογραφία
11-ketobeta Boswellic Acid	TFC01
3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid	TFC02
alpha Boswellic Acid	TFC10
beta Boswellic Acid	TFC11
alpha-Acetylboswellic Acid	TFC12
beta-AcetylBoswellic Acid	TFC13

Αρχικά, σε ένα 24wells-plate τοποθετήθηκαν 8 καλυπτρίδες (coverslips), σε 8 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.

Πειραματική διαδικασία

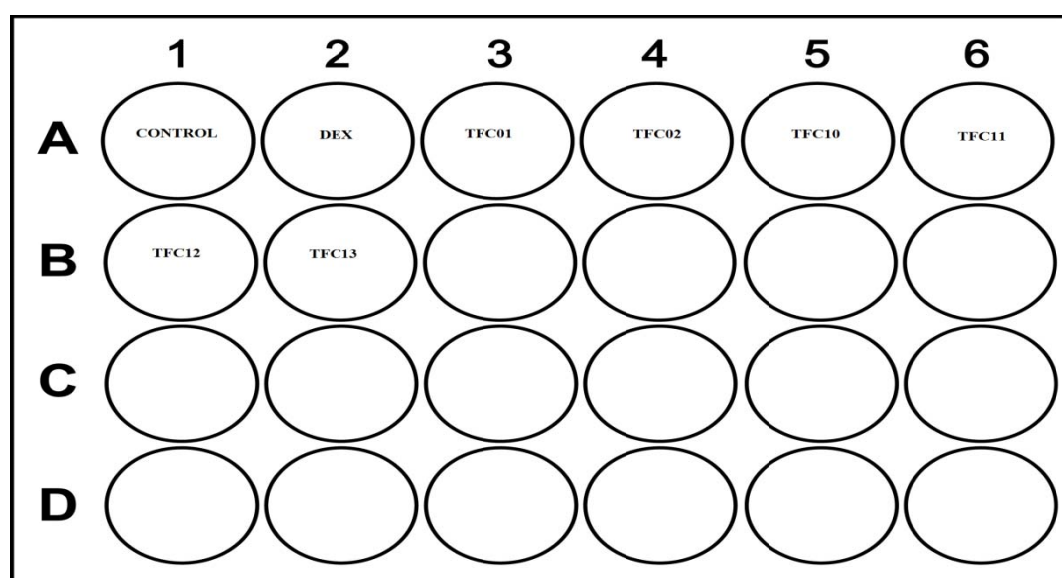
Day 0: Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και μέτρηση των κυττάρων. Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν 5.000cells/well. Άρα $5.000\text{cells} \times 8\text{wells} = 40.000\text{cells}$.

Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε DMEM cis (0.5ml/well), κι ακολούθησε διανομή στα πηγαδάκια στα οποία έχουν προηγουμένως προστεθεί οι καλυπτρίδες. Το plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο για επώαση.

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

- ✓ Mix: 3.5 ml DMEM cis + 0.7μl CMX 200nM (1:5.000)
- ✓ Control: 300μl Mix + 0.3μl EtOH 100% + 0.3μl DMSO
- ✓ Dex: 300μl Mix + 0.3μl DEX 10^{-3}M + 0.3μl DMSO
- ✓ Δείγματα με BAs: 300μl Mix + 0.3μl EtOH 100% + 0.3μl υπό εξέταση BA

Το θρεπτικό που υπάρχει μέσα στα wells απομακρύνεται και αντικαθίσταται από 300μl κάθε δείγματος [*Εικόνα 17*]. Ακολούθησε τοποθέτηση του plate στον επωαστήρα, κι επώαση των κυττάρων με τις ουσίες για 2h



Εικόνα 17: Εικόνα του 24well-plate μετά την προσθήκη των δειγμάτων.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να δοθούν κάποιες διευκρινήσεις για τη σύσταση των δειγμάτων. Ξεκινώντας από το DEX, να αναφερθεί πως 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 (Valsala Haridas, 2011). Πρακτικά, η DEX είναι διαλυμένη σε EtOH 100% και αποθηκεύεται στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM. Στα πειράματα, χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1μM. Συνεχίζοντας, τα BAs είναι διαλυμένα σε DMSO και φυλάσσονται στους -20°C σε συγκέντρωση 10mM και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 10μM. Όσον αφορά το CMXROS (CMX) αποτελεί ζωτική χρωστική, η οποία ενσωματώνεται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. 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. Το CMX αποθηκεύεται στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 200nM. Κλείνοντας την παρένθεση αυτή, να αναφερθεί πως η σύσταση του Mix υπολογίστηκε για 11wells, κι όχι για 8wells που ήταν και ο αριθμός των δειγμάτων. Αυτό συνέβη καθώς για τα Control και DEX χρησιμοποιήθηκε διπλάσιος αριθμός καλυπτρίδων – δηλαδή δύο Control και δύο DEX-καθαρά για πρακτικούς λόγους. Με άλλα λόγια τα υπό εξέταση δείγματα ήταν 10, και ο υπολογισμός έγινε για ένα παραπάνω.

Μόλις πέρασε το διάστημα των 2h, το plate απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα. Πλέον, η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται στον πάγκο του εργαστηρίου, όπου και εφαρμόζεται το πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων.

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 20min και ψύξη στους -20°C . Έπειτα, αφαιρείται η μεθανόλη και γίνεται προσθήκη ακετόνης για 2min. Κατά τη διάρκεια και αυτής της επώασης το plate τοποθετείται στους -20°C . Στη συνέχεια, αφαιρείται η ακετόνη και στο plate τοποθετείται παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1×. Η πλύση αυτή διαρκεί 1h και κατά τη διάρκεια της το plate τοποθετείται στους 4°C . Μετά το πέρας της 1h, γίνονται 2 επιπλέον πλύσεις με PBS 1×. Με άλλα λόγια, μετά την προσθήκη ακετόνης γίνονται 3 πλύσεις με PBS 1×. Τα βήματα αυτά αποσκοπούν στην όσο το δυνατόν καλύτερη αφαίρεση της ακετόνης από τα πηγαδάκια, καθώς η παρουσία της προκαλεί διάβρωση του plate και δυσκολεύει την επακόλουθη μετακίνηση των καλυπτρίδων. Μόλις γίνει η τελευταία πλύση με PBS 1×, γίνεται απομάκρυνση των καλυπτρίδων από τα πηγαδάκια και τοποθέτηση τους στο δικτυωτό. Στο σημείο αυτό, μπαίνει και το 1^ο αντίσωμα, το οποίο στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αντίσωμα έναντι του GR. Έγινε χρήση του GR-H300 σε αραίωση 1/50 (GR-H300/PBST). Στην επιφάνεια κάθε καλυπτρίδας γίνεται απόχυση 25-30μl αντισώματος. 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. Για τον

ίδιο λόγο πριν την μεταφορά τους πίσω στα πηγαδάκια, γίνεται απομάκρυνση της περίσσειας του αντισώματος πάνω σε χαρτί. Στο σημείο αυτό, γίνεται προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος το οποίο αποτελείται από:

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

Η επώαση με το 2^ο αντίσωμα διήρκησε 1h, σε RT απουσία φωτός. Μετά το πέρας της 1h, τα coverslips επανατοποθετούνται στο plate, δίνοντας πάντα την ανάλογη προσοχή, 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 η 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 διαθέτει το τμήμα είναι το DM 2000 της εταιρίας LEICA κι είναι εξοπλισμένο με Qimaging optiMOS κάμερα, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη.

2.4 Western- Blot Analysis

2.4.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Day 0: Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και μέτρηση κυττάρων HeLa και HepG2. Έγινε στρώσιμο κυττάρων σε δύο 6wells-plates, όπου προστέθηκαν 150.000cells/well. Άρα, χρειάστηκαν $150.000 \times 12 = 1.800.000$ cells, τα οποία ήταν διαλυτοποιημένα σε DMEM cis (2ml/well). Τα κύτταρα αυτά θα αποτελέσουν πηγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για την ανοσοαποτύπωση Western.

Day 3: Αφαίρεση DMEM cis και προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών στα wells. Η σύσταση των ουσιών δίνεται παρακάτω, κι όπως ήταν αναμενόμενο κινείται σε παρόμοια πλαίσια με αυτή των δειγμάτων της ανοσοϊστοχημείας. Μοναδική διαφορά, εκτός από τις ποσότητες, είναι η απουσία CMX.

- ✓ Control: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl DMSO + 1.9μl EtOH 100%
- ✓ DEX: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl DMSO + 1.9μl DEX 10^{-3} M
- ✓ Δείγματα με BAs: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl υπό εξέταση BA + 1.9μl EtOH 100%

Τα δύο 6wells-plates με τα κύτταρα και τις ουσίες πλέον, τοποθετούνται στον επωαστήρα στις προκαθορισμένες πάντα συνθήκες των 37°C και 5% CO₂ για 48-72h. Μόλις περάσει αυτό το χρονικό διάστημα, απομακρύνονται από τον χώρο των

κυτταροκαλλιιεργειών και μεταφέρονται στο εργαστήριο, όπου και συνεχίζεται τη υπόλοιπη διαδικασία. Τα πάντα από εδώ και πέρα γίνονται στον πάγο.

Συλλογή των κυττάρων

Αρχικά γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού από τα πηγαδάκια και μία πλύση με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1× (1ml/well). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το PBS 1× από τα wells και προστίθεται η ίδια ποσότητα διαλύματος PBS 1×. Με τη χρήση ειδικού scraper (για 1× και 6×wells-plates) γίνεται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα και το εσωτερικό των wells, κι ακολουθεί η μεταφορά του κάθε δείγματος σε αριθμημένο erpendorf του 1.5ml. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα προστίθεται μία επιπλέον ποσότητα, περίπου 250μl PBS 1×, κι επαναλαμβάνεται ότι περιγράφηκε. Το βήμα αυτό, γίνεται προκειμένου να διασφαλιστεί η πλήρης αποκόλληση-συλλογή των κυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων στα 1.200rpm για 6min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα που προέκυψε είτε μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C ή διαλυτοποιείται εκείνη τη στιγμή σε Lysis Buffer.

Λύση των κυττάρων

Όπως ήδη αναφέρθηκε το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε Lysis Buffer (LB), το οποίο αποτελείται από:

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

Τα 4 αυτά αντιδραστήρια συγκροτούν το Buffer A, το οποίο φυλάσσεται στους 4°C. Στο 1ml του διαλύματος αυτού προστίθενται:

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

Η ποσότητα του LB που θα προστεθεί σε κάθε erpendorf γίνεται εμπειρικά κι εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος. Συνήθως προστίθεται ποσότητα των 50-70μl. Τα κύτταρα επωάζονται με το LB για διάστημα 40-60min. Αποφεύγονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, λόγω της ύπαρξης του PMSF στο διάλυμα.

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το βήμα αυτό γίνεται μέσω υπερήχων. Τα κύτταρα υφίστανται 4-6 κύκλους sonication διάρκειας 1sec στο 40% ATT, με ενδιάμεσα διαστήματα παύσεων διάρκειας 28-30sec.

Ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα παραπάνω στάδια έγινε με τη μέθοδο Bradford, μέσω της οποίας είναι δυνατός ποσοτικός προσδιορισμός δειγμάτων με συγκέντρωση 1-1.500mg/ml. Η μέθοδος αυτή είναι χρωματική και στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων Coomassie Brilliant BlueG-250. Σε όξινο περιβάλλον, η χρωστική αυτή αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, δίνοντας έτσι ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης. Στην κατάσταση αυτή η χρωστική αποκτά τη μπλε ανιονική μορφή της, ενώ το σύμπλοκο που προκύπτει εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα στα 595nm, από τα 365nm που την εμφάνιζε αρχικά. Αύξηση στη τιμή της απορρόφησης στα 595nm υποδεικνύει αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη. Γενικά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford είναι αρκετά αξιόπιστα και εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα, δύο χαρακτηριστικά την οποία την καθιστούν την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο στα περισσότερα εργαστήρια (*Bradford MM., 1976*).

Αρχικά, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη βάση της οποίας θα γίνει η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Σε όγκο 20μl του εκάστοτε πρότυπου δείγματος προστίθενται 980μl αντιδραστηρίου Bradford (Bio-Rad) τελικής συγκέντρωσης 1×. Ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων και επώαση τους για 30min στο σκοτάδι σε RT. Μετά το πέρας των 30min, έγινε ανάδευση των δειγμάτων και φωτομέτρηση στα 595nm. Στον **Πίνακα 4** που ακολουθεί δίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA.

Πίνακας 4: Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA.

BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1× (μl)	BSA (μg)	BSA (μg/ml)
0	20	980	0	0
1	19	980	1	1
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

Οι τιμές που προέκυψαν, έδωσαν μία εξίσωση στο καρτεσιανό επίπεδο, όπου στον άξονα τον χ'χ αντιστοιχούν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και στον γ'γ οι οπτικές απορροφήσεις στα 595nm. Με βάση την εξίσωση αυτή είναι δυνατή η εύρεση της συγκέντρωσης κάθε δείγματος εκφρασμένης σε μg/ml.

Για το κάθε δείγμα, έγινε η εξής διαδικασία: Αρχικά, προστέθηκε 1μl του υπό εξέταση δείγματος στον πάτο ενός αριθμημένου erpendorf και στη συνέχεια στο ίδιο erpendorf προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1×. Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 20min, σε RT απουσία φωτός. Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 595nm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης και κατ' επέκταση της σύστασης του κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί. Στους πίνακες που ακολουθούν (*Πίνακας 5* και *Πίνακας 6*) δίνεται η σύσταση των δειγμάτων HeLa και HepG2, αντίστοιχα, που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν (επόμενο στάδιο).

Πίνακας 5: Σύσταση των δειγμάτων HeLa που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν.

BA s	OD₅₉₅	Συγκέντρωση πρωτεΐνης (ug)	Ποσότητα πρωτεΐνης σε δείγμα (μl)	Tris pH 7.5 20mM (μl)	Ποσότητα S.B 4× (μl)
Control	0.412	11.64928	17.16845	42.83	20
DEX	0.394	11.12754	17.97343	42.03	20
TFC01	0.368	10.37391	19.27913	40.72	20
TFC02	0,437	12,37391	16,16304	43,84	20
TFC10	0,498	14,14203	14,14224	45,86	20
TFC11	0,384	10,83768	18,45413	41,55	20
TFC12	0,426	12,05507	16,59053	43,41	20
TFC13	0,467	13,24348	15,10177	44,90	20

Πίνακας 6: Σύσταση των δειγμάτων HepG2 που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν.

BA s	OD₅₉₅	Συγκέντρωση πρωτεΐνης (ug)	Ποσότητα πρωτεΐνης σε δείγμα (μl)	Tris pH 7.5 20mM (μl)	Ποσότητα S.B 4× (μl)
Control	0,245	6,808696	29,3742	30,63	20
DEX	0,182	4,982609	40,13962	19,86	20
TFC01	0,145	3,910145	51,149	8,85	20
TFC02	0,205	5,649275	35,40277	24,60	20
TFC10	0,192	5,272464	37,93293	22,07	20
TFC11	0,142	3,823188	52,31236	7,69	20
TFC12	0,164	4,46087	44,83431	15,17	20
TFC13	0,185	5,069565	39,45111	20,55	20

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν φυλάσσονται στους -20°C, ενώ τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στους -80°C.

2.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS PAGE)

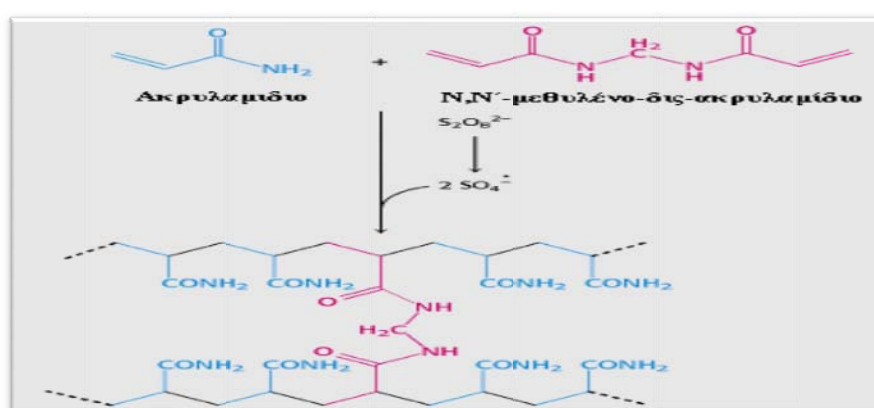
Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης με εφαρμογές σε ποικίλα επιστημονικά πεδία. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός

δείγματος, καθώς και για το διαχωρισμό μειγμάτων μορίων, τα οποία δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει οποιοδήποτε μόριο το οποίο φέρει φορτίο. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων (Sambrook J, 2000).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται επειδή το υλικό της είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών, ιονικής ισχύος και επειδή η παρασκευή της είναι απλή.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή τους (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18: Η αντίδραση σχηματισμού πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το N,N,N,'N'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Επομένως, η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί απουσία O₂, αφού το τελευταίο μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (sodium dodecyl sulfate) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο και έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας.

Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη ή με θέρμανση στους 100 °C. Τα βήματα αυτά γίνονται έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τον Laemmli. Πρόκειται για μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0.1 μg πρωτεΐνης ανά ταινία. Εναλλακτικά, η χρώση μπορεί να γίνει με χρώση αργύρου, η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (ικανότητα ανίχνευσης ng πρωτεΐνης). Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, καθώς η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, συγκριτικά με την Coomassie Blue.

Ωστόσο, στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν έγινε χρώση της πηκτής αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, καθώς το ζητούμενο δεν ήταν η ταυτοποίηση κάποια πρωτεΐνης αλλά η ανοσοαποτύπωση Western. Όλα τα βήματα της ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western δίνονται αναλυτικά παρακάτω.

Πειραματική διαδικασία

Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού συγκέντρωσης 10%, καθώς στη συγκεκριμένη πυκνότητα γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 17-70kDa. Στον **Πίνακα 7** που ακολουθεί δίνεται η σύσταση των πηκτών διαχωρισμού και επιστοίβαξης.

Πίνακας 7: Σύσταση των πηκτών διαχωρισμού & επιστοίβαξης

Πηκτή Διαχωρισμού (10%)		Πηκτή Επιστοίβαξης	
ddH₂O	2.425ml	ddH₂O	2.025ml
Tris-HCl 1.5M	1.25ml	Tris-HCl 1.5M	0.21ml
pH 8.8		pH 6.8	
SDS 10%	50μl	SDS 10%	25μl
Bis- Acrylamide	1.25ml	Bis- Acrylamide	0.25ml
40%		40%	
APS 10%	25μl	APS 10%	12.5μl
TEMED	2.5μl	TEMED	2.5μl

Πριν γίνει η φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή επιστοίβαξης, απαιτείται θέρμανσή τους στους 95°C για 5min, αν ηλεκτροφορούνται για πρώτη φορά. 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 φυγοκέντρωση διάρκειας δευτερολέπτων, στη μέγιστη ταχύτητα, έτσι ώστε τα δείγματα να έχουν ομοιογενή σύσταση πριν τη φόρτωση στην πηκτή. Στο σημείο αυτό, γίνεται 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×.

➤ Σύσταση Running Buffer 1×:

1. 900ml dH₂O
2. 100ml Running Buffer 10×
3. 10ml SDS 10%

➤ Σύσταση Running Buffer 10×:

1. Tris HCl 0.25M
2. Γλυκίνη 1.92M

2.4.3 Ανοσοαποτύπωση Western

Αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από την ειδική συσκευή, απορρίπτεται η πηκτή επιστοίβαξης και το υπόλοιπο τμήμα της τοποθετείται

για εξισορρόπηση σε παγωμένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κάποιες φορές (used). Ταυτόχρονα, εξισορροπείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τέσσερα χαρτιά νιτροκυτταρίνης (W.B. filter papers) και δύο υδροαπορροφητικά σφουγγάρια σε μη χρησιμοποιημένο Trasfer Buffer (new). Να τονιστεί πως οι διαστάσεις όλων των παραπάνω είναι ίσες με το νέο μέγεθος της πηκτής. Η εξισορρόπηση διαρκεί 10-15min.

Αμέσως μόλις περάσει αυτό το χρονικό διάστημα, τοποθετούνται όλα τα παραπάνω στην ειδική κασέτα ηλεκτρομεταφοράς σε μία διάταξη τύπου sandwich. Η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βρίσκονται κεντρικά αυτής της διάταξης, έχοντας άμεση επαφή μεταξύ τους. Από τη στιγμή που θα τοποθετηθεί η μεμβράνη πάνω στην πηκτή δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην απομάκρυνση φυσαλίδων από το σύστημα, καθώς η ύπαρξή τους μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη. Η απομάκρυνση των φυσαλίδων γίνεται με εφαρμογή ελαφριάς πίεσης.

Η ειδική κασέτα τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με διάταξη τέτοια ώστε να ευνοείται η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη. Το όλο σύστημα τοποθετείται σε ένα κουτί από διογκωμένο πολυστυρένιο, μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί μεγάλη ποσότητα πάγου ή 5 περίπου παγοκύστες. Αυτό αποσκοπεί στην διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα όσο χρόνο διαρκέσει η ηλεκτρομεταφορά. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα παρουσία φρέσκου Transfer Buffer σε συνθήκες σταθερής έντασης ρεύματος, στα 0.35A, για 70min. Να υπογραμμιστεί πως η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς μεταβάλλεται όταν χρησιμοποιείται Transfer Buffer διαφορετικής σύστασης ή πηκτή διαφορετικής συγκέντρωσης.

➤ Σύσταση Transfer Buffer 1×:

1. 695ml dH₂O
2. 200ml μεθανόλη 100%
3. 100ml Running Buffer 10×
4. 5ml SDS 10%

Μετά το πέρας των 70min, ακολουθεί μία έκπλυση της μεμβράνης με PBST 1× και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη σημείωση των ζωνών του marker. Το βήμα αυτό γίνεται με μολύβι και δίνεται πολύ μεγάλη προσοχή και στο να σημειωθούν σωστά οι μπάντες αλλά και στο να μην καταστραφεί η μεμβράνη από τη μύτη του μολυβιού. Μετά τη σύντομη αυτή πλύση, γίνεται επώαση της μεμβράνης με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% σε PBST 1× για 1h, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση. Η επώαση αυτή προκειμένου να αποκλειστούν οι θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος (blocking).

Μετά το πέρας της 1h, η μεμβράνη μπορεί είτε να αποθηκευτεί στους -20°C ή να επωαστεί εκείνη τη στιγμή με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Τα πρωτογενή, δευτερογενή αντισώματα και το γάλα διαλυτοποιούνται σε

PBST X 1 διαλυτοποιημένο σε ddH₂O, ενώ στις εκπλύσεις σε PBST X 1 διαλυτοποιημένο σε dH₂O.

➤ Σύσταση PBST 1×:

1. 450ml dH₂O ή ddH₂O
2. 50ml PBS 10 ×
3. 0.5-1ml Tween-20

➤ Σύσταση PBS 10×:

1. Na₂HPO₄ 1M
2. KH₂PO₄ 20mM
3. NaCl 1.37M
4. KCl 20mM

Σε κάθε περίπτωση, είτε δηλαδή ψυχθεί στους -20°C ή χρησιμοποιηθεί εκείνη τη στιγμή, πριν γίνει η προσθήκη του πρωτογενούς πραγματοποιείται μία πλύση με PBST 1×. Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος και η μεμβράνη επωάζεται με αυτό O/N, 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. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει ειδικά συγκεκριμένους IgG σταθερούς επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος και ταυτόχρονα είναι χημικά σημασμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) ο οποίος επιτρέπει την ανίχνευση του. Τόσο τα πρωτογενή όσο 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 2-3h, σε RT και υπό ανάδευση. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος γίνονται 3 πλύσεις με PBST 1× διάρκειας 5min (η τελευταία πλύση είθισται να διαρκεί 10min και γίνεται με PBST 1× με ddH₂O).

Επόμενο στάδιο είναι η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Για την αντίδραση εμφάνισης σήματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Pierce, όπου περιλαμβάνονται τα διαλύματα ECLA και ECLB. Γίνεται ανάμιξη ίσου όγκου των δύο διαλυμάτων και προσθήκη στην μεμβράνη. Η επώαση της μεμβράνης με τα ECLA και ECLB διαρκεί 3 min και γίνεται στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Να σημειωθεί πως η ποσότητα που θα προστεθεί από τα δύο διαλύματα καθορίζεται από τον ερευνητή κι έχει να κάνει με το μέγεθος της μεμβράνης. Μόλις περάσει το διάστημα των 3min, η μεμβράνη τοποθετείται στο εσωτερικό μίας πλαστικής μεμβράνης 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 κατάλληλων διαστάσεων έρχεται σε άμεση επαφή με την 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, επώαση του φιλμ διάρκειας 1min με διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) και σύντομη πλύση με νερό.

➤ Σύσταση Developer/ Fixer

1. 45ml Developer/Fixer
2. 127.5ml dH₂O

Μόλις τελειώσει η διαδικασία της εμφάνισης, η μεμβράνη εκπλένεται με PBST 1×για περίπου 10-15min έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ECL. Στο στάδιο αυτό μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για νέο κύκλο εμφανίσεων ή να αποθηκευτεί στους -20°C.

2.4.4 Western Blot για PEPCK, GR, Caspase 3, Caspase 9 & β-actin

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιχειρήθηκε να διαλευκανθεί ο ρόλος των Bas στην GR σηματοδότηση. Με βάση, λοιπόν, το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν με τη βοήθεια της Western Blot analysis η επίδραση των τριτερπενοειδών αυτών σε ορισμένα ένζυμα κλειδιά του μεταβολισμού και της απόπτωσης, όπου αποδεδειγμένα εμπλέκονται τα γλυκοκορτικοειδή μέσω του υποδοχέα τους.

Δεδομένων των δομικών ομοιοτήτων των Bas με τα GCs μελετήθηκε η επιρροή των πρώτων στα μεταγραφικά επίπεδα του γλυκονεογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK). Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PEPCK H-300 σε αραίωση 1/1.000, και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το rHRP της εταιρίας Pierce σε αραίωση 1/2.500.

Προκειμένου να διαπιστωθεί, κατά πόσο τα Bas δεσμεύονται ή όχι στον GR, κι επομένως έχουν ή όχι κάποια δράση μέσω αυτού του μονοπατιού πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western και για τον υποδοχέα. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GR H-300 σε αραίωση 1/1.000, και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το rHRP της εταιρίας Pierce σε αραίωση 1/100.000.

Δεδομένων των αντικαρκινικών ιδιοτήτων που έχουν αποδοθεί στα BAs, κι ειδικότερα της επαγωγής της απόπτωσης, με τη βοήθεια της ανοσοαποτύπωσης μελετήθηκαν τα επίπεδα των κασπασών 3 και 9, παρουσία κι απουσία DEX και κάτω υπό την επίδραση των BAs. Υπενθυμίζεται, πως η κασπάση 3 αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο (Slee EA, 2001). Όσον αφορά την κασπάση 9, υπενθυμίζεται πως είναι εκείνη που πρωτεολύει κι επομένως προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 στο ενδογενές μονοπάτι. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Caspase 3 E₂₇ της εταιρίας Abcam και η cleaved Caspase 9 (9505) της Cell Signalling. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν και στις δύο περιπτώσεις rHRP της εταιρίας Pierce με αραίωση 1/5.000.

Όσον αφορά την β-actin, να αναφερθεί πως αποτελεί μία από τις έξι διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης που έχει ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Οι ακτίνες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική κίνηση, δομή και ακεραιότητα (Gunning P, 1997). Η β-actin χρησιμοποιείται στην ανοσοαποτύπωση Western ως μάρτυρας ισοφόρτωσης (loading control) των δειγμάτων. Βάση της β-ακτίνης, γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή των συμπερασμάτων από την ανοσοαποτύπωση αυτή.

2.5 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Για τις ανάγκες των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa με εξωγενές γενετικό υλικό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των λιποσωμάτων. Με βάση τη μέθοδο αυτή, το εξωγενές γενετικό υλικό βρίσκεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της λιπιδικής φύσης της μεμβράνης.

Έγινε χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA/χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1/1. Να τονιστεί πως έγινε επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου διαμόλυνσης αλλά και του συγκεκριμένου λόγου DNA/λιποφεκταμίνη μετά από δοκιμαστικά test διαμόλυνσης όπου εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες. Τα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων HeLa χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, με βάση τα χρησιμοποιούμενα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά και βέβαια το σκοπό εκτέλεσης κάθε πειράματος. Στην επόμενη υποενότητα δίνεται η διαδικασία απομόνωσης των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και στις επόμενες υποενότητες ακολουθεί αναλυτική περιγραφή του κάθε πειράματος.

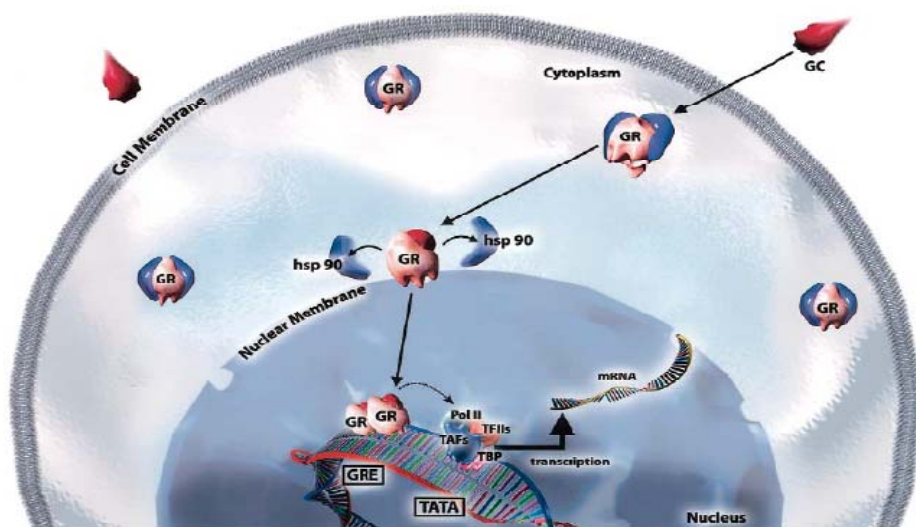
2.5.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων

Όλη η παρακάτω διαδικασία έγινε στον πάγκο του εργαστηρίου παρουσία αναμένου λύχνου για την επίτευξη ημιστείρων συνθηκών και σε καμία περίπτωση δεν γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών. Αρχικά, έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* στελέχους DH5a™ (Life Technologies- Invitrogen) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Να αναφερθεί πως τα κύτταρα αυτά βρίσκονται αποθηκευμένα σε 30-40% γλυκερόλη στους -20°C. Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5ml) το οποίο περιέχει 80μl από τα κύτταρα αυτά, έγινε εισαγωγή 1μl του επιθυμητού πλασμιδίου, το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο στους -20°C σε γλυκερόλη. Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 30min τουλάχιστον και στη συνέχεια το erpendorf επώαστηκε σε υδατόλουτρο για 1min στους 42°C. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε για 2min στους 4°C και ακολούθησε η προσθήκη 1ml αποστειρωμένου LB Broth. Έπειτα, επώαστηκε στους 37°C για 1h και κατόπιν έγινε επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τρυβλίο, το οποίο περιέχει αντιβιοτικό, αμπικιλίνη ή καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100mg/ml ή 50mg/ml, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια γυάλινου διανομέα έγινε η διασπορά των κυττάρων στο τρυβλίο, κι έπειτα επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 16h.

Μετά το πέρας των 16h, έγινε απομόνωση κι καθαρισμός των νέων πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN (QIAGEN® 2012) κάνοντας χρήση το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλής καθαρότητας και επαρκούς συγκέντρωσης για τα πειράματα διαμόλυνσης. Ο έλεγχος καθαρότητας καθώς και η ποσοτικοποίηση του pDNA έγινε με φωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1/200. Τέλος, τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

2.5.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40- β Gal & pMMTV-GRE-Luc

Στο πρώτο πείραμα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSV40- β Gal και pMMTV-GRE-Luc σε αρχικές συγκεντρώσεις 920ng/μl και 882ng/μl, αντίστοιχα. Σκοπός του πειράματος ήταν να εξακριβωθεί το κατά πόσο τα υπό εξέταση BAs μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μετά από πρόσδεση τους στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) που εντοπίζονται πάνω στον υποδοχέα. Δίνεται η **Εικόνα 19**, η οποία δείχνει αναλυτικά αυτόν τον μηχανισμό.



Εικόνα 18: Η μεσολαβούμενη από GCs ενεργοποίηση της μεταγραφής. Πριν τη δέσμευση του GC, ο GR υφίσταται στο κυτταρόπλασμα ως ένα μεγάλο σύμπλοκο αποτελούμενο από πολλές μονάδες, μεταξύ των οποίων και 2 μόρια hsp90. Μετά την ενεργοποίησή του, που οφείλεται στη δέσμευση της ορμόνης GC, ο GR αποδεσμεύεται από τις πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Στον πυρήνα ο GR δεσμεύεται ως ομοδιμερές σε συγκεκριμένη παλινδρομική ακολουθία DNA, που ονομάζεται GRE. Η αλληλουχία αυτή εντοπίζεται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων. Το δεσμευμένο GR ομοδιμερές αλληλεπιδρά με τον βασικό μεταγραφικό μηχανισμό που απεικονίζεται κι είναι συνδεδεμένος με το πλαίσιο TATA. Το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο περιλαμβάνει την TATA-δεσμευτική πρωτεΐνη, τους μεταγραφικούς παράγοντες TAFs και TFIIIs και την RNA πολυμεράση II (pol II). Η αλληλεπίδραση μεταξύ του GR και της βασικής μεταγραφικής συσκευής ενισχύει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου του GR (Leung DY, 2003).

Για τον λόγο αυτό, η όλη διαδικασία γίνεται παρουσία κι απουσία δεξαμεθαζόνης, η οποία αποδεδειγμένα προσδένεται στον υποδοχέα, προκαλώντας την μετατόπιση του στον πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατή και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη σχέση των BAs με τη δεξαμεθαζόνη, δηλαδή μπορεί να απαντηθεί το ερώτημα αν δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά παρουσία DEX.

Πειραματική διαδικασία

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο 2 δύο 24wells-plates (48wells) για transfection με pSV40- βGal και pMMTV-GRE-Luc. Ο πληθυσμός των κυττάρων ήταν 50.000cells/well. Για το στρώσιμο των 2×24wp χρησιμοποιήθηκε DMEM cis.

Day 1: Transfection των κυττάρων με pSV40- βGal και pMMTV-GRE-Luc σε συγκεντρώσεις 0.15 μgr/well και 0.15 μgr/well, αντίστοιχα. Πριν ξεκινήσει η όλη διαδικασία γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού που βρίσκονται τα κύτταρα με το θρεπτικό της διαμόλυνσης, το OPTIMEM στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή αντιβιοτικού. Σε κάθε well τοποθετούνται 200μl OPTIMEM και τα plates επανατοποθετούνται στον επωαστήρα μέχρι να γίνει η διαμόλυνση τους με το εξωγενές γενετικό υλικό. Το βήμα αυτό γίνεται έτσι ώστε τα κύτταρα να συνηθίσουν στις νέες συνθήκες- στην προκειμένη περίπτωση στο νέο θρεπτικό- κι έτσι να γίνει πιο εύκολα ο μετασχηματισμός. Γι αυτό το λόγο, αυτή η αλλαγή συνίσταται να γίνει 1-2 ώρες περίπου πριν το transfection.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, χρησιμοποιείται λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA/χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1/1. Συνολικά, γίνεται εισαγωγή 0.3 μgDNA/well- 0.15 μg από το κάθε πλασμίδιο- και με βάση την αναλογία 1/1 προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης. Για τις ανάγκες του transfection μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής έγιναν και για τα 2×24wp 2Mix:

MixI: 1250μl OPTIMEM + 8.15μl pSV40- βGal (920ng/μl) + 8.5μl pMMTV-GRE-Luc (882ng/μl).

MixII: 1250μl OPTIMEM + 15μl lipofectamine.

Γίνεται ανάμιξη των 2Mix, κι ειδικότερα το MixI μεταφέρεται στο σωληνάριο που περιέχει το MixII. Ακολουθεί επώαση του νεοσχηματιζόμενου Master-mix στο σκοτάδι για 5-10min. Ακολουθεί, εισαγωγή 50μl από το Master-mix σε κάθε well, αφού σκοπός είναι η προσαρμογή του τελικού όγκου κάθε well στα 250μl. Στη συνέχεια τα plates επιστρέφουν στον επωαστήρα όπου κι επωάζονται για 4h. Μετά το πέρας των 4h, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού με DMEM cis. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον επωαστήρα με το νέο θρεπτικό για 48h.

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 2×24wp. Τα plates χωρίζονται στα δύο ανάλογα με το αν στα δείγματα υπάρχει ή όχι DEX. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το σχεδιάγραμμα του ενός plate, κι ανάλογη είναι κι αυτή του 2^{ου}. Όπου x,y και z είναι οι κωδικοί αριθμοί για το υπό εξέταση BA.

-DEX			+DEX		
Control ₁	Control ₂	Control ₃	DEX ₁	DEX ₂	DEX ₃
TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃	TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃
TFCy ₁	TFCy ₂	TFCy ₃	TFCy ₁	TFCy ₂	TFCy ₃
TFCz ₁	TFCz ₂	TFCz ₃	TFCz ₁	TFCz ₂	TFCz ₃

Προκειμένου, να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση των πειραματικών σφαλμάτων, έγιναν 2 (Master) Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι δεξαμεθαζόνη. Χρήση αυτών των μιχοδήγησε και στη δημιουργία των δειγμάτων.

- I. Mix DEX⁻ : 6.5ml DMEM cis + 0.75μl EtOH 100%
- II. Mix DEX⁺ : 6.5ml DMEM cis + 0.75μl DEX 10⁻³ M

Control: 750μl Mix DEX⁻ + 0.75μl DMSO

DEX: 750μl Mix DEX⁺ + 0.75μl DMSO

TFC_{X,Y,Z}DEX⁻ : 750μl MixDEX⁻ + 0.75μl TFC_{X,Y,Z}

TFC_{X,Y,Z}DEX⁺ : 750μl MixDEX⁺ + 0.75μl TFC_{X,Y,Z}

Σε κάθε well γίνεται εισαγωγή 250μl του αντίστοιχου δείγματος. Τα plates τοποθετούνται στον επωαστήρα για 6h.

Μετά το πέρας των 6h, γίνεται η λύση των κυττάρων. Αρχικά, γίνεται απομάκρυνση των ουσιών κι έκπλυση των wells με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1×. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 70μl/well παγωμένου Lysis Buffer 1× (υπάρχει σε stock σε συγκέντρωση 5×). Στη συνέχεια, τα plates επωάζονται για 30min στους 4°C σε ήπια ανάδευση. Ακολουθεί αποκόλληση του περιεχομένου κάθε well μέσω απόξεσης με tip και τοποθέτησή του σε αριθμημένο σωληνάριο τύπου eppendorf (1.5ml). Τα eppendorf φυγοκεντρούνται για 30min στους 4°C σε 13.500rpm. Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο -σε νέο αριθμημένο eppendorf χωρητικότητας 1.5ml- κι αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την εκτέλεση των δοκιμασιών λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης.

2.5.3 Πρωτόκολλο λουσιφεράσης

Η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από των υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αφού εντοπίζεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει GRE αλληλουχίες. Χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς και δίνει πληροφορίες σχετικά με τη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν υποστεί transfection.

Η μέθοδος στηρίζεται στην ανίχνευση φωτός που παράγεται από την οξείδωση της χρωστικής λουσιφερίνη. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας είναι η ακόλουθη:



Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση και γίνεται σε 2 στάδια, στα οποία είναι παρόντες συμπαραγόντες όπως το ATP. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο της εταιρείας Berhold και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Πειραματική διαδικασία

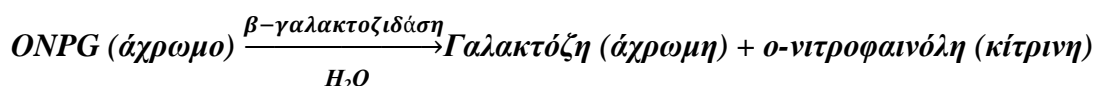
Αρχικά, αφήνονται τα δείγματα να ξεπαγώσουν από τους -80°C σε πάγο. Στη συνέχεια, γίνεται ανάμιξη 10μl του υπό εξέταση δείγματος με 100μl διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο και απαρτίζεται από τα εξής συστατικά:

1. 470μM λουσιφερίνη
2. 530Mμ ATP
3. 270μM συνένζυμο-A
4. 20Mm Tris pH 8
5. 2.67mM MgSO_4
6. 0.1mM EDTA
7. 33.3mM DTT
8. ddH₂O

2.5.4 Πρωτόκολλο β-γαλακτοζιδάσης

Σε αντίθεση με τη λουσιφεράση, το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης δεν υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Ωστόσο, ο προσδιορισμός της ενεργότητας της β-γαλακτοζιδάσης είναι απαραίτητος για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που αφορούν την έκφραση του γονιδίου της GRE-λουσιφεράσης.

Η ενεργότητα της β-γαλακτοζιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl- b-D-galactopyranoside (ONPG). Η αντίδραση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση σταματά μετά από προσθήκη NaCO_3 1M(RT) το οποίο και διαμορφώνει το pH της αντίδρασης στο 11. Στο συγκεκριμένο pH, η β-γαλακτοζιδάση είναι πλέον ανενεργή και η κίτρινου χρώματος ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή. Το έγχρωμο προϊόν προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 420nm.

Πειραματική διαδικασία

Γίνεται εισαγωγή 20μl σε νέο αριθμημένο erpendorf από το κάθε υπό εξέταση δείγμα. Σε αυτό προστίθενται 0.3μl διαλύματος ιόντων Mg^{+} 100× και 201μl διαλύματος sodium phosphate. Το πρώτο απαρτίζεται από 31.5% v/v μερκαπτοαιθανόλη, 10% v/v MgCl_2 και 58.5% v/v ddH₂O. Το δεύτερο απαρτίζεται από NaH_2PO_4 0.2M, Na_2HPO_4 0.2M και ddH₂O. Τέλος, στην αντίδραση προστίθενται 66μl από το υπόστρωμα ONPG. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς κίτρινου χρώματος. Η αντίδραση σταματά μετά από προσθήκη 500μl διαλύματος NaCO_3 1M. Ακολουθεί φωτομέτρηση των δειγμάτων στα

420nm, στην οποία χρησιμοποιείται ως τυφλό διάλυμα το οποίο περιέχει ότι περιέχουν και τα δείγματα, με τη διαφορά όμως ότι στη θέση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε Lysis Buffer.

2.5.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40- βGal & pMMTV- NF-κB-Luc

Όπως αναφέρθηκε και στο σχετικό εδάφιο της εισαγωγής, εκχυλίσματα του φυτού *Boswellia serrata* έχουν βρεθεί πως επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα με διάφορους τρόπους. Λαμβάνοντας υπόψη τις συγκεκριμένες δράσεις των BAs, και κυρίως το κομμάτι που αφορά την αναστολή του NF-κB, αποφασίστηκε να εξεταστεί η πιθανή καταστολή του NF-κB από τα εξεταζόμενα Bas μέσω GR σηματοδότησης. Υπενθυμίζεται, η **Εικόνα 10** στη σελίδα 20 όπου δίνεται αναλυτικά ο μηχανισμός καταστολής του NF-κB μέσω της GR σηματοδότησης.

Στο transfection αυτό, οι συνθήκες του πειράματος παραμένουν οι ίδιες με αυτές που προαναφέρθηκαν με μοναδικές διαφορές τις δύο παρακάτω. Στη θέση του πλασμιδίου pMMTV-GRE-Luc χρησιμοποιείται πλασμίδιο για τον NF-κB (pMMTV-NF-κB-Luc) για ευνόητους λόγους, ενώ χρησιμοποιείται το ίδιο πλασμίδιο για τη β-γαλακτοζιδάση. Αυτή η ομάδα πειραμάτων διαμόλυνσης έγινε παρουσία και απουσία TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), κι όχι δεξαμεθαζόνης, ο οποίος αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του NF-κB [(Malinin NL, 1997); (Psarra AM, 2009)]. Μέσω των πειραμάτων αυτών μελετήθηκε τόσο η πιθανή δράση των Bas μέσω της GR σηματοδότησης, όσο και η πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του TNFα και των υπό εξέταση ενώσεων.

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.2. Παρακάτω δίνεται συνοπτικά η πορεία του πειράματος κι αναγράφονται τα στοιχεία εκείνα που παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις, δηλαδή η σύσταση των Mix πριν το transfection και η σύσταση των ουσιών.

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο 2 δύο 24wells-plates (48wells) για transfection με pSV40- βGal και pMMTV-NF-κB-Luc. Ο πληθυσμός των κυττάρων ήταν 50.000cells/well. Για το στρώσιμο των 2×24wp χρησιμοποιήθηκε DMEM cis.

Day 1: Transfection των κυττάρων με pSV40-βGal και pMMTV-NF-κB-Luc σε συγκεντρώσεις 920ng/μl και 770ng/μl, αντίστοιχα.

MixI: 1250μl OPTIMEM + 8.15μl pSV40-βGal (920ng/μl) + 9.74μl pMMTV-NF-κB-Luc (882ng/μl).

MixII: 1250μl OPTIMEM + 15μl lipofectamine.

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 2×24wp. Τα plates χωρίζονται στα δύο ανάλογα με το αν στα δείγματα υπάρχει ή όχι TNFa. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το σχεδιάγραμμα του ενός plate, κι ανάλογη είναι κι αυτή του 2^{ου}. Όπου x,y και z είναι οι κωδικοί αριθμοί για τα υπό εξέταση BA.

TNFa -			TNFa+		
Control ₁	Control ₂	Control ₃	TNFa ₁	TNFa ₂	TNFa ₃
TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃	TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃
TFCy ₁	TFCy ₂	TFCy ₃	TFCy ₁	TFCy ₂	TFCy ₃
TFCz ₁	TFCz ₂	TFCz ₃	TFCz ₁	TFCz ₂	TFCz ₃

Προκειμένου, να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση των πειραματικών σφαλμάτων, έγιναν 2 (Master) Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι TNFa. Χρήση αυτών των μιχοδήγησε και στη δημιουργία των δειγμάτων.

- I. Mix TNFa⁻: 6.5ml DMEM cis + 0.75μl ddH₂O
- II. Mix TNFa⁺: 6.5ml DMEM cis + 0.75μl TNFa10μg/μl

Control: 750μl Mix DEX⁻ + 0.75μl DMSO

TNFa: 750μl Mix TNFa⁺ + 0.75μl DMSO

TFC_{X,Y,Z}TNFa⁻: 750μl Mix TNFa⁻ + 0.75μl TFC_{X,Y,Z}

TFC_{X,Y,Z}TNFa⁺: 750μl Mix TNFa⁺ + 0.75μl TFC_{X,Y,Z}

Επιπλέον, έγινε η παρασκευή μίας επιπλέον ομάδας δειγμάτων για το TFC11, στην οποία εξετάζεται η δράση της ένωσης αυτής παρουσίας του αναστολέα RU486 10⁻²M, στις δύο συνθήκες, δηλαδή παρουσίας κι απουσίας TNFa. Ο αναστολέας αυτός αποτελεί γνωστό ανταγωνιστή των γλυκοκορτικοειδών και χρησιμοποιείται σε πολλά πρωτόκολλα παροδικής διαμόλυνσης (Valsala Haridas, 2011). Η σύσταση των δύο αυτών δειγμάτων ήταν η εξής:

- ✓ TFC11 RU⁺TNF⁻: 750μl MixTNFa⁻ + 0.75μl TFC11 + 0.75μl RU486 10⁻²M.
- ✓ TFC11 RU⁺TNF⁺: 750μl MixTNFa⁺ + 0.75μl TFC11 + 0.75μl RU486 10⁻²M.

Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και τα πρωτόκολλα προσδιορισμού της λουσιφεράσης και της γαλακτοζιδάσης ακριβώς όπως περιγράφονται στα προηγούμενα εδάφια.

2.5.4 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal, pMMTV-NF-κB-Luc, PEGFPC₂ & PEGFPC₂-GR

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο εισαγωγικό τμήμα, τα γλυκοκορτικοειδή είναι ισχυροί ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες, απαραίτητοι για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Μία από τις σημαντικότερες δράσεις τους είναι η αρνητική επιρροή που ασκούν πάνω στη μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων και κυτοκινών, η έκφραση των οποίων επάγεται από ποικίλα φλεγμονώδη ερεθίσματα. Κλασικά παραδείγματα αποτελούν η IL-6 και ο TNFα (DeBosscher K, 1997).

Με βάση τα παραπάνω, γεννάται το ερώτημα του κατά πόσο ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές μπορεί να έχει μία ανάλογη δράση. Βάση ερευνών που έγιναν σε διάφορες κυτταρικές σειρές το γνωστό συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη μπορεί να καταστείλει τον NF-κB. Ειδικότερα, σε πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων HeLa με πλασμίδιο που περιείχε τον υποδοχέα GR παρατηρήθηκε καταστολή της δράσης του NF-κB από τη δεξαμεθαζόνη μέσω καταστολής της έκφρασης μίας από τις δύο υπομονάδες του παράγοντα αυτού, της p65.

Με βάση, λοιπόν, τις παραπάνω παρατηρήσεις αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η εκτέλεση ενός πειράματος διαμόλυνσης με πλασμίδιο με υπερκεφρασμένο τον υποδοχέα GR απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης και TNFα. Το πείραμα αυτό δεν έγινε για όλα τα εξεταζόμενα BAs, αλλά έγινε επιλογή εκείνου που παρουσίαζε αξιοσημείωτη αντιφλεγμονώδη δράση.

Πειραματική διαδικασία

Και αυτή η διαδικασία διαμόλυνσης, τελέστηκε με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 2.5.2. Παρακάτω, επισημαίνονται τα σημεία που παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην εκτέλεση του πειράματος. Ωστόσο, οι χρόνοι επώασης και γενικά το χρονικό πλαίσιο στην πορεία του πειράματος παραμένουν κοινά.

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο 2 δύο 24wells-plates (48wells) για transfection με pSV40-βGal, pMMTV-NF-κB-Luc, PEGFPC₂ και PEGFPC₂-GR. Ο πληθυσμός των κυττάρων ήταν 50.000cells/well. Για το στρώσιμο των 2x24wp χρησιμοποιήθηκε DMEM cis.

Day 1: Transfection των κυττάρων με pSV40-βGal, pMMTV-NF-κB-Luc, PEGFPC₂ και PEGFPC₂-GR σε συγκεντρώσεις 920ng/μl, 770ng/μl, 935ng/μl και 890ng/μl, αντίστοιχα.

Πριν την δημιουργία των 2 Mix με τα οποία θα γίνει η διαμόλυνση των plates γίνεται ένα Master-mix, από το οποίο θα προκύψουν τα δύο MixI. Δηλαδή:

Master-mix: 1250μl OPTIMEM + 8.15μl pSV40-βGal (920ng/μl) + 9.74μl pMMTV-NF-κB -Luc (882ng/μl).

Να σημειωθεί πως στο Master-mix υπάρχει συνολικά ποσότητα 0.3μgDNA/well, 0.15μg/well από το κάθε πλασμίδιο.

Το Master-mix χωρίζεται στα 2 κι έτσι προκύπτουν δύο MixI, όπου στο ένα θα προστεθεί το PEGFPC₂ πλασμίδιο, και στο άλλο το PEGFPC₂-GR πλασμίδιο. Δηλαδή:

MixI_{GR-} = 630μl Master-mix + 18.71 μl PEGFPC₂, και

MixI_{GR+} = 630μl Master-mix + 19.66 μl PEGFPC₂-GR.

- Η ποσότητα του κάθε πλασμιδίου στο αντίστοιχο MixI όπου χρησιμοποιείται είναι 0.7μg/well.

Όπως γίνεται κατανοητό, η ποσότητα του DNA που εισάγεται σε κάθε well είναι αυξημένη κατά 0.7μg, γεγονός που μεταβάλλει και τον όγκο της χρησιμοποιούμενης λιποφεκταμίνης. Επειδή η διατήρηση της αναλογίας 1/1 εξωγενούς DNA/λιποφεκταμίνη θα προϋπόθετε χρήση μεγάλης ποσότητας λιποφεκταμίνης για κάθε well, γεγονός άκρως επικίνδυνο και την ακεραιότητα και βιωσιμότητα των κυττάρων, έγινε αναπροσαρμογή του όγκου αυτού σε 1/0.6 (εξωγενές DNA/λιποφεκταμίνη).

Για τη λιποφεκταμίνη έγιναν 2 MixII (ένα για κάθε συνθήκη, δηλαδή για GR⁻/GR⁺) κοινής σύστασης. Δηλαδή:

MixII: 945μlOPTIMEM + 22.5μl λιποφεκταμίνη.

Παρακάτω δίνεται το σχεδιάγραμμα της διαμόλυνσης για το 1^ο plate. Ανάλογη εικόνα είναι και του 2^{ου}.

Διαμόλυνση με PEGFPC ₂ (Mix _{GR-})			Διαμόλυνση με PEGFPC ₂ -GR (Mix _{GR+})		

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 2×24wp. Όπως φαίνεται και στο σχεδιάγραμμα της προηγούμενης σελίδας, ήδη τα plates έχουν χωριστεί στα 2, με βάση το transfection που έχουν υποστεί. Στο πείραμα αυτό, η σύσταση- προσθήκη των ουσιών δεν αφορά 3 wells αλλά ολόκληρη σειρά, αφού στόχος είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων για τα ίδια δείγματα παρουσία κι απουσία υπερκφρασμένου GR. Επίσης, να αναφερθεί πως στο 1^ο plate δεν εισάγεται ποσότητα από το εξεταζόμενο BA καθώς στο plate αυτό θα υπάρχουν τα control της κάθε συνθήκης. Αντίθετα, το 2^ο plate περιέχει την εξεταζόμενη ουσία σε 4 εξεταζόμενες συνθήκες. Παρακάτω, δίνονται σχεδιαγραμματικά ότι μόλις περιγράφηκε.

Plate #1**Διαμόλυνση με PEGFPC₂(Mix_{GR-})**

Control ₁	Control ₂	Control ₃	Control ₁	Control ₂	Control ₃
Control+DEX ₁	Control+DEX ₂	Control+DEX ₃	Control+DEX ₁	Control+DEX ₂	Control+DEX ₃
Control+TNFa ₁	Control+TNFa ₂	Control+TNFa ₃	Control+TNFa ₁	Control+TNFa ₂	Control+TNFa ₃
Control+DEX+TNFa ₁	Control+DEX+TNFa ₂	Control+DEX+TNFa ₃	Control+DEX+TNFa ₁	Control+DEX+TNFa ₂	Control+DEX+TNFa ₃

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂-GR
(Mix_{GR+})****Plate #2****Διαμόλυνση με PEGFPC₂(Mix_{GR-})**

TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃	TFCx ₁	TFCx ₂	TFCx ₃
TFCx +DEX ₁	TFCx +DEX ₂	TFCx +DEX ₃	TFCx +DEX ₁	TFCx +DEX ₂	TFCx +DEX ₃
TFCx +TNFa ₁	TFCx +TNFa ₂	TFCx +TNFa ₃	TFCx +TNFa ₁	TFCx +TNFa ₂	TFCx +TNFa ₃
TFCx+DEX+TNFa ₁	TFCx+DEX+TNFa ₂	TFCx+DEX+TNFa ₃	TFCx+DEX+TNFa ₁	TFCx+DEX+TNFa ₂	TFCx+DEX+TNFa ₃

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂-GR
(Mix_{GR+})**

Για τις ανάγκες της παραπάνω διάταξης παρασκευάστηκαν 2 Mix, ένα για κάθε plate. Επομένως:

- ✓ Για το Plate #1: MixI → 6.5ml DMEM cis + 6.5μl DMSO
- ✓ Για το Plate #2: MixII → 6.5ml DMEM cis + 6.5μl TFCx

Η σύσταση των δειγμάτων ανάλογα με το plate που πρόκειται να προστεθούν είναι η ακόλουθη:

1. Control/TFCx: 1.5ml MixI/II + 1.5μl EtOH 100% + 1.5μl ddH₂O.
2. Control/TFCx + DEX: 1.5ml MixI/II + 1.5μl DEX 10⁻³M + 1.5μl ddH₂O.
3. Control/TFCx +TNFa: 1.5ml MixI/II + 1.5μl EtOH 100% + 1.5μl TNFa 10μM
4. Control/TFCx +DEX+ TNFa: 1.5ml MixI/II + 1.5μl DEX 10⁻³M+ 1.5μl TNFa 10μM.

Ακολούθησε προσθήκη 250μl δείγματος στο αντίστοιχο well και εφαρμόστηκαν τα πρωτόκολλα λύσης, λουσιφεράσης και β-γαλακτοζιδάσης ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που περιγράφονται στις σχετικές υποενότητες.

3. Αποτελέσματα

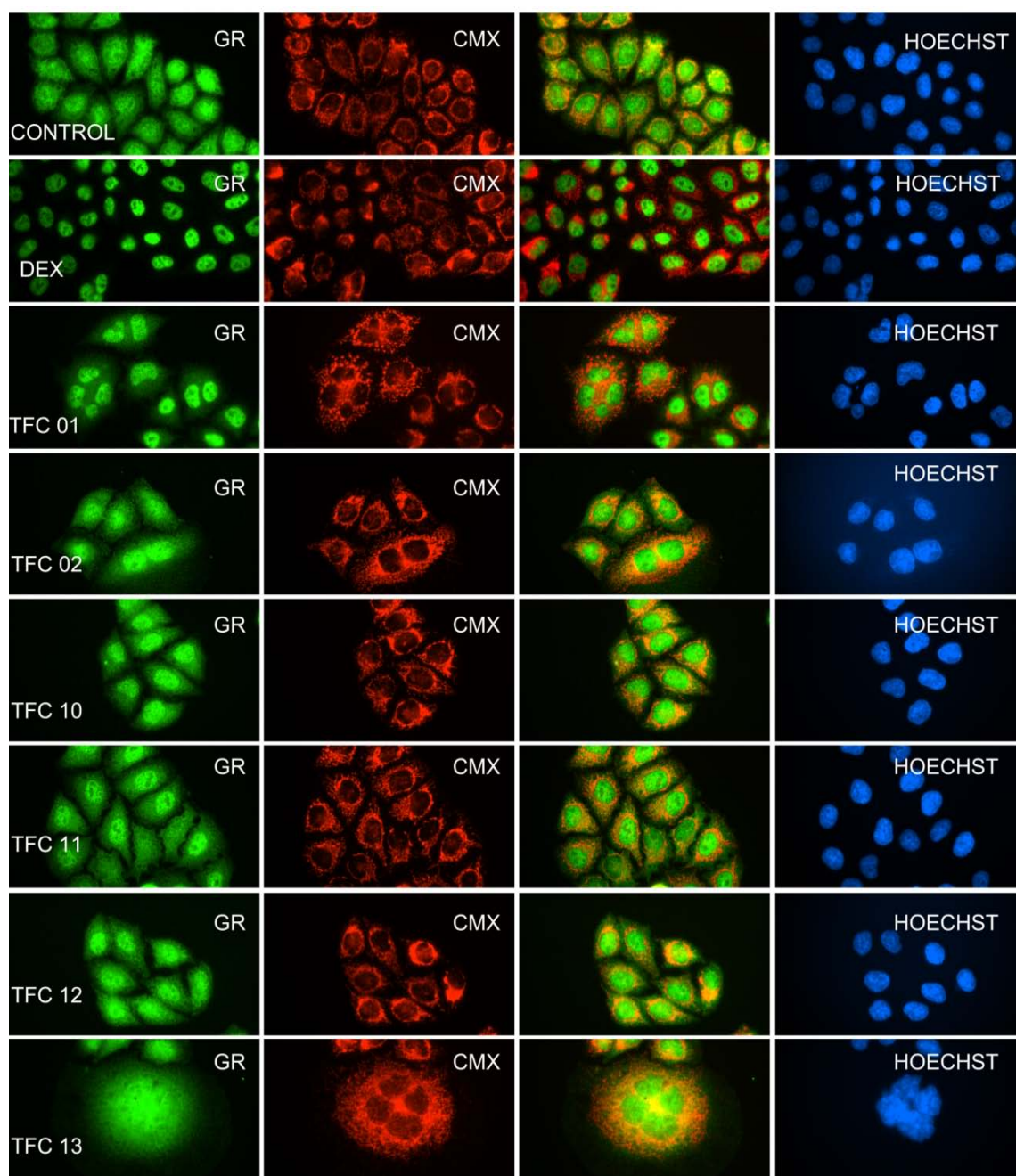
3.1 Τα boswellic acids (BAs) επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας που αποσκοπούσαν στην μελέτη της ικανότητας των υπό εξέταση Bas να προκαλέσουν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Καθαρά για λόγους διευκόλυνσης κατανόησης των παρακάτω αποτελεσμάτων δίνεται ξανά ο **Πίνακας 3** της σελίδας 39, όπου αναγράφονται τα ονόματα των υπό εξέταση BAs καθώς και οι συντομογραφίες με τις οποίες συναντώνται σε όλο το παρακάτω κείμενο.

Πίνακας 7: Τα boswellicAcids (BAs) και οι συντομογραφίες τους.

Όνομα Boswellic Acid (BA)	Συντομογραφία
11-ketobeta Boswellic Acid	TFC01
3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid	TFC02
alpha Boswellic Acid	TFC10
beta Boswellic Acid	TFC11
alpha-Acetylboswellic Acid	TFC12
beta-AcetylBoswellic Acid	TFC13

Τα πειράματα αυτά έγιναν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa, με βάση το πρωτόκολλο που έχει δοθεί. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε απεμπλουτισμένο από ορμόνες θρεπτικό μέσο, παρουσία ή απουσία 1μM αραιωμένης σε EtOH δεξαμεθαζόνης (DEX) ή 10μM των παραπάνω αραιωμένων σε DMSO BAs. Η επώαση έγινε στους 37°C και σε 5% υγρασία για 2h. Επιπλέον, έγινε χρήση της χρωστικής CMX προκειμένου να γίνει ορατή η κατάσταση των μιτοχονδρίων και της χρωστικής Hoechst 33342, μέσω της οποίας έγινε η χρώση των πυρήνων. Υπενθυμίζεται πως η ανάλυση έγινε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) βάση των οποίων βγήκαν και τα συμπεράσματα που αφορούσαν την ικανότητα επαγωγής μετατόπισης του GR στον πυρήνα από τα boswellic acids. Τέλος, να αναφερθεί πως η λήψη των εικόνων φθορισμού έγινε με την κάμερα Qimaging optiMOS, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη. Αυτό που γίνεται ορατό στην **Εικόνα 19** είναι πως και τα έξι υπό εξέταση Bas προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR. Αξίζει να τονιστεί, πως το φαινόμενο αυτό ήταν εντονότερο στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το TFC01, το 11-ketobeta Boswellic Acid.



Εικόνα 19: Κύτταρα HeLa που έχουν καλλιεργηθεί σε απεμπλουτισμένο από ορμόνες μέσο επωάστηκαν παρουσία ή απουσία 1 μ M DEX (αραιωμένης σε EtOH) ή 10 μ M από τα εξεταζόμενα BAs (αραιωμένα σε DMSO) για 2h. Τα κύτταρα ελέγχου (Control) επωάζονται με EtOH (1/1000) και DMSO (1/1000). Τα κύτταρα επίσης επωάστηκαν με την μιτοχονδριακή χρωστική CMX για ανίχνευση και έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας (δεύτερη στήλη), μονιμοποιήθηκαν με MeOH/ακετόνη, και υποβλήθηκαν σε ανάλυση ανοσοϊστοχημείας για τον υποδοχέα GR (πρώτη στήλη) και πυρηνική χρώση (τέταρτη στήλη), με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του GR και της χρωστικής Hoechst 33342, αντίστοιχα. Εικόνες φθορισμού, που λαμβάνονται με την κάμερα Qimaging optiMOS (δωρεά του Ιδρύματος Μποδοσάκη), αποκάλυψαν ότι τα εξεταζόμενα BAs προκάλεσαν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Εντονότερο ήταν το αποτέλεσμα που προήλθε μετά τη χρήση του παράγωγου TFC01 BA.

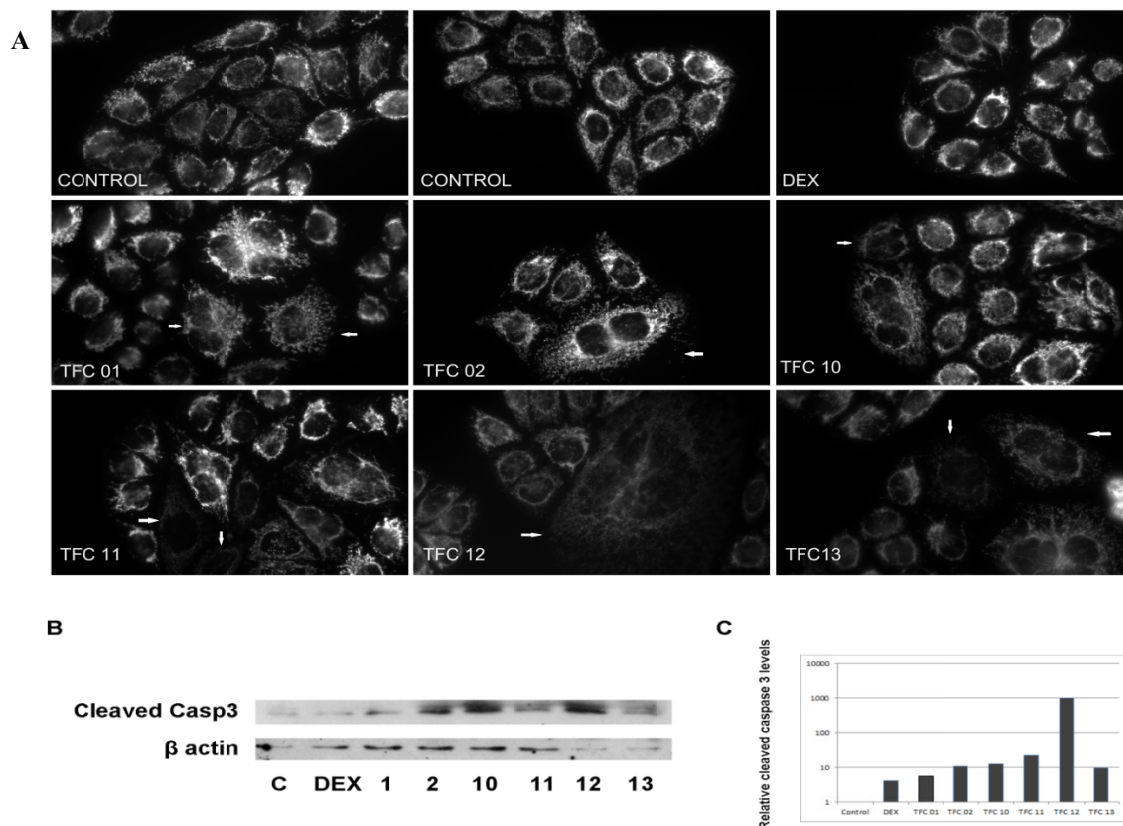
3.2 Επαγωγή της μιτοχονδριακής απόπτωσης από συγκεκριμένα παράγωγα των Bas

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, έγινε χρώση των μιτοχονδρίων με την κόκκινη χρωστική CMX, η οποία ενσωματώνεται αποκλειστικά σε λειτουργικά μιτοχόνδρια, ζωντανών κυττάρων και η συσσώρευσή της καθορίζεται από το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στην **Εικόνα 20Α** γίνονται ορατά τα μιτοχόνδρια κυττάρων HeLa, τα οποία έχουν υποστεί χρώση με CMX. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, τα κύτταρα αυτά καλλιιεργήθηκαν σε απεμπλουτισμένο από ορμόνες θρεπτικό μέσο, παρουσία ή απουσία 1μM αραιωμένης σε EtOH δεξαμεθαζόνης (DEX) ή 10μM των παραπάνω αραιωμένων σε DMSO BAs. Η επώαση έγινε στους 37°C και σε 5% υγρασία για 2h. Αυτό που είναι ξεκάθαρο στην παρακάτω εικόνα είναι πως ορισμένα Bas προκαλούν μείωση της χρώσης CMX και κατ' επέκταση μιτοχονδριακή δυσλειτουργία κι επαγωγή της απόπτωσης. Εντονότερες ήταν οι παρατηρήσεις για τα κύτταρα που είχαν καλλιιεργηθεί παρουσία του TFC12, καθώς επίσης και του TFC 11, TFC10, TFC13 και του TFC01.

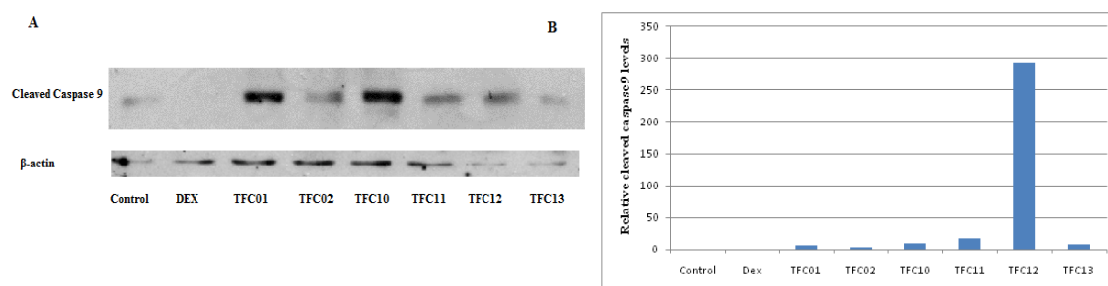
Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζονται και από ανάλογα αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλυση Western Blot. Ειδικότερα, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων HeLa που προέκυψαν μετά από χορήγηση 1 μM DEX ή 10 μM BAs, για 48 ώρες, έδειξαν αύξηση των επιπέδων του πρωτεολύματος της κασπάσης 3, δηλαδή της ενεργής κασπάσης 3, υποδεικνύοντας επαγωγή της απόπτωσης (**Εικόνα 20B**). Παρουσία των TFC02, TFC10, TFC11 και TFC12, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της ενεργής κασπάσης 3 σε σχέση με τα άλλα μόρια που μελετήθηκαν. Υπενθυμίζεται, πως η κασπάση 3 αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο (Slee EA, 2001). Οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot, συνοδεύονται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης της ενεργής κασπάσης 3 μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης (**Εικόνα 20C**).

Μετά την εξαγωγή των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων, έγινε μία απόπειρα περαιτέρω κατανόησης του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω του οποίου τα υπό εξέταση BAs προκαλούν απόπτωση. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot για την κασπάση 9, προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αν κάποιο ή κάποια BAs δρουν μέσω του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής δίνονται στην **Εικόνα 21Α**, όπου γίνονται ορατές οι διαφορές στα επίπεδα του πρωτεολύματος της κασπάσης 9, της ενεργής δηλαδή κασπάσης 9, παρουσία κι απουσία 1 μM DEX ή 10 μM BAs. Αυτό που γίνεται αντιληπτό είναι πως εντονότερη ήταν η επίδραση του TFC12 στην επαγωγή απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού, ενώ τα υπόλοιπα πέντε υπό εξέταση BAs δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη δράση μέσω αυτής της οδού καθώς παρατηρήθηκε μία πολύ μικρή μεταβολή των επιπέδων της πρωτεολυμένης κασπάσης 9. Όπως και την προηγούμενη φορά, η εικόνα αυτή συνοδεύεται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης της

ενεργής κασπάσης 9 μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης (*Εικόνα 21B*).

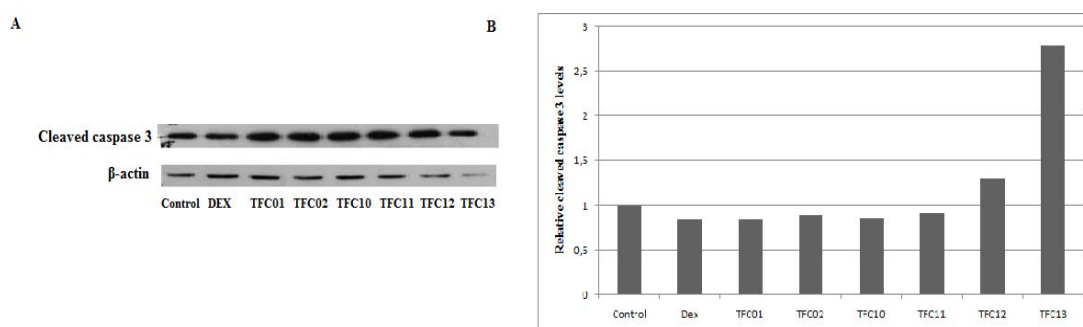


Εικόνα 20: A. Το CMX είναι ένα μία κόκκινη-φθορίζουσα χρωστική που σημαίνει τα λειτουργικά μιτοχόνδρια ζώντων κυττάρων και η συσσώρευση του εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης τους. Μιτοχονδριακή χρώση CMX σε κύτταρα HeLa, στα οποία έχουν χορηγηθεί τα υπό εξέταση BAs, αποκάλυψε ότι ορισμένες BAS προκάλεσαν μείωση της χρώσης CMX (λευκά βέλη), υποδεικνύοντας μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και επαγωγή της απόπτωσης. B. Η ανάλυση Western Blot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa, που προέκυψαν μετά από αγωγή με 1 μ M DEX ή 10 μ M BAs, για 48 ώρες, έδειξε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του προτεολύματος της κασπάσης 3. C. Ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης της κάθε ζώνης του προτεολύματος της κασπάσης 3 με πυκνομετρία μετά από κανονικοποίηση συγκριτικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-ακτίνης.



Εικόνα 21: A. Η ανάλυση WesternBlot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa, που προέκυψαν μετά από αγωγή με 1 μ M DEX ή 10 μ M BAs, για 48 ώρες, δεν έδειξε αξιοσημειώτες μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του προτεολύματος της κασπάσης 9, με εξαίρεση το TFC12. B. Ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης της κάθε ζώνης του προτεολύματος της κασπάσης 9 με πυκνομετρία μετά από κανονικοποίηση συγκριτικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-ακτίνης.

Ανάλυση Western Blot έγινε και για την ανθρώπινη καρκινική σειρά HepG2. Ειδικότερα, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων HepG2 που προέκυψαν μετά από χορήγηση 1 μ M DEX ή 10 μ M BAs, για 48 ώρες, έδειξαν ενεργοποίησης της προκασπάσης 3 παρουσία των BAs alpha-και beta-AcetylBoswellic Acids, TFC 12 και TFC13, αντίστοιχα, στα οποία αυξήθηκαν τα επίπεδα του πρωτεολύματος της κασπάσης 3, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο επαγωγή της απόπτωσης. Αξίζει να τονιστεί, πως το beta-AcetylBoswellic Acid (TFC13) παρουσίασε ισχυρότερη- διπλάσια σχεδόν- αποπτωτική δράση σε σχέση με το alpha-AcetylBoswellic Acid (TFC12), γεγονός που υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά, καθώς BAs τύπου β παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα Bas τύπου α [(Poecke ID, 2006); (Satpathy R, 2015); (Siddiqui M.Z.,2011); (Du Z, 2015); (Ammon HP., 2010)] (**Εικόνα 22Α**). Οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot, συνοδεύονται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης της ενεργής κασπάσης 3 μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β -ακτίνης (**Εικόνα 22Β**). Ωστόσο, οι παραπάνω παρατηρήσεις εξακολουθούν να βρίσκονται υπό διερεύνηση. Πειράματα ανοσοϊστοχημείας με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι αποκλειστικά και μόνο των ενεργοποιημένων κασπασών θα μπορούσαν να επιβεβαιώσουν τα δεδομένα αυτά.



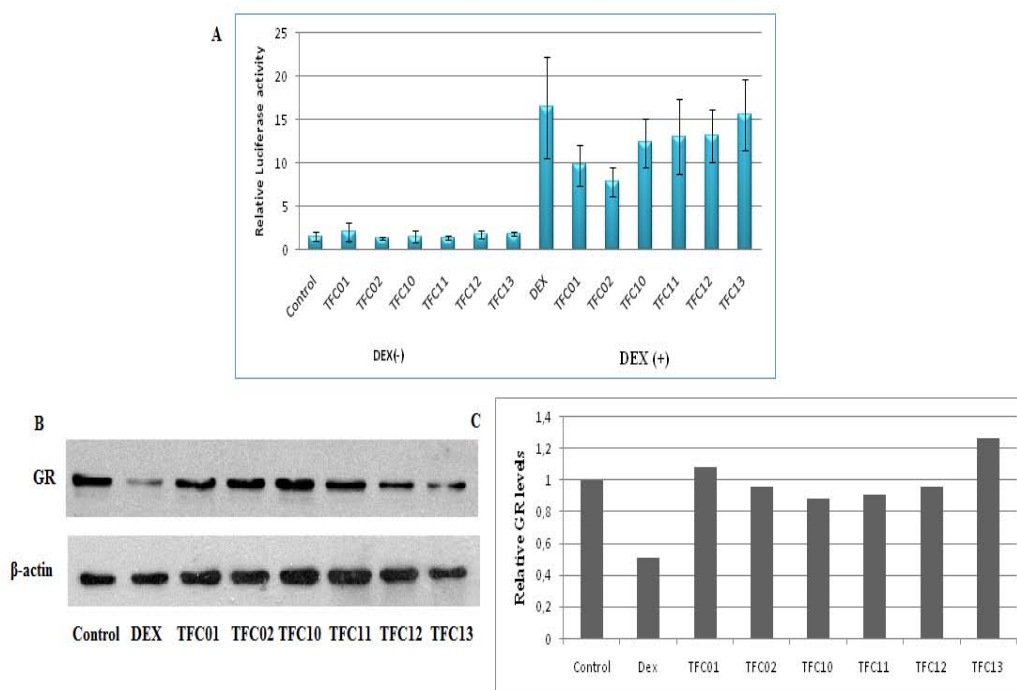
Εικόνα 22: Α. Η ανάλυση Western Blot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HepG2, που προέκυψαν μετά από αγωγή με 1 μ M DEX ή 10 μ M BAs, για 48 ώρες, έδειξε αύξηση των επιπέδων της ενεργής κασπάσης 3 κι επομένως επαγωγή της απόπτωσης παρουσία των TFC12 και κυρίως το TFC 13. Β. Ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης της κάθε ζώνης του πρωτεολύματος της κασπάσης 3 με πυκνομετρία μετά από κανονικοποίηση συγκριτικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης β -ακτίνης.

3.3 Η επίδραση των BAs στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Υπενθυμίζεται πως, το πρώτο πείραμα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa πραγματοποιήθηκε προκειμένου να εξακριβωθεί το κατά πόσο τα υπό εξέταση BAs μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μετά από πρόσδεση τους στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) που εντοπίζονται πάνω στον υποδοχέα [βλ. **Εικόνα 19** σελίδα 53]. Για τον λόγο αυτό, η όλη διαδικασία γίνεται παρουσία κι απουσία δεξαμεθαζόνης, η οποία αποδεδειγμένα προσδένεται στον υποδοχέα, προκαλώντας την μετατόπιση του στον πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής. Με αυτόν τον τρόπο, έγινε μία απόπειρα εξαγωγής συμπερασμάτων σχετικά με τη σχέση των BAs με τη δεξαμεθαζόνη, δηλαδή απαντήθηκε το ερώτημα αν δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά παρουσία DEX.

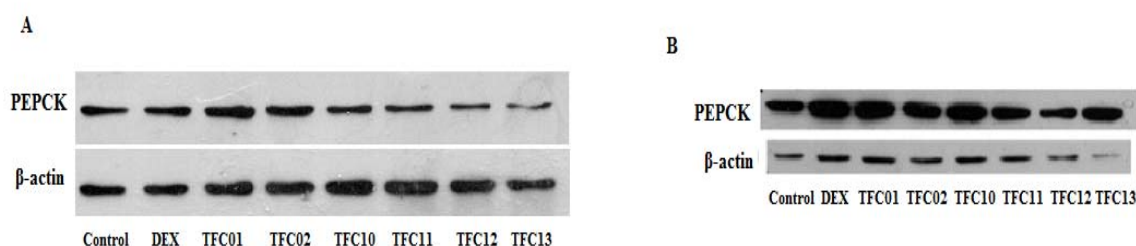
Το κύριο συμπέρασμα που προέκυψε από αυτή την πειραματική διαδικασία είναι πως κανέναν από τα έξι υπό εξέταση BAs δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Με άλλα λόγια, είναι βέβαιο πως τόσο το alpha- και beta-boswellic acid, όσο και τα παράγωγά του δεν μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους μέσω άμεσης ενεργοποίησης του υποδοχέα, που επέρχεται μετά από αναγνώριση και πρόσδεση σε κάποιο συγκεκριμένο GRE. Επιπλέον, όσον αφορά τη διερεύνηση συνεργικής ή ανταγωνιστικής δράσης των εξεταζόμενων BAs παρουσία δεξαμεθαζόνης, αυτό που συμπεραίνεται από το διάγραμμα που δίνεται στην **Εικόνα 23Α** είναι πως και οι έξι ενώσεις προκαλούν μία περιορισμένη μείωση των επιπέδων της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Να σημειωθεί, πως παρά την ύπαρξη μη αμελητέου στατιστικού λάθους, οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν γενικό συμπέρασμα αρκετών επαναλήψεων που έλαβαν χώρα για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος.

Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως βιβλιογραφικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι παρουσία του συγκεκριμένου συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς μειώνονται σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα του διαθέσιμου GR στους περιφερικούς ιστούς (σπλήνα και υπόφυση) αλλά και σε κύτταρα HeLa (Shimajo, 1995). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η μείωση αυτή εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης δεξαμεθαζόνης [(Chenran Zhang, 2015); (Cole MA, 2000); (Nishimura K, 2001)]. Η παραπάνω πληροφορία επιβεβαιώνεται και στην ανάλυση Western Blot που έγινε κάτω υπό τις συνθήκες που ήδη έχουν περιγραφεί σε κύτταρα HeLa (**Εικόνα 23Β**). Ειδικότερα, στην εικόνα αυτή γίνεται ορατή η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του διαθέσιμου GR παρουσία δεξαμεθαζόνης, ενώ παραμένουν σχετικά στα ίδια επίπεδα παρουσία των υπό εξέταση BAs. Όπως και προηγουμένως, η εικόνα που προέκυψε από την ανάλυση Western Blot, συνοδεύεται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης του διαθέσιμου GR μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης (**Εικόνα 23C**).



Εικόνα 23: Α. Η δοκιμασία λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο GRE – Luc έδειξε πως κανένα από τα έξι υπό εξέταση BAs δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, κι επομένως άμεση ενεργοποίηση του μετά από πρόσδεση στα GREs. Επιπλέον, παρατηρείται μία τάση μείωσης της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα όταν συνυπάρχουν τα BAs και η δεξαμεθαζόνη, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Β. Η ανάλυση Western Blot πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HeLa, που προέκυψαν μετά από αγωγή με 1 μ M DEX ή 10 μ M BAs, για 48 ώρες, δεν έδειξαν αξιοσημείωτες μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του διαθέσιμου GR. Αντίθετα, όπως ήταν αναμενόμενο τα επίπεδα του GR είναι αισθητά μειωμένα παρουσία δεξαμεθαζόνης. C. Ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης της κάθε ζώνης του διαθέσιμου GR με πυκνομετρία μετά από κανονικοποίηση συγκριτικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης β-ακτίνης.

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, δίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων Western Blot που έγιναν καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa (**Εικόνα 24A**) και HepG2 (**Εικόνα 24B**) για το γλυκονογενετικό ένζυμο καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), του οποίου η δράση ρυθμίζεται από την παρουσία γλυκοκορτικοειδών κι είναι γνωστό πως επάγεται παρουσία δεξαμεθαζόνης [(Hwang SL, 2012); (Sengupta S, 2001); (Hall RK, 2007)]. Αυτό που συμπεραίνεται και για τις δύο καρκινικές σειρές είναι πως παρουσία δεξαμεθαζόνης υπάρχει η αναμενόμενη αύξηση των επιπέδων της PEPCK, δεδομένου και των μειωμένων επιπέδων GR παρουσία DEX σε κύτταρα HeLa. Αντίθετα, παρουσία των BAs δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, λαμβάνοντας υπό όψιν και την κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης. Κλείνοντας το θέμα αυτό, να τονιστεί πως παρουσία των υπολοίπων BAs δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή των επιπέδων της PEPCK, υποδηλώνοντας πως καμία από τις έξι ουσίες δεν δρα υπέρ της γλυκονογένεσης.



Εικόνα 24: Αποτελέσματα των αναλύσεων Western Blot για το ένζυμο καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) στις καρκινικές σειρές HeLa (A) και HepG2 (B). Αυτό που γίνεται αντιληπτό και για τις δύο καρκινικές σειρές είναι η σχετική αύξηση των επιπέδων PEPCK παρουσία DEX όχι όμως και παρουσία των υπό εξέταση BAs. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν πως κανένα από τα έξι εξεταζόμενα boswellic acids δεν ευνοούν την γλυκονογένεση, μέσω ενίσχυσης της μεταγραφικής δραστηριότητας της PEPC K.

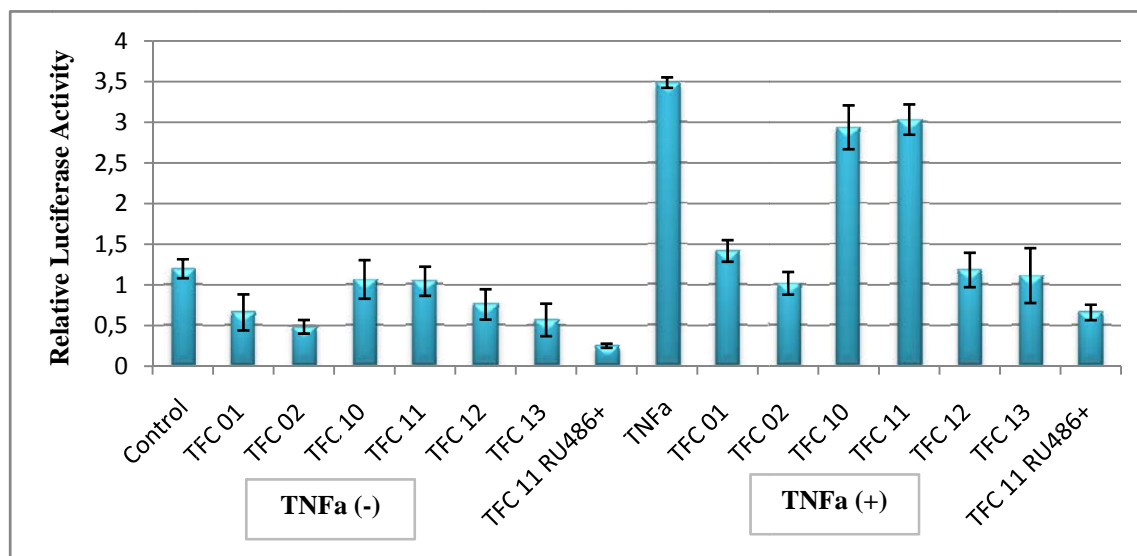
3.4 Η επίδραση των BAs στην μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB

Υπενθυμίζεται, πως σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η εξακρίβωση του κατά πόσο τα υπό εξέταση BAs ασκούν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους μέσω της GR σηματοδότησης. Επιπλέον, αποπειράθηκε να απαντηθεί το ερώτημα του κατά πόσο δρουν ανταγωνιστικά με τον TNFα, ενεργοποιητή του NF-κB. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού δίνονται στο *Διάγραμμα 1*.

Αυτό που γίνεται εύκολα κατανοητό, είναι πως και τα έξι υπό εξέταση BAs δρουν κατασταλτικά ως προς τον NF-κB μέσω της συγκεκριμένης οδού. Όπως ήταν αναμενόμενο, το ποσοστό καταστολής της φλεγμονής παρουσία των ενώσεων αυτών κι απουσία του TNFα διαφέρει μεταξύ των ενώσεων, με το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) να παρουσιάζει την ισχυρότερη δράση και να ακολουθούν τα beta-AcetylBoswellic Acid (TFC13), 11-ketobeta Boswellic Acid (TFC01) και το alpha-AcetylBoswellic Acid (TFC12). Να σημειωθεί, πως βιβλιογραφικά όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω, η δράση των βήτα παράγωγων είναι ισχυρότερη σε σχέση με τα άλφα παράγωγα των οξέων αυτών, γεγονός που γίνεται ορατό και από την παραπάνω κατάταξη. Χαμηλότερες δραστηριότητες μέσω αυτής της οδού παρουσιάζουν τα alpha- και beta-BoswellicAcids (TFC10 και TFC11, αντίστοιχα) των οποίων η δραστηριότητα ήταν λίγο χαμηλότερη από αυτή του δείγματος αναφοράς (control).

Παρουσία TNFα και των έξι BAs, παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, μία μείωση η οποία ακολούθησε τα μοτίβα που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο. Δηλαδή, και σε αυτή την περίπτωση μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε παρουσία του TFC02, κι ακολούθησαν το ίδιο μοτίβο αλλά με ασθενέστερη ένταση τα TFC13, TFC12 και TFC01. Και σε αυτή την περίπτωση, την ασθενέστερη μείωση προκάλεσαν τα TFC10 και TFC11.

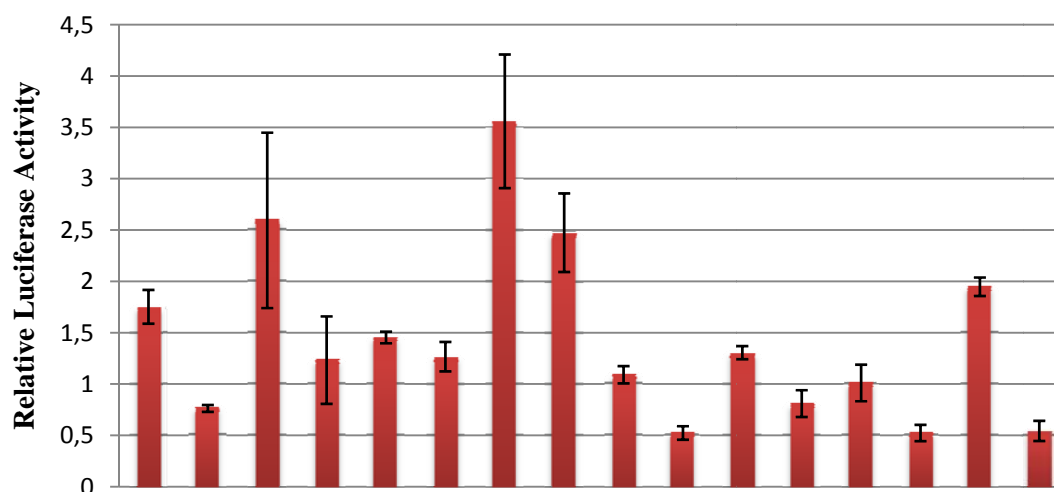
Ο ανταγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών RU486, με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, επάγει σημαντική καταστολή του NF-κΒ. Έτσι, όταν ο RU486 χορηγήθηκε σε συνδυασμό με το TFC11 παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα αναστολής τόσο απουσία όσο και παρουσία TNFα, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανή συνεργική δράση του RU486 και του TFC11 απέναντι στον NF-κΒ.



Διάγραμμα 1: Η δοκιμασία λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa που υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο NF-κΒ – Luc έδειξε πως και τα έξι υπό εξέταση BAs αναστέλλουν τη δράση του NF-κΒ, αν και σε διαφορετικό βαθμό. Επιπλέον, είναι έκδηλη η διαφορετικού βαθμού μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ παρουσία των BAs και TNFα. Παρουσία του αναστολέα RU486 και του TFC11 παρατηρείται καταστολή του NF-κΒ και κατ' επέκταση της φλεγμονής, είτε είναι παρών ο TNFα είτε όχι.

3.5 Η επίδραση του GR στην από το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) επαγόμενη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο πειραματικό τμήμα, η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διαλευκανθεί η επίδραση του GR στην ανοσοκατασταλτική δράση των boswellic acids σε κύτταρα HeLa που έχουν υποστεί διαμόλυνση με το πλασμίδιο pMMTV-NF-κΒ-Luc παρουσία ή απουσία υπερεκφρασμένου GR, δεξαμεθαζόνης ή/και TNFα. Η ουσία με την ισχυρότερη καταστολή της NF-κΒ σηματοδότησης ήταν το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02), το οποίο είναι γνωστό βιβλιογραφικά για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του. Μέσω του πειράματος αυτού, αποπειράθηκε να διαλευκανθεί η απόκριση των HeLa κυττάρων απέναντι σε μία συνδυασμένη χορήγηση ισχυρών ανοσοκατασταλτικών μορίων παρουσία κι απουσία υπερεκφρασμένου υποδοχέα GR, καθώς σε γενικές γραμμές παρατηρούνται διαφορετικές αποκρίσεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών τόσο απέναντι σε συνδυασμένες ανοσοκατασταλτικές θεραπείες όσο και απέναντι σε αντικαρκινικές θεραπείες (Lu YS, 2005). Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος διαμόλυνσης δίνονται στο **Διάγραμμα 2** το οποίο συνοδεύεται από υπόμνημα στο οποίο επεξηγείται η σύσταση του κάθε δείγματος-μπάντας.



PEGFPC ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PEGFPC ₂ -GR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
DEX	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
TNFα	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
TFC02	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+

Διάγραμμα 2: Επίδραση του 3-O-Acetyl-11-ketobeta-BoswellicAcid (TFC02) σε κύτταρα που έχουν υποστεί διαμόλυνση με pMMTV-NF-κB-Luc παρουσία ή απουσία υπερεκφρασμένου GR, δεξαμεθαζόνης και TNFα. Αυτό που παρατηρείται είναι πως το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-BoswellicAcid μπορεί και δρα ανασταλτικά πάνω στον NF-κB μέσω της GR σηματοδότησης, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει συνεργική δράση με τη δεξαμεθαζόνη, αφού συνδυασμένη δράση αυτών των δύο μειώνει αισθητά την δραστηριότητα του NF-κB. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι κοινές τόσο απουσία όσο και παρουσία υπερεκφρασμένου GR, αν και στη δεύτερη περίπτωση οι αντίστοιχες μειώσεις στη δραστηριότητα του παράγοντα είναι πιο εμφανείς.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, υπάρχουν 16 δείγματα, μισά από τα οποία έχουν υποστεί διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει υπερεκφρασμένο τον υποδοχέα GR (PEGFPC₂-GR) και μισά που φέρουν ένα κενό πλασμίδιο (PEGFPC₂). Ξεκινώντας από την 1^η ομάδα δειγμάτων, από αυτά δηλαδή που δεν έχουν υπερεκφρασμένο τον υποδοχέα GR γίνεται ορατή μία σαφής μείωση της δραστηριότητας του NF-κB παρουσία δεξαμεθαζόνης και μία σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του NF-κB παρουσία TNFα, ακριβώς όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τις ήδη υπάρχουσες γνώσεις. Παρουσία και των δύο παραγόντων (δεξαμεθαζόνης και TNFα) παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας του NF-κB σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά του control, γεγονός που δικαιολογείται απόλυτα, αφού η δεξαμεθαζόνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα της από TNFα επαγόμενης ενεργοποίησης του NF-κB [(Mengozzi M, 1994); (Sakuma S, 2000)]. Παρουσία του TFC02 κι απουσία δεξαμεθαζόνης και TNFα παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας του NF-κB η οποία ήταν ισχυρότερη παρουσία δεξαμεθαζόνης. Παρουσία TFC02 και TNFα δεν παρατηρήθηκε η αναμενόμενη μείωση της δραστηριότητας του NF-κB σε σχέση με το αντίστοιχο control, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στις υψηλές αποκλίσεις που παρατηρούνται και στα δύο δείγματα, αφού με βάση το **Διάγραμμα 1** αναμενόταν μείωση των επιπέδων έκφρασης του

παράγοντα παρουσία TFC02 και TNFα. Ωστόσο, παρουσία TFC02, δεξαμεθαζόνης και TNFα παρατηρείται μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ σε σχέση με τα αντίστοιχα control.

Στη 2^η ομάδα δειγμάτων, δηλαδή παρουσία υπερεκφρασμένου GR (PEGFPC₂-GR), παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα έκφρασης στο δείγμα control για τη συνθήκη αυτή σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα control της προηγούμενης συνθήκης, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη ανοσοκατασταλτική δράση του GR μέσω αλληλεπίδρασής του με το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κΒ. Αυτή η παρατήρηση εξηγείται λόγω του αυξημένου αριθμού διαθέσιμων υποδοχέων GR στη συγκεκριμένη ομάδα δειγμάτων. Με το ίδιο σκεπτικό, παρατηρείται ισχυρότερη καταστολή της δραστηριότητας του NF-κΒ παρουσία δεξαμεθαζόνης αλλά και παρουσία του TFC02. Αναλόγως, το δείγμα που φέρει TNFα αλλά όχι το υπό εξέταση BA παρουσιάζει μία πολύ μικρή αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του NF-κΒ, σε αντιδιαστολή με τη μείωση της δραστηριότητας του παράγοντα παρουσία DEX και TNFα κι απουσία του TFC02. Παρουσία δεξαμεθαζόνης και του υπό εξέταση boswellic acid παρατηρείται σημαντική καταστολή του παράγοντα, ενώ η συνύπαρξη του TFC02 με τον TNFα αυξάνει αρκετά τα επίπεδα έκφρασης του NF-κΒ, όχι όμως στο ίδιο επίπεδο σε σχέση με την προηγούμενη συνθήκη, ενώ αναμενόταν να προκαλέσει μείωση. Πιθανόν λόγω πειραματικού σφάλματος οι συγκεντρώσεις TNFα και TFC02 να είναι διαφορετικές από τις αναγραφόμενες και κατά συνέπεια το αποτέλεσμα να μην είναι αναμενόμενο. Τέλος, παρουσία δεξαμεθαζόνης, TNFα και TFC02 παρατηρείται αποτελεσματικότερη καταστολή της από TNFα επαγόμενης δραστηριότητας του NF-κΒ παρουσία DEX, γεγονός που υποστηρίζει και ενισχύει την αρχική μας υπόθεση της ανάλογης και πιθανόν αθροιστικής/συνεργικής δράσης των BAs στη δράση της δεξαμεθαζόνης.

Όλα τα παραπάνω, συνηγορούν στο ότι το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid μπορεί και δρα ανασταλτικά πάνω στον NF-κΒ μέσω της GR σηματοδότησης δρώντας, μάλιστα, συνεργικά με τη δεξαμεθαζόνη, καθώς παρουσία αυτών των δύο παρατηρήθηκε αισθητή μείωση της δραστηριότητας του NF-κΒ. Οι παρατηρήσεις αυτές ισχύουν τόσο για τα δείγματα στα οποία δεν υπήρχε υπερεκφρασμένος ο υποδοχέας GR όσο και για εκείνα που είχαν υποστεί διαμόλυνση με το PEGFPC₂-GR. Στην περίπτωση των δειγμάτων που έφεραν υπερεκφρασμένο τον υποδοχέα, η καταστολή της δράσης του NF-κΒ από το TFC02 τόσο παρουσίας όσο κι απουσίας δεξαμεθαζόνης ήταν αυξημένη αισθητά, υποδεικνύοντας πως οι δράσεις των BAs πιθανόν να επιτελούνται και μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

4. Συζήτηση

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών κι έχουν εξέχοντα φυσιολογικό ρόλο, κυρίως όσον αφορά τη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Ειδικότερα, είναι γνωστό πως τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ενεργειακής ισορροπίας, μέσω επαγωγής των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Σημαντική είναι η επαγωγή των ενζύμων που εμπλέκονται στη γλυκονεογένεση, όπως είναι η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) και η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase). Η γλυκονεογένεση είναι το μεταβολικό μονοπάτι όπου παρατηρείται παραγωγή γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια, όπως είναι τα αμινοξέα και η γλυκερόλη, και υπόκειται σε ρύθμιση από τρία ένζυμα: την PEPCK, την φωσφοφρουκτοκινάση και της G6Pase [(laFleur S.E., 2006); (Psarra AM 2006a); (Psarra AM, 2006b)].

Να τονιστεί πως δεν είναι όλοι οι κυτταρικοί τύποι γλυκονεογενετικοί. Γενικά, η γλυκονεογένεση πυροδοτείται σε συνθήκες μειωμένης πρόσληψης υδατανθράκων από τον οργανισμό. Στην κατάσταση αυτή αποικοδομείται το αποθηκευμένο γλυκογόνο δίνοντας γλυκόζη. Σε περίπτωση που η πρόσληψη υδατανθράκων παραμένει χαμηλή για μεγάλα χρονικά διαστήματα, είναι απαραίτητη η παραγωγή γλυκόζης, ούτως ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση της στα φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Σε αντίθετη περίπτωση, όταν δηλαδή η πρόσληψη υδατανθράκων είναι υψηλή, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλότερα από αυτά που χρειάζεται ο οργανισμός για τον μεταβολισμό, οδηγώντας έτσι στην αποθήκευση της περίσσειας γλυκόζης με τη μορφή γλυκογόνου ή στη σύνθεση λίπους. Υπενθυμίζεται πως η γλυκόζη αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό και κυρίως για τον εγκέφαλο, ενώ τόσο η παραγωγή όσο και η πρόσληψή της ελέγχεται από το ήπαρ [(Berg MJ, 2009); (Γεωργάτσου Ι.Γ., 2005)].

Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή είναι ισχυροί ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες, απαραίτητοι για την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Μία από τις σημαντικότερες δράσεις τους είναι η αρνητική επιρροή που ασκούν πάνω στη μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων και κυτοκινών, η έκφραση των οποίων επάγεται από ποικίλα φλεγμονώδη ερεθίσματα. Κλασικά παραδείγματα αποτελούν η IL-6 και ο TNFα (DeBosscher K, 1997). Βάσει ενδείξεων, η ενδοτοξίνη και κάποιες άλλες φλεγμονώδεις κυτοκίνες αυξάνουν τον αριθμό των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού και σε ανθρώπινες ηπατικές, λεμφοειδείς και μονοκυτταρικές κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, η ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται πως καθορίζεται από διαφορετικούς μηχανισμούς, αφού ιστοί με παρόμοια περιεκτικότητα σε GR εμφανίζουν διαφορετική απόκριση στα GCs. Σε πειράματα που έγιναν στην κυτταρική σειρά L-929 (ινοβλάστες ποντικού) αποδείχθηκε πως ο TNFα αυξάνει την απόκριση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα γλυκοκορτικοειδή μέσω του μηχανισμού ενεργοποίησης που εμπλέκονται τα GREs, ενώ παράλληλα παρατηρείται και αύξηση των επιπέδων του

υποδοχέα παρουσία του παράγοντα αυτού. Να σημειωθεί πως οι παρατηρήσεις που αφορούν την επίδραση του TNFα πάνω στην μεταγραφική δραστικότητα του GR δεν σημειώθηκαν σε ιστούς που δεν έχουν υποδοχείς για τα γλυκοκορτικοειδή, αλλά έχουν υποδοχείς για τον παράγοντα. Αντίθετα ήταν έκδηλες όταν οι ιστοί αυτοί διαμολύνθηκαν με πλασμίδια για τον υποδοχέα, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο την επίδραση του TNFα πάνω στην επαγόμενη από τα GCs μεταγραφική ενεργοποίηση του GR. Ο μηχανισμός αυτός έχει παρατηρηθεί μετά από χορήγηση χαμηλής και κατ' επέκταση μη κυτταροτοξικής δόσης του TNFα. Στα επίπεδα αυτά, ο TNFα αυξάνει σημαντικά την επαγόμενη από GCs ευαισθησία απέναντι στην εμφάνιση απόπτωσης ή κυτταροτοξικότητας που οφείλεται στον TNFα. Ανάλογες δράσεις με τον TNFα φαίνεται πως εμφανίζει και IL-1 αλλά σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, αντανακλώντας με αυτόν τον τρόπο έναν γενικό μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου οι κυτοκίνες ρυθμίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, ενώ ενισχύουν παράλληλα πιθανές παρενέργειες των GCs στα κύτταρα στόχους (Costas M, 1996).

Όπως γίνεται κατανοητό, είναι ιδιαίτερα σημαντική η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων των GCs στον οργανισμό καθώς μεταβολές της ομοιόστασής τους συνδέονται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι οι νόσοι Cushing και Addison. Για τον λόγο αυτό τόσο η έκκριση τους όσο και η δραστικότητα του υποδοχέα μέσω του οποίου δρουν (GR) υπόκειται σε αυστηρό κεντρικό έλεγχο.

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) δρα μέσω δύο οδών, την γενωμικής και της μη γενωμικής, με τη δεύτερη οδό να υπερτερεί σε ταχύτητα έναντι της πρώτης αλλά να χαρακτηρίζεται από σαφώς μειωμένη αποτελεσματικότητα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η πρώτη οδός δράσης του GR, η γενωμική. Στην οδό αυτή, παρατηρούνται δύο μηχανισμοί δράσης: α) η επαγωγή (transactivation) και β) η καταστολή (transrepression) της έκφρασης του γονιδίου στόχου. Η επαγωγή μπορεί να γίνει είτε άμεσα, δηλαδή μετά από αναγνώριση συγκεκριμένου τμήματος του γονιδίου (GRE), πρόσδεση πάνω σε αυτό κι επαγωγή της μεταγραφής, είτε έμμεσα, δηλαδή μέσω πρόσδεσης πάνω σε συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου με τη βοήθεια κάποιου μεταγραφικού παράγοντα. Ανάλογες περιπτώσεις παρατηρούνται και στην περίπτωση της καταστολής, με τον GR να αναγνωρίζει συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου (nGREs) να προσδένεται σε αυτά και να καταστέλλει τη μεταγραφή τους. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός είναι αρκετά σπάνιος, καθώς ο GR επιτυγχάνει την κατασταλτική του δράση κυρίως μέσω πρόσδεσης σε συγκεκριμένους μεταγραφικούς, όπως είναι ο NF-κB, και παρεμπόδισης της έκφρασης της δραστικότητάς τους.

Με βάση τους μηχανισμούς που μόλις περιγράφηκαν υπογραμμίζεται η σημασία της δράσης των γλυκοκορτικοειδών μέσω του υποδοχέα τους, όσον αφορά την εξέλιξη μίας φλεγμονής ή την εμφάνιση ενός καρκινώματος. Για τον λόγο αυτό, γίνεται εκτενής χρήση τους ως αντιφλεγμονώδεις κι αντικαρκινικές θεραπείες. Ωστόσο, η εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι σε αυτά αλλά και η πρόκληση σοβαρών επιπλοκών κατά τη χορήγησή τους, με κλασικά παραδείγματα την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, τον καταβολισμό πρωτεϊνών και την οστεοπόρωση, έχει οδηγήσει στην αναζήτηση εύρεσης

εκλεκτικών αγωνιστών για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA) εξίσου αποτελεσματικών με τα GCs αλλά με σαφώς μειωμένο αριθμό παρενεργειών.

Με βάση τον παραπάνω στόχο, έχει στραφεί η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας σε φυσικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων και στα τερπένια τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών. Μερικοί από αυτούς είναι η αναστολή έκφρασης του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ, η αναστολή της αγγειογένεσης και η επαγωγή απόπτωσης. Στην ομάδα των τερπενίων, κι ειδικότερα στην ομάδα των τριτερπενίων, συναντώνται τα alpha και beta Boswellic Acids (BAs). Τα boswellic acids αποτελούν τις δραστικές ουσίες που απομονώνονται από τις ρητίνες του λιβανιού κι είναι ευρέως διαδεδομένα στη λαϊκή ιατρική της Κίνας, της Ινδίας και πολλών αφρικανικών χωρών για τις ανοσοκατασταλτικές τους δράσεις. Το γεγονός ότι μοιράζονται πολλές δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή, έχει γεννήσει το ερώτημα του κατά πόσο μπορούν να αντικαταστήσουν το ίδιο αποτελεσματικά αλλά όχι με τον ίδιο επιβλαβή τρόπο τα GCs για τη θεραπεία του καρκίνου και διαφόρων φλεγμονωδών νόσων. Με βάση, λοιπόν, τη σκέψη αυτή έγινε μία προσπάθεια διερεύνησης της δράσης των alpha και beta Boswellic Acids και μιας σειράς παραγώγων τους μέσω της GR σηματοδότησης. Τα BAs που εξετάστηκαν ήταν το alpha και beta Boswellic Acids (TFC10 και TFC11, αντίστοιχα), το 11-ketobeta Boswellic Acid (TFC01), το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) και τα alpha- και beta Acetylboswellic Acids (TFC12 και TFC13, αντίστοιχα).

Για τον σκοπό αυτό, ξεκίνησε μία μελέτη της οποίας αρχική πειραματική διαδικασία ήταν η ανοσοϊστοχημεία για τον υποδοχέα GR στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa, μέσω της οποίας βρέθηκε πως και τα έξι εξεταζόμενα BAs προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR, με ισχυρότερο όλων το TFC01. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (DEX), το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές το οποίο είναι γνωστό πως προσδένεται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και προκαλεί πυρηνική του μετατόπιση, ενεργοποιώντας τελικά την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων στόχων των γλυκοκορτικοειδών (Haridas V, 2011). Από τα ίδια πειράματα ανοσοϊστοχημείας κι ειδικότερα μετά τη χρώση των μιτοχονδρίων με την κόκκινη φθορίζουσα χρωστική CMX, η οποία βάφει τα υγιή/λειτουργικά μιτοχόνδρια των ζώντων κυττάρων, παρατηρήθηκε μειωμένη χρώση των μιτοχονδρίων κυττάρων στα οποία είχαν χορηγηθεί τα TFC12, TFC11 και TFC13. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν μετά από ανάλυση Western Blot για την κασπάση 3, τον τελεστή της απόπτωσης. Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του πρωτεολύματος της κασπάσης 3 για όλα τα BAs, με εντονότερες αυτές που σχετίζονταν με τα TFC12, TFC11 και TFC13. Μετά την εξαγωγή των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων, έγινε μία απόπειρα περεταίρω κατανόησης του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω του οποίου τα υπό εξέταση BAs προκαλούν απόπτωση. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot για την κασπάση 9, προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αν κάποιο ή κάποια BAs προκαλούν απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως εντονότερη είναι η επίδραση του TFC12 στην επαγωγή απόπτωσης μέσω του

μιτοχονδριακού μονοπατιού, ενώ τα υπόλοιπα πέντε υπό εξέταση BAs δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη δράση μέσω αυτής της οδού καθώς παρατηρήθηκε μία πολύ μικρή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του πρωτεολύματος της κασπάσης 9.

Αποπειράθηκε να απαντηθεί το ερώτημα του κατά πόσο κάποιο ή κάποια από τα υπό εξέταση BAs ενεργοποιούν την κασπάση 3, και κατ' επέκταση προκαλούν απόπτωση, και στην ανθρώπινη ηπατική καρκινική κυτταρική σειρά HepG2. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως μόνο παρουσία των alpha-και beta-AcetylBoswellic Acids (TFC 12 και TFC13, αντίστοιχα) αυξήθηκαν τα επίπεδα του πρωτεολύματος της κασπάσης 3, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο επαγωγή της απόπτωσης. Αξίζει να τονιστεί, πως το beta-AcetylBoswellic Acid (TFC13) παρουσίασε ισχυρότερη-διπλάσια σχεδόν -αποπτωτική δράση σε σχέση με το alpha-AcetylBoswellic Acid (TFC12), γεγονός που υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά, καθώς BAs τύπου β παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με τα BAs τύπου α [(Poecke ID, 2006); (Satpathy R, 2015); (Siddiqui M.Z.,2011); (Du Z, 2015); (Ammon HP, 2010)].

Σε μία περεταίρω προσπάθεια κατανόησης της δράσης των έξι εξεταζόμενων BAs, έγινε μία προσπάθεια κατανόησης του γενωμικού μηχανισμού δράσης τους στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Αρχικά, εξακριβώθηκε αν μπορούν ή όχι τα BAs να πυροδοτήσουν την άμεση ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μετά από πρόσδεση τους στον υποδοχέα, ενεργοποίησής του, μεταφοράς στον πυρήνα και πρόσδεσής του σε στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs), που βρίσκονται πάνω στο DNA, πριν από τα γονίδια στόχους. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pSV40- βGal και pMMTV-GRE-Luc μέσω λιποσωμάτων, ενώ η όλη διαδικασία έγινε παρουσία κι απουσία δεξαμεθαζόνης. Με αυτόν τον τρόπο, μελετήθηκε πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ των alpha και beta-Boswellic Acids και των παραγώγων τους με τη δεξαμεθαζόνη. Το κύριο συμπέρασμα που προέκυψε από αυτή την πειραματική διαδικασία είναι πως κανέναν από τα έξι υπό εξέταση BAs δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Με άλλα λόγια, είναι βέβαιο πως τόσο το alpha- και beta-Boswellic Acid, όσο και τα παράγωγά του δεν μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους μέσω άμεσης ενεργοποίησης του υποδοχέα, που επέρχεται μετά από αναγνώριση και πρόσδεση σε κάποιο συγκεκριμένο GRE. Επιπλέον, όσον αφορά τη διερεύνηση συνεργικής ή ανταγωνιστικής δράσης των εξεταζόμενων BAs παρουσία δεξαμεθαζόνης, το συμπέρασμα ήταν πως και οι έξι ενώσεις προκαλούν μία περιορισμένη μείωση των επιπέδων της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR ή οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Αξίζει να σημειωθεί, πως η συγκεκριμένη μειωμένη δραστηριότητα οφείλεται στην παρουσία δεξαμεθαζόνης, καθώς βιβλιογραφικά έχει γίνει γνωστό πως παρουσία του συγκεκριμένου συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς μειώνονται σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα του διαθέσιμου GR στους περιφερικούς ιστούς (σπλήνα και υπόφυση). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η μείωση αυτή εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης δεξαμεθαζόνης [(Chenran Zhang, 2015); (Cole MA, 2000); (Nishimura K, 2001)]. Η

παραπάνω πληροφορία επιβεβαιώθηκε και με ανάλυση Western Blot για τον υποδοχέα GR που έγινε σε κύτταρα HeLa.

Στο επόμενο στάδιο, αποφασίστηκε να μελετηθεί η ικανότητα καταστολής του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ μέσω της GR σηματοδότησης στην HeLa καρκινική σειρά. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο αναφοράς λουσιφεράσης για τον NF-κΒ (pNF-κΒ-Luc) το πλασμίδιο για τη β-γαλακτοζιδάση pSV40- βGal. Αυτή η ομάδα πειραμάτων διαμόλυνσης έγινε παρουσία και απουσία TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), κι όχι δεξαμεθαζόνης, ο οποίος αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του NF-κΒ [(Malinin NL, 1997); (Psarra AM, 2009)]. Και σε αυτή την περίπτωση μελετήθηκε πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του TNFα και των υπό εξέταση ενώσεων.

Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως στη διεθνή βιβλιογραφία, και οι έξι εξεταζόμενες ενώσεις έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, μεταξύ αυτών ξεχωρίζουν τα 11keto-β-boswellic acid και το acetyl-11-β-boswellic acid, χωρίς όμως να υπονοείται πως οι υπόλοιπες ουσίες έχουν λιγότερο σημαντική επίδραση πάνω στο ανοσοποιητικό. Παραδείγματος χάρη, στην χυμική άμυνα του οργανισμού έχει αποδειχθεί πως χορήγηση μίγματος BAs σε υψηλές ποσότητες οδηγεί σε μείωση της ποσότητας των πρωτογενών αντισωμάτων, ενώ αντίθετα χορήγηση του ίδιου μίγματος σε χαμηλές ποσότητες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των δευτερογενών αντισωμάτων στα ερυθροκύτταρα πειραματόζωων (προβάτων). Όσον αφορά την κυτταρική άμυνα του οργανισμού, τα BAs πιστεύεται πως αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, και σε αυτή την περίπτωση, υψηλές συγκεντρώσεις BAs εμφανίζουν ανασταλτική δράση στον μηχανισμό αυτό. Επιπλέον, τα BAs ενισχύουν την φαγοκυττάρωση των μακροφάγων και μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού ενισχύουν την παραγωγή κι απελευθέρωση κυτοκινών, ενισχύοντας έτσι το κυτταρικό αμυντικό σύστημα. Έτσι, τα τριτερπένια αυτά αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ, ο οποίος αποτελεί ισχυρό προϊόν των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων. Με άλλα λόγια, έχει παρατηρηθεί μείωση των προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως είναι οι IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 και η IFN-γ, από τα BAs μέσω αρνητικής ρύθμισης του TNF-α. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί καταστολή του κλασικού τρόπου ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω αναστολής της μετατροπής του C3 σε C3a και C3b. Ωστόσο, αυτός και οι υπόλοιποι μηχανισμοί είναι υπό διερεύνηση τόσο όσον αφορά τον τρόπο δράσης των οξέων αυτών αλλά κυρίως όσον αφορά την καλύτερη δυνατή αξιοποίησή τους σε κλινικό επίπεδο. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί η ανασταλτική δράση των BAs πάνω στη 5-λιποξυγενάση, κάτι που οδηγεί σε αισθητά μειωμένη παραγωγή λευκοτριενίων. Να αναφερθεί, πως ο μηχανισμός αυτός έχει προσελκύσει έντονα το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας που δραστηριοποιείται στην καταπολέμηση των χρόνιων φλεγμονωδών νόσων που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα λευκοτριενίων. Επίσης, έχει αναφερθεί πως τα BAs καταστέλλουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου καθώς επίσης και πρωτεασών, όπως είναι η ελαστάση, που επηρεάζουν αρνητικά τον οργανισμό (Ammon HP, 2010).

Επιστρέφοντας στο πείραμα διαμόλυνσης με το πλασμίδιο για τον NF-κΒ (p-NF-κΒ-Luc), ήταν ξεκάθαρο κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πως και τα έξι υπό εξέταση BAs δρουν κατασταλτικά- αν και σε διαφορετικό βαθμό- ως προς τον NF-κΒ. Το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) παρουσίασε την ισχυρότερη δράση και ακολούθησαν τα beta-AcetylBoswellic Acid (TFC13), 11-ketobeta Boswellic Acid (TFC01) και το alpha-AcetylBoswellic Acid (TFC12). Επιπλέον, παρουσία TNFα και των έξι BAs, παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ ανάλογου μοτίβου ισχύος. Τα αποτελέσματα αυτά συμπληρώνουν τις ήδη υπάρχουσες γνώσεις, βάση των οποίων τα TFC01 και TFC02 είναι γνωστά για την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση τους, γεγονός που αποδίδεται σε μία ενεργή καρβονυλική ομάδα που έχουν στον C-11. Τα TFC01 κι ειδικά το TFC02 αποτελούν ειδικούς και μη οξειδοαναγωγικούς αναστολείς της 5-λιποξυγενάσης, γεγονός που αποδίδεται στην ύπαρξη της 11-κετοομάδας. Ειδικότερα, όσον αφορά το TFC02, έχει αποδειχθεί με τη βοήθεια μεταλλαγμάτων που στερούνται τη 11-κετομάδα πως αναστέλλουν μερικώς- περίπου 60%- την 5-λιποξυγενάση σε συγκέντρωση 15μΜ, χωρίς ωστόσο να υπάρχει δυνατότητα περαιτέρω αύξησης του ποσοστού της αναστολής μετά από αύξηση της συγκέντρωσης του χορηγούμενου BA. Η παρατήρηση αυτή, απέδειξε πως η 11-κετομάδα είναι απαραίτητη για τη δράση απέναντι στην 5-λιποξυγενάση, ενώ η ακετοξική ομάδα στον C-3 αυξάνει τη συγγένεια του TFC02 προς τον τελεστή της [(Du Z, 2015); (ZhangY, 2013); (SailerER, 1996)]. Στη δοκιμασία που έγινε παρουσία μifepristόνης (mifepristone, RU486) για το TFC11 παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα επίπεδα αναστολής τόσο απουσία όσο και παρουσία TNFα, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο συνεργική δράση του RU486 και του TFC11 απέναντι στον NF-κΒ. Υπενθυμίζεται, πως η μifepristόνη αποτελεί έναν εξαιρετικό αντιπρογεστερονικό και αντιγλυκοκορτικοειδικό παράγοντα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ο παράγοντας αυτός αναγνωρίζει συγκεκριμένες περιοχές του υποδοχέα GR, προσδένεται σε αυτές και προκαλεί δομικές αλλαγές στην περιοχή δέσμευσης της ορμόνης. Οι αλλαγές αυτές έχουν επιπτώσεις στα διάφορα στάδια λειτουργίας του υποδοχέα σε σχέση με τους αγωνιστές που προσδένονται σε αυτό (Cadepond F, 1997).

Στο τρίτο και τελευταίο πείραμα διαμόλυνσης εξετάστηκε η πιθανή εμπλοκή του GR στην εκδήλωση των δράσεων του 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid (TFC02) σε κύτταρα HeLa που είχαν υποστεί διαμόλυνση με το πλασμίδιο pNF-κΒ-Luc παρουσία ή απουσία υπερκεφρασμένου GR, δεξαμεθαζόνης και TNFα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid μπορεί και δρα ανασταλτικά πάνω στον NF-κΒ μέσω της GR σηματοδότησης, ενώ ταυτόχρονα παρουσίασε συνεργική δράση με τη δεξαμεθαζόνη, αφού συνδυασμένη δράση αυτών των δύο μείωσε αισθητά τα επίπεδα του NF-κΒ. Οι παρατηρήσεις αυτές ήταν κοινές τόσο απουσία όσο και παρουσία υπερκεφρασμένου GR, αν και στη δεύτερη περίπτωση οι αντίστοιχες μειώσεις στη δραστηριότητα του παράγοντα ήταν αισθητά μεγαλύτερες.

Βάση όλων των παραπάνω, προκύπτει πως τα BAs, και κυρίως το 3-O-Acetyl-11-ketobeta-Boswellic Acid, αποτελούν ισχυρούς ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες οι οποίοι πιθανόν να δρουν και μέσω της GR σηματοδότησης. Ωστόσο, για να κλείσει η

παρούσα μελέτη, μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, επιχειρήθηκε η παρατήρηση μεταβολών στα επίπεδα της PEPCK, ενζύμου κλειδιού στην πορεία της γλυκονεογένεσης, παρουσία και απουσία DEX και των υπό εξέταση έξι BAs στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και HepG2. Πριν δοθούν τα αποτελέσματα αυτού του τελευταίου πειράματος, δίνονται ορισμένες γενικές πληροφορίες για την PEPCK που θα βοηθήσουν σημαντικά στην κατανόηση της σπουδαιότητας τόσο της μέτρησης αυτής όσο και του τελικού συμπεράσματος.

Η PEPCK ανήκει στην οικογένεια των λυασών, κι έχει δύο ισομορφές: την μιτοχονδριακή (PEPCK-M), για την οποία ελάχιστα είναι γνωστά, και την κυτταροπλασματική (PEPCK-C), η οποία είναι και η περισσότερο μελετημένη. Και οι δύο ισομορφές κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια που εδράζονται στον πυρήνα, το Pck-1 και το Pck-2, αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί πως το σχετικό ποσοστό των δύο ισομορφών στο ήπαρ ποικίλει μεταξύ των ειδών. Στο ήπαρ του ανθρώπινου οργανισμού παρατηρούνται ίσες ποσότητες των PEPCK-M και PEPCK-C [(Hanson RW., 2009); (Hanson RW, 1997)].

Και οι δύο ισομορφές, κυρίως όμως η κυτταροπλασματική ισομορφή, καταλύουν ένα καθοριστικό στάδιο της γλυκονεογένεσης, την αποκαρβοξυλίωση και μετατροπή του οξαλοξικού σε φωσφο-ενολοπυροσταφυλικό με παράλληλη απελευθέρωση CO₂ και ADP. Υπενθυμίζεται πως η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή και εξαρτάται από την παρουσία GTP. Ακριβώς επειδή η PEPCK καταλύει ένα περιοριστικό βήμα της γλυκονεογένεσης, είναι εκείνη που καθορίζει το ποσό της γλυκόζης που δύναται να παραχθεί τη δεδομένη στιγμή από τον οργανισμό. Αυτός είναι ο λόγος άλλωστε που τόσο το γονίδιο της PEPCK όσο και η παραγόμενη πρωτεΐνη επηρεάζονται από διάφορες καταστάσεις μεταξύ των οποίων είναι η παρουσία ορμονών, όπως η γλυκαγόνη, η τιμή του ενδοκυτταρικού pH και η μερική πίεση του O₂. Η κυριότερη ρύθμιση που υφίσταται το ένζυμο είναι σε μεταγραφικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό μπορεί είτε να υποδηλώνει αύξηση των επιπέδων της παραγόμενης πρωτεΐνης, όπως συμβαίνει παρουσία των παραπάνω ερεθισμάτων, ή μείωσή τους. Σε κάθε περίπτωση όμως, η κυτταροπλασματική της μορφή είναι εκείνη που επηρεάζεται περισσότερο σε όλους τους ιστούς που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής- παραδείγματος χάρι ήπαρ και λιπώδης ιστός [(Hanson RW., 2009); (Hanson RW, 1997); (Nordlie RC, 1963)].

Μεταξύ των ορμονών που ενισχύουν τη γλυκονεογένεση μέσω αύξησης των επιπέδων της PEPCK είναι η γλυκαγόνη, οι θυροειδικές ορμόνες και τα γλυκοκορτικοειδή. Τόσο τα φυσικά όσο και τα τεχνητά GCs δρουν μέσω ενός στοιχείου απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE) εντοπίζεται ανοδικά του υποκινητή της καρβοξυκινάσης [(Hanson RW., 2009); (Hanson RW, 1997); (Nordlie RC, 1963); (Chakravarty K, 2005)].

Επομένως, όπως γίνεται κατανοητό από τα παραπάνω είναι εξαιρετικά σημαντική η έρευνα εκλεκτικών αγωνιστών για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA), οι θα είναι μεν εξίσου αποτελεσματικοί με τα ήδη υπάρχοντα GCs αλλά με σαφώς μειωμένη ικανότητα επαγωγής του ενζύμου PEPCK, και ως εκ τούτου και της

γλυκονεογένεσης. Με βάση τα πλαίσια αυτά, έγιναν αναλύσεις Western Blot για το ένζυμο καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) στις καρκινικές σειρές HeLa και HepG2. Η γενική παρατήρηση και για τις δύο καρκινικές σειρές ήταν η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της καρβοξυκινάσης παρουσία των TFC11, TFC12 και TFC13, ενώ παρουσία των TFC01, TFC02 και TFC10 δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές των τιμών της σε σχέση πάντα με τις τιμές των αντίστοιχων κυττάρων μαρτύρων. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν πως κανένα από τα έξι εξεταζόμενα boswellic acids δεν ευνοούν την γλυκονεογένεση, μέσω ενίσχυσης της μεταγραφικής δραστηριότητας της PEPCK. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη σημαντική καταστολή της δραστηριότητας του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ, καθιστά τα alpha και beta-BoswellicAcids και τα παράγωγά τους που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία θέτουν ισχυρή υποψηφιότητα ως μελλοντικοί εκλεκτικοί αγωνιστές (SEGRA) για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Σε κάθε περίπτωση, συμπληρωματικές μελέτες του εργαστηρίου θα δώσουν περισσότερες και πιο σαφείς απαντήσεις σε τυχόν αναπάντητα ερωτήματα.

5. Συντμήσεις

aa: aminoacids|| αμινοξέα

amp: ampicillin|| αμπικιλίνη

AF1: activation function 1|| λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 1

AF2: activation function 2|| λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 2

APS: ammonium persulfate|| υπερθειικό αμμώνιο

BA(s): Boswellic Acid(s)

BSA: bovine serum albumin|| αλβουμίνη βόειου ορού

CDK: cell cycle-dependent kinase|| κυκλινοεξαρτώμενη κινάση

cis: charcoal inactivated serum|| ορός απενεργοποιημένος σε ενεργό άνθρακα

DEX: dexamethazone|| δεξαμεθαζόνη

DMEM: Dulbecco's modified medium| θρεπτικό μέσο DME

DTT: dithiothreitol|| 1.4 διθριοθειτόλη

DMSO: dimethylsulfoxide|| διμεθυλοσουλφοξείδιο

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid|| αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EtOH: ethanol || αιθανόλη

FBS: fetal bovine serum || εμβρυικός βόειος ορός

GCs: glucocorticoids || γλυκοκορτικοειδή

GR: glucocorticoid receptor || υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

G6Pase: glucose-6 phosphatase || φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης

GPCR: G-protein coupled receptors || υποδοχείς συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες

GRE: glucocorticoid response element || στοιχείο αποκρινόμενο στα γλυκοκορτικοειδή

H-G: high glucose|| υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4.5mg/ml)

HPA: hypothalamic-anterior-pituitary-adrenal axis || άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων

HRP: horseradish peroxidase || υπεροξειδάση του χρένου

IgG: immunoglobulin G || ανοσοσφαιρίνη G

kDa: kilo Dalton

L-B: L-Broth medium || θρεπτικό υλικό L-Broth

L.B.: Lysis Buffer || διάλυμα λύσης

L-Glut: L-glutamine || L-γλουταμίνη

MAPK: mitogen-activated protein kinase || πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

MBA: N,N'-methylene bis acrylamide || N, N'-μεθύλενο-δισ-ακρυλαμίδιου

NR: nuclear receptor || πυρηνικός υποδοχέας

O/N: overnight || για όλη τη νύχτα

ONPG: 2-nitrophenyl b-D-galactopyranoside || 2-νιτροφαίνυλοβ-D-γαλακτοπυρανοσίδιο

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis || ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

PBS: phosphate-buffered saline || ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PBS-T: phosphate-buffered saline/Tween-20 || ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween-20

PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase || καρβοξυκινάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού

PMSF: phenyl methyl sulfonyl fluoride || φαίνυλο-μέθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο

PVA: polyvinyl alcohol || πολυβινυλική αλκοόλη

P/S: pen/strept ή penicillin/streptomycin || πενικιλίνη/ στρεπταμυκίνη

R.T.: room temperature || θερμοκρασία δωματίου ($\approx 23^{\circ}\text{C}$)

rpm: revolution per minute || στροφές ανά λεπτό

SDS sodium dodecyl sulfate || δωδεκακυλοθειικό νάτριο

SNP(s): single nucleotide polymorphism(s) || πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine || τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane || 2-άμινο-2-(υδροξυμέθυλο)-προπανοδιόλη 1,3

6. Βιβλιογραφία

- Adams JM, Cory S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-6.
- Ammon HP. (2010). Modulation of the immune system by Boswellia serrata extracts and boswellic acids. *Phytomedicine* 17(11):862-7.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol.*18:309-45.
- Ayrolidi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C.(2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEBJ.* 26(12):4805-20.
- Berg M. Jeremy, T. L. (2009). *Βιοχημεία*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Bhatti HN, Khera RA. (2014). Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 16(1):70-104.
- Biddie SC, Conway-Campbell BL, Lightman SL. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford).*51(3):403-12.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*72:248-54.
- Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE. (1997). RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med.*48:129-56.
- Callaway Ewen (2013). HeLa publication brews bioethical storm: Genome of controversial cell line no longer public, but another sequence is in the works. *Nature* 12689.
- Callaway Ewen (2013b). Most popular human cell in science gets sequenced: The HeLa cell genome is riddled with errors, raising questions about its continued use. *Nature* 12609.
- Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer.* 127(1):1-8.
- Carson SD, Pirruccello SJ. (2013). HeLa cell heterogeneity and coxsackie virus B3 cytopathic effect: implications for inter-laboratory reproducibility of results. *J Med Virol.* 85(4):677-83.

- Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 40(3):129-54.
- Chenran Zhang, Qiang Qiang, Ying Jiang, Liuhua Hu, Xuehua Ding, Yicheng Lu, Guohan Hu (2015). Effects of hypoxia inducible factor-1 α on apoptotic inhibition and glucocorticoid receptor downregulation by dexamethasone in AtT-20 cells. *BMC Endocrine Disorders.* 15:24
- Cidlowski JA, Kadmiel M. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 34(9):518-30.
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326 (Pt 1):1-16.
- Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, Spencer RL. (2000) Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. . *Elsevier Science Ltd.* 25(2):151-67.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 23(3):255-75.
- Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 518(2):335-45.
- Costas M, Trapp T, Pereda MP, Sauer J, Rupprecht R, Nahmod VE, Reul JM, Holsboer F, Arzt E. (1996). Molecular and Functional Evidence for In Vitro Cytokine Enhancement of Human and Murine Target Cell Sensitivity to Glucocorticoids: TNF- α Priming Increases Glucocorticoid Inhibition of TNF- α -induced Cytotoxicity/Apoptosis. *J. Clin. Invest.* 98(6):1409-16.
- De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(25):13504-9.
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1(2):66-74
- Dostert A, Heinzel T.(2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des.* 10(23):2807-16.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1):33-42.

- Du Z, Liu Z, Ning Z, Liu Y, Song Z, Wang C, Lu A. (2015). Prospects of boswellic acids as potential pharmaceuticals. *Planta Med.* 81(4):259-71.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391(6662):43-50.
- Feek CM, Marante DJ, Edwards CR. (1983). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Endocrinol Metab.* 12(3):597-618.
- Fletcher TM, Xiao N, Mautino G, Baumann CT, Wolford R, Warren BS, Hager GL. (2002). ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell Biol.* 22(10):3255-63.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 182(1):41-9.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13(9):1423-33.
- Grad I, Picard D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1-2):2-12.
- Gunning P, Weinberger R, Jeffrey P. (1997). Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. *Anat Embryol (Berl).* 195(4):311-5.
- Hall RK, Wang XL, George L, Koch SR, Granner DK. (2007). Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol Endocrinol.* 21(2):550-63.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T. (2001). Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11318-23.
- Hanson RW, Reshef L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 66:581-611.
- Hanson RW (2009). Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery. *J Biol Chem.* 284(40):27021-3.

- Haridas V, Xu ZX, Kitchen D, Jiang A, Michels P, Gutterman JU. (2011). The Anticancer Plant Triterpenoid, Avicin D, Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling: Implications for Cellular Metabolism. *PLoS ONE* 6(11):e28037.
- Herr I, Büchler MW, Mattern J. (2009). Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. *Results Probl Cell Differ.* 49:191-218.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1986). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047):635-41
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol.* 20(1):53-8.
- Hwang SL, Kwon O, Lee SJ, Roh SS, Kim YD, Choi JH. (2012). B-cell translocation gene-2 increases hepatic gluconeogenesis via induction of CREB. *Biochem Biophys Res Commun.* 427(4):801-5.
- Igney FH, Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2(4):277-88.
- Jacques E, Semlali A, Boulet LP, Chakir J. (2010). AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299(2):L281-7.
- Jiang CL, Liu L, Tasker JG. (2014). Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol.* 35(1):72-5.
- Nishimura K, Nonomura N, Satoh E, Harada Y, Nakayama M, Tokizane T, Fukui T, Ono Y, Inoue H, Shin M, Tsujimoto Y, Takayama H, Aozasa K, Okuyama A. (2001). Potential Mechanism for the Effects of Dexamethasone on Growth of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 93(22):1739-46.
- Kino Tiulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol.* 169(6):885-96.
- la Fleur SE (2006). The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiol Behav.* 89(1):110-4.
- Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch.* 464(6):549-59.

Lefstin JA, Yamamoto KR. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392(6679):885-8.

Leung DY, Bloom JW.(2003). Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*.111(1):3-22.

Lu NZ, Collins JB, Grissom SF, Cidlowski JA.. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*.27(20):7143-60.

Lu YS, Lien HC, Yeh PY, Yeh KH, Kuo ML, Kuo SH, Cheng AL. (2005). Effects of glucocorticoids on the growth and chemosensitivity of carcinoma cells are heterogeneous and require high concentration of functional glucocorticoid receptors. *World J Gastroenterol*. 11(40):6373-80.

Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, Stallcup MR. (1999). Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* 19(9):6164-73.

Madigan T. Michael, Martinko M. John, Parker Jack.(2007). *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*. (Τόμ. Ι). Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385(6616):540-4.

Malinowska M, Sikora E, Ogonowski J. (2013). Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. *Acta Biochim Pol*.60(4):731-5.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6):835-9.

McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ.. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*.12(3):342-8.

McNally JG, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287(5456):1262-5.

Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 324(5925):407-10.

Mengozzi M, Fantuzzi G, Faggioni R, Marchant A, Goldman M, Orencole S, Clark BD, Sironi M, Benigni F, Ghezzi P. (1994). Chlorpromazine specifically inhibits peripheral and brain TNF production, and up-regulates IL-10 production, in mice. *Immunology*.82(2):207-10.

- Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A. (2015). Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8(1):1-10.
- Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann-Leitner E, Molnár P, Deli J, Didiziapetris R, Ferreira MJ.. (2006). Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des.* 12(3):287-311.
- Morimoto RI (2002). Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* 110(3):281-4.
- Nagaich AK, Walker DA, Wolford R, Hager GL. (2004). Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell.* 14(2):163-74.
- New MI, Nimkarn S, Brandon DD, Cunningham-Rundles S, Wilson RC, Newfield RS, Vandermeulen J, Barron N, Russo C, Loriaux DL, O'Malley B. (2001). Resistance to multiple steroids in two sisters. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 76(1-5):161-6.
- Nishimura K, Nonomura N, Satoh E, Harada Y, Nakayama M, Tokizane T, Fukui T, Ono Y, Inoue H, Shin M, Tsujimoto Y, Takayama H, Aozasa K, Okuyama A. (2001). Potential Mechanism for the Effects of Dexamethasone on Growth of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 93(22):1739-46.
- Nordlie RC, Larly HA (1963). Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J Biol Chem.* 238:2259-63.
- O'Brien SJ (2001). Cell culture forensics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(14):7656-8.
- Oakley RH, Cidlowski JA. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 286(5):3177-84.
- Ortsäter Henrik, Sjöholm Åke and Rafacho Alex. (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. *InTeck* .
- Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet.* 11(2):109-23.
- Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs.* 20(10):880-92.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol.* 9(3):305-14.
- Ploner C, Rainer J, Niederegger H, Eduardoff M, Villunger A, Geley S, Kofler R. (2008). The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 22(2):370-7.

Poeckel D, Werz O. (2006). Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem.* 13(28):3359-69.

Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006a). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 246(1-2):21-33.

Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006b). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1088:12-22.

Psarra AM, Sekeris CE. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783(1):1-11.

Psarra AM, Hermann S, Panayotou G, Spyrou G. (2009). Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF- κ B modulates glucocorticoid receptor and NF- κ B signalling in HEK-293 cells. *Biochem. J.* 422(3):521-31.

Psarra AM, Sekeris CE. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Elsevier B.V.* 1813(10):1814-21.

Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC. (2008). Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nat Genet.* 40(11):1341-7.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 4(3):138-44.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93(4):531-41.

Rodriguez-Nieto S, Cañada A, Pros E, Pinto AI, Torres-Lanzas J, Lopez-Rios F, Sanchez-Verde L, Pisano DG, Sanchez-Cespedes M. (2011). Massive parallel DNA pyrosequencing analysis of the tumor suppressor BRG1/SMARCA4 in lung primary tumors. *Hum Mutat.* 32(2):E1999-2017.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16):2861-74.

- Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HP, Safayhi H. (1996). Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br J Pharmacol.* 117(4):615-8.
- Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T.(2000). FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol.* 130(7):1655-63.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci.* 65(19):2979-99.
- Sambrook J, Green R. Michael, MacCallum Peter(2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satpathy Raghunath, Guru RK, Behera R, Nayak B. (2015). Prediction of anticancer property of bowsellic acid derivatives by quantitative structure activity relationship analysis and molecular docking study. *J Pharm Bioallied Sci.* 7(1):21-5.
- Schacke H, Döcke WD, Asadullah K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of. *Pharmacol Ther* 96(1):23-43.
- Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K.(2007). Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1-2):109-17.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. (1995). Characterization of Mechanisms Involved in Transrepression of NF-kB by Activated Glucocorticoid Receptors. *Molecular and Celllural Biology* 15(2):943-53.
- Schlossmacher G, Stevens A, White A. (2011). Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol.* 211(1):17-25.
- Schuler M, Green DR. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6):684-8.
- Sengupta S, Wasylyk B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev.*15(18):2367-80.
- Shah SA, Tan HL, Sultan S, Faridz MA, Shah MA, Nurfazilah S, Hussain M (2014). Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. *Int J Mol Sci.* 15(7):12027-60.
- Siddiqui MZ. (2011). *Boswellia serrata*, a potential antiinflammatory agent: an overview. *Indian J Pharm Sci.*73(3):255-61.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 276(10):7320-6.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192(4):571-80.

Vegiopoulos A, Herzig S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1-2):43-61.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 7(8):847-54.

Weinberger C, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. (1986). Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature* 318(6047):670-2.

Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Lightman SL, Ingram CD, Harbuz MS. (2001). Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol.* 13(10):905-11.

Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. (1998). The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139(10):4044-52.

Yan XJ, Gong LH, Zheng FY, Cheng KJ, Chen ZS, Shi Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discov Today.* 19(4):482-8.

Zhang Y, Ning Z, Lu C, Zhao S, Wang J, Liu B, Xu X, Liu Y. (2013). Triterpenoid resinous metabolites from the genus *Boswellia*: pharmacological activities and potential species-identifying properties. *ChemCentJ.* 7(1):153.

Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α. (2009). *Φυσιολογία Φυτών Από το μόριο στο περιβάλλον*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Γεωργιάτσου Ι.Γ., Γιαννακούρου Θ.Γ. (2005). *Έλεγχος του μεταβολισμού στο μοριακό επίπεδο*. Θεσσαλονίκη: Γιαχούδη.

Σμοκοβίτης Αθανάσιος (2007). *Φυσιολογία*. Θεσσαλονίκη: Αδερφών Κυριακίδη α.ε.