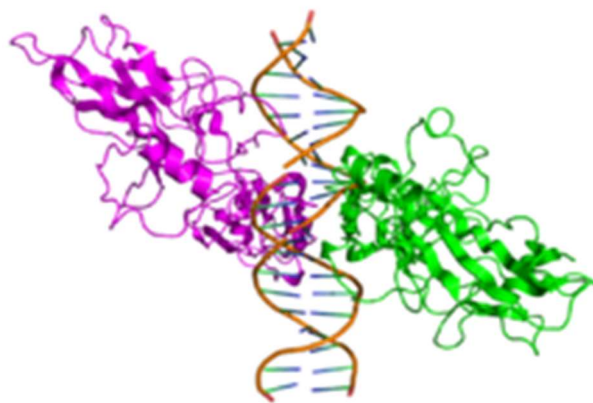




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της επίδρασης νέων μικρών οργανικών ενώσεων στη δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κappa B σε επιθηλιακά κύτταρα



Τσιακαλίδου Γ. Ραφαέλα

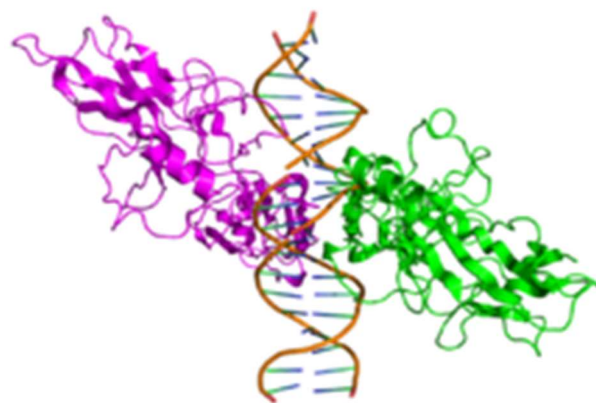
Λάρισα, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

Study of the effect of novel small organic compounds on the activity of the transcription factor NF-kappa B in epithelial cells



Tsiakalidou G. Rafaela

Larissa, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παπουτσοπούλου Σταματία

Επίκουρος καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κολλάτος Νικόλαος

Ακαδημαϊκός υπότροφος Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καλαλά Φανή

Επίκουρος καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσιακαλίδου Ραφαέλα
του Γεωργίου
Λάρισα, Οκτώβριος 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου, επίκουρη καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, κ. Παπουτσοπούλου Σταματία. Είμαι βαθιά ευγνώμων για τη συνεχή καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Εκτιμώ πραγματικά το χρόνο και την προσπάθεια που επένδυσε σε εμένα, καθώς ήταν πάντα εκεί για να απαντήσει στις ερωτήσεις μου, να προσφέρει γνώσεις και να μου παρέχει εποικοδομητικά σχόλια και παρατηρήσεις. Την ευχαριστώ για όλες τις συζητήσεις μας εντός και εκτός εργαστηρίου, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση του θέματος.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κύριο Κολλάτο Νικόλαο, ακαδημαϊκό υπότροφο Οργανικής Χημείας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την ενεργή συνεισφορά του στην πραγμάτωση της διπλωματικής αναλαμβάνοντας το σχεδιασμό των οργανικών αναστολέων που μελετήσαμε, καθώς και την επίλυση όλων μου των αποριών που αφορούσαν τις ενώσεις αυτές. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας κ. Καλαλά Φανή που μου έκανε την τιμή να συμμετάσχει στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της εργασίας, καθώς και για το χρόνο που διέθεσε για την ανάγνωση και διόρθωσή της.

Επιπλέον, είναι σημαντικό για εμένα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξη και τη συντροφικότητά τους καθ' όλη την πορεία ολοκλήρωσης αυτής της εργασίας. Το να μοιράζομαι μαζί τους αυτά τα 4 χρόνια των σπουδών μας ήταν από τις ομορφότερες εμπειρίες και μια συνεχής πηγή έμπνευσης. Τέλος, το μεγαλύτερο και πιο εγκάρδιο ευχαριστώ πηγαίνει στην οικογένειά μου, στην οποία αφιερώνω και τη διπλωματική μου εργασία. Τους ευχαριστώ που μου παρείχαν όχι μόνο τους απαραίτητους πόρους, αλλά και τη συναισθηματική δύναμη και το κίνητρο να επιδιώξω τους στόχους μου. Η πίστη τους σε εμένα ακόμη και στις πιο δύσκολες στιγμές, υπήρξε η κινητήρια δύναμη της επιτυχίας μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 <u>Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου</u>	9
1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	9
1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία	11
1.1.3 Αίτια εμφάνισης.....	13
1.1.3.1 Γενετικοί παράγοντες	13
1.1.3.2 Ανοσολογικοί παράγοντες.....	15
1.1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	17
1.1.4 Θεραπεία της νόσου.....	18
1.2 <u>Μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ</u>	20
1.2.1 Γενικές πληροφορίες.....	20
1.2.2 Μέλη οικογένειας NF-κΒ.....	21
1.2.3 Πρωτεΐνες ΙκΒ – αναστολείς NF-κΒ.....	22
1.2.4 Κανονικό μονοπάτι ενεργοποίησης.....	22
1.2.5 Μη κανονικό (εναλλακτικό) μονοπάτι ενεργοποίησης.....	24
1.3 <u>Ο NF-κΒ στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου</u>	24
1.4 <u>Απορρύθμιση του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης NF-κΒ σε άλλες ασθένειες</u>	25
1.5 <u>Αναστολή δραστικότητας NF-κΒ</u>	26
1.5.1 Στόχοι αναστολέων σηματοδότησης NF-κΒ	26
1.5.2 Οργανικά μόρια-αναστολείς	29
2. Σκοπός της εργασίας.....	30
3. Υλικά – Μέθοδοι	31
3.1 <u>Κυτταροκαλλιέργειες</u>	31
3.1.1 Κυτταρική σειρά.....	31
3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων.....	31
3.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	31
3.1.4 Υποδιαίρεση (split) κυττάρων	32
3.1.5 Αριθμός κυττάρων.....	33
3.2 <u>Δοκιμασία λουσιφεράσης</u>	33
3.2.1 Αρχή της μεθόδου	33

3.2.2 Πειραματική διαδικασία	34
3.3 Αναστολείς NF-κB.....	35
4. Αποτελέσματα.....	36
4.1 Συνθήκες καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς HeLa/NF-κB-Luc	36
4.2 Ενεργοποίηση κυττάρων και διμεθυλσουλφοξείδιο	36
4.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO.....	38
4.4 Μελέτη δράσης των κινάζολινονών.....	39
5. Συζήτηση	42
6. Βιβλιογραφία	46

Περίληψη

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), που περιλαμβάνει τη νόσο του Crohn (CD) και την ελκώδη κολίτιδα (UC), είναι μια χρόνια, πολυπαραγοντική πάθηση που χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζουσες φλεγμονές στο εντερικό σύστημα. Η έναρξη της νόσου φαίνεται να επηρεάζεται εξίσου από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, σε συνδυασμό με ανοσολογικές αντιδράσεις στο μικροβίωμα του εντέρου. Υπάρχει μια παγκόσμια αύξηση της επίπτωσης της IBD, ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες περιοχές της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής, αναδεικνύοντας τη σημαντική συσχέτισή της με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η εκβιομηχάνιση. Ο NF-κΒ αποτελεί μια οικογένεια πρωτεϊνών που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με χημειοκίνες και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, λειτουργώντας μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών ενεργοποίησης. Ο κύριος ρυθμιστής του NF-κΒ είναι η οικογένεια αναστολέων IκΒ, οι οποίοι εμποδίζουν τον NF-κΒ να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου. Η απορρύθμιση αυτής της οδού έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με διάφορες χρόνιες ασθένειες. Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε μικρά οργανικά μόρια ως πιθανούς αναστολείς του NF-κΒ, χρησιμοποιώντας δοκιμασίες λουσιφεράσης για την αξιολόγηση της αναστολής της μεταγραφής. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη εξειδικευμένων αναστολέων του NF-κΒ για τη θεραπεία της IBD, ενώ η μελλοντική έρευνα στον τομέα αυτό αναμένεται να βελτιώσει την κατανόηση της νόσου και να διευκολύνει την ανάπτυξη φαρμακευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία της.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is a chronic multifactorial condition characterised by recurrent inflammation in the intestinal system. The onset of the disease appears to be influenced equally by genetic and environmental factors, combined with immunological responses in the gut microbiome. There is a global increase in the incidence of IBD, particularly in developed areas of Europe and North America, highlighting its significant association with environmental factors such as industrialisation. NF- κ B is a family of proteins that plays a key role in the regulation of immune and inflammatory responses by controlling the expression of chemokine- and pro-inflammatory cytokine-related genes, operating through two distinct activation pathways. The main regulator of NF- κ B is the I κ B family of inhibitors, which prevent NF- κ B from entering the cell nucleus. Dysregulation of this pathway has been shown to be associated with several chronic diseases. In this context, in the present study we examined small organic molecules as potential inhibitors of NF- κ B, using luciferase assays to assess transcriptional inhibition. The results indicate the urgent need for the development of specific NF- κ B inhibitors for the treatment of IBD, and future research in this area is expected to improve our understanding of the disease and facilitate the development of pharmaceutical strategies for its treatment.

1. Εισαγωγή

1.1 Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου

1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD) είναι μια πολυπαραγοντική και χρόνια υποτροπιάζουσα εντερική φλεγμονή που κλινικά περιέχει ως κύριες μορφές τη νόσο του Crohn (Crohn's Disease, CD) και την ελκώδη κολίτιδα (Ulcerative Colitis, UC). Η εμφάνιση της νόσου προκύπτει ως αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης στο εντερικό μικροβίωμα του ξενιστή η οποία συνοδεύεται από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων και τη γενετική προδιάθεση του ατόμου [Guan Q, 2019]. Μέχρι πρόσφατα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου επιδημιολογικά εντοπιζόταν στις δυτικές χώρες, όμως την τελευταία δεκαετία παρατηρείται αύξηση των ποσοστών εμφάνισης IBD και σε χώρες της Ανατολής [Mak WY et al, 2019].

Η κλινική εικόνα των δύο πιο κοινών μορφών της IBD (CD, UC) έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά, γεγονός που δυσκολεύει τη διάγνωση και αντιμετώπιση του εκάστοτε τύπου της νόσου. Η εκδήλωσή της γίνεται με ποικιλία συμπτωμάτων τα οποία συνήθως περιλαμβάνουν έντονους και χρόνιους πόνους στην κοιλιά, διάρροια (συνά με προσμίξεις αίματος), απώλεια βάρους αλλά και όρεξης, αιμορραγίες, δερματικά προβλήματα, πυρετό και πόνο στις αρθρώσεις [Guan Q, 2019], [Wright EK et al, 2018]. Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ασθενών όπου στην αρχή εμφάνισης της νόσου ο ένας υπότυπος μπορεί να μιμηθεί την κλινική εικόνα του άλλου [Zhou N et al, 2011]. Παρ'όλα αυτά, η CD και η UC ποικίλλουν ως προς την ηλικία διάγνωσης, τον εντοπισμό και τη σοβαρότητα της νόσου, καθώς και διάφορες εξωεντερικές εκδηλώσεις.

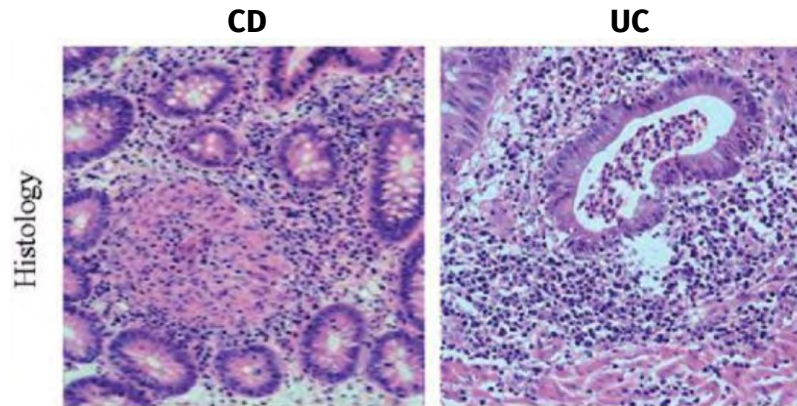
Στη CD, μετά τη διάγνωση οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε 4 κύριες ομάδες με βάση την ανατομική θέση της νόσου (Montreal classification) [Satsangi J. et al, 2006], όπως φαίνεται στον πίνακα 1 και γίνεται έλεγχος για πιθανές εξωεντερικές εκδηλώσεις και αυτοάνοσα νοσήματα. Η CD συνήθως επηρεάζει τον τελικό ειλεό, την περιπρωκτική περιοχή και το παχύ έντερο, αλλά μπορεί να προσβάλλει οποιαδήποτε περιοχή του εντέρου σε ασυνεχή μορφή. Η φλεγμονή είναι διατοιχωματική, με βάθος στους ιστούς. Πολλοί ασθενείς παρουσιάζουν επιπλοκές της νόσου, όπως ινωτικές στενώσεις όπου δημιουργείται ουλώδης ιστός στο

έντερο από τη χρόνια φλεγμονή, αποστήματα και συρίγγια, ενώ μερικοί εμφανίζουν και περιπρωκτική νόσο [de Bruyn M. et al, 2016].

Κατηγοριοποίηση Montreal	Ανατομική θέση
L1	Τελικός ειλεός
L2	Παχύ έντερο
L3	Ειλεός + παχύ έντερο
L4	Ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση Montreal της ανατομικής εμφάνισης της CD [Satsangi J. et al, 2006]

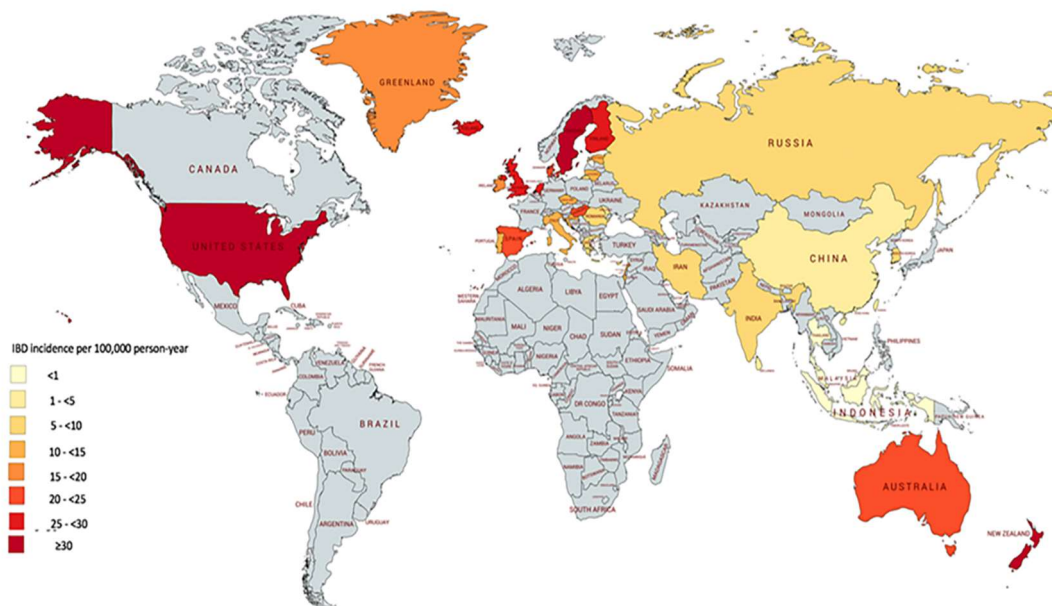
Η UC χαρακτηρίζεται από φλεγμονή που περιορίζεται στην επιφάνεια του βλεννογόνου, η οποία ξεκινά από το ορθό και επεκτείνεται σε όλο το παχύ έντερο. Σε αντίθεση με τη CD, το μοτίβο φλεγμονής είναι συνεχές. Παρ'όλα αυτά, σε μερικούς ασθενείς με πρωκτίτιδα ή αριστερόπλευρη κολίτιδα έχει εμφανιστεί φλεγμονή και στην περιοχή του τυφλού εντέρου [Ordas I. et al, 2012]. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση Montreal, η έκταση της νόσου κατηγοριοποιείται ανάλογα με την έκταση της προσβολής του παχέος εντέρου σε 3 τάξεις, την ορθίτιδα (E1 - φλεγμονή περιορισμένη στο ορθό), την αριστερόπλευρη κολίτιδα (E2 - φλεγμονή που περιορίζεται στο σιγμοειδές κόλον) και τέλος την πανκολίτιδα (E3 - φλεγμονή που επεκτείνεται σε μεγάλο τμήμα του παχέος εντέρου) [de Bruyn M. et al, 2016]. Συγκρίνοντας τους δύο υποτύπους της IBD ιστολογικά, εμφανίζονται κύριες διαφορές. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 1**, η CD παρουσιάζει διήθηση φλεγμονωδών κυττάρων στην υποβλεννογόνο στιβάδα και παρουσία κοκκιώματος. Στη UC παρατηρείται επίσης αυτή η διήθηση κυττάρων, όμως συνήθως συνοδεύεται από απώλεια κυττάρων βλεννογόνων και αποστήματα [de Bruyn M. et al, 2016].



Εικόνα 1. Σύγκριση CD και UC μετά από ιστοπαθολογικές αναλύσεις [de Bruyn M. et al, 2016].

1.1.2 Επιδημιολογικά στοιχεία

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει σημειωθεί αύξηση στα ποσοστά εμφάνισης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου σε παγκόσμια κλίμακα. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια από τις σημαντικότερες ενδείξεις για τη συσχέτιση της αιτιοπαθογένειας της νόσου με τον περιβαλλοντικό παράγοντα και συγκεκριμένα την εκβιομηχάνιση. Τα μεγαλύτερα ποσοστά σύμφωνα με μεγάλο αριθμό μελετών έχουν καταγραφεί σε ανεπτυγμένες χώρες στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Όσον αφορά την Ευρώπη, παρατηρείται βαθμίδωση στην επίπτωση της νόσου τόσο σε βορρά-νότο όσο και σε δύση-ανατολή. Για παράδειγμα, η επίπτωση της CD στο βόρειο τμήμα της Ευρώπης ήταν 6,3 ανά 100000 άτομα/έτη και της UC 11,4 ανά 100000 άτομα/έτη, ενώ στο νότιο 3,6 και 8 αντίστοιχα. Συνολικά, ο επιπολασμός της IBD στη Βόρεια Αμερική αντιστοιχεί σε 2,2 εκατομμύρια άτομα (0,3%), ενώ στην Ευρώπη σε 2,5-3 εκατομμύρια άτομα (0,3%) [Mak WY et al, 2019]. Σε αντίθεση με τη Δύση, στις χώρες της Ανατολής η IBD πριν 20 χρόνια αποτελούσε μια σπάνια ασθένεια. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν μια απότομη αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης της νόσου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την Κορέα όπου η επίπτωση της CD αυξήθηκε από 0 σε 1,68 ανά 100000 άτομα/έτη και της UC από 0,22 σε 3,62 ανά 100000 άτομα/έτη από το 1986 έως το 2005. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αύξηση της επίπτωσης της CD ήταν ταχύτερη από αυτή της UC. Παρόλα αυτά, όσον αφορά τον επιπολασμό της νόσου στις χώρες της Ασίας, αυτός παραμένει χαμηλότερος από αυτόν της Δύσης [Mak WY et al, 2019].



Εικόνα 2. Χάρτης με τη συχνότητα εμφάνισης της IBD σε παγκόσμια κλίμακα με βάση πληθυσμιακές μελέτες από το 2010 έως το 2019 [Mak WY et al, 2019].

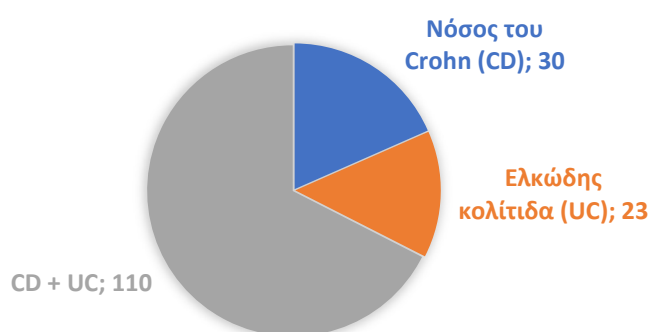
Η ηλικία αιχμής εμφάνισης της IBD είναι τα 15 έως και τα 30 έτη, αν και μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, με το 10% των ασθενών να είναι μόλις 18 ετών. Μια δεύτερη, μικρότερη αιχμή εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας 50-70 ετών [Hanauer S. et al, 2006]. Όσον αφορά τις επιδημιολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ αντρών και γυναικών, γενικότερα είναι γνωστό ότι οι ασθένειες του ανοσοποιητικού συνήθως εμφανίζουν μια υπεροχή στο γυναικείο πληθυσμό. Στην IBD, έχουν σημειωθεί διαφορές με βάση το φύλο των ασθενών για τη CD αλλά όχι για τη UC. Συγκεκριμένα, στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ γίνεται διακριτή αυτή η υπεροχή καθώς ο επιπολασμός της CD είναι υψηλότερος στις γυναίκες, στην Ασία όμως σημειώνεται το αντίθετο. Ακόμη, η πρώιμη εμφάνιση CD (δηλαδή σε ηλικία <16 ετών) είναι πολύ πιο συχνή στον ανδρικό πληθυσμό [Greuter T. et al, 2020].

1.1.3 Αίτια εμφάνισης

1.1.3.1 Γενετικοί παράγοντες

Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος στον κλάδο της γονιδιωματικής με τις μεθόδους ανάλυσης DNA, την αλληλούχηση της επόμενης γενιάς (next generation sequencing) και τις μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS: Genome-Wide Association Studies) οι οποίες εντοπίζουν πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) έχει δώσει χρήσιμα εργαλεία για τη μελέτη πιθανών γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με την IBD. Τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών επιβεβαιώνουν την αδιαμφισβήτητη σύνδεση της γενετικής προδιάθεσης ενός ατόμου με την εμφάνιση της νόσου. Συγκεκριμένα, μέχρι σήμερα 163 γονιδιακοί τόποι έχουν συσχετισθεί με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου: οι 30 από αυτούς είναι ειδικό για τη CD, οι 23 ειδικό για τη UC και οι 110 σχετίζονται και με τους δυο υποτύπους [Zhang YZ et al, 2014], **Εικόνα 3**.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΟΠΩΝ

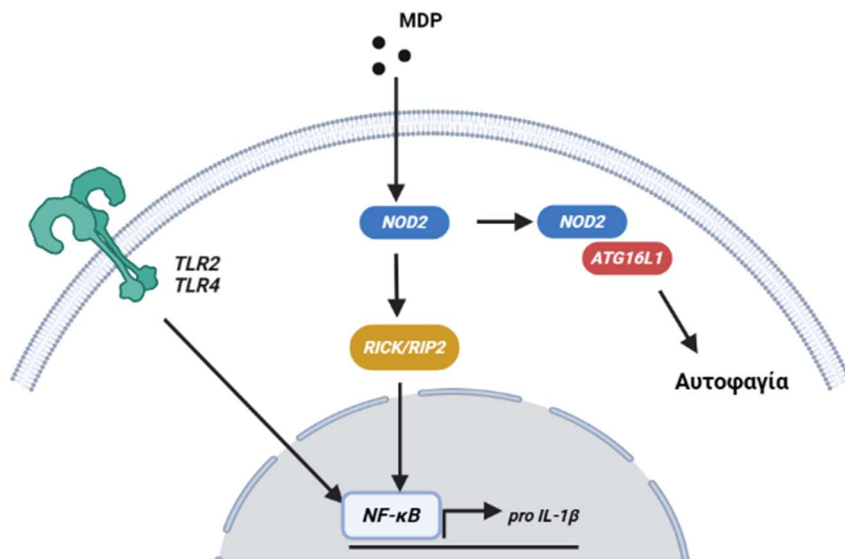


Εικόνα 3. Γραφική απεικόνιση αριθμού γενετικών τόπων που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου [Zhang YZ et al. 2014].

Ο πρώτος γενετικός τόπος που συσχετίστηκε με τη CD και έδωσε το έναυσμα για τις μελέτες που ακολούθησαν ήταν αυτός του παράγοντα NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2). Το γονίδιο NOD2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και δρα ως ενδοκυτταρικός υποδοχέας της οικογένειας NLR (Nod-Like Receptors). Αυτός ο υποδοχέας αναγνωρίζει το μουραμυλικό διπεπτίδιο MDP, τμήμα της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τοίχωμα

τόσο των Gram θετικών όσο και των Gram αρνητικών βακτηρίων. Στην **Εικόνα 4** φαίνεται συνοπτικά η επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών μεταγωγής του σήματος σε κύτταρα έμφυτης ανοσίας κάτω από τους υποδοχείς TLR2 και TLR4 (Toll Like Receptor 4) που αναγνωρίζουν γλυκολιπίδια και λιποπρωτεΐνες των κυτταρικών τοιχωμάτων Gram θετικών βακτηρίων και το λιποπολυσακχαρίτη (LPS), το κύριο συστατικό των αρνητικών κατά Gram βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων αντίστοιχα [Sidletskaia K et al, 2020], και του MDP. Η πρόσδεση του MDP στην πρωτεΐνη NOD2 προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή της και μπορεί να προσδεθεί στην πρωτεΐνη RIP2, η οποία με τη σειρά της επάγει την πολυουβικιτινυλίωση της IκΒα και της επακόλουθης πρωτεόλυσής της (δεν απεικονίζεται). Η πρωτεόλυση της IκΒα οδηγεί σε απελευθέρωση των διμερών του NF-κΒ που μετακινείται στον πυρήνα και επάγει τη μεταγραφή εκτός των άλλων και φλεγμονωδών κυτοκινών [Guan Q, 2019], [Zhang YZ et al, 2014].

Οι γενετικές αναλύσεις έδειξαν επίσης το συσχετισμό της IBD με τους μηχανισμούς της αυτοφαγίας και συγκεκριμένα το γονίδιο *ATG16L1*. Είναι γνωστό ότι με την αυτοφαγία διατηρείται η ενδοκυτταρική ομοιόσταση, γίνεται ανακύκλωση των οργανιδίων και εξασφαλίζεται αντίσταση σε μικροβιακές λοιμώξεις [Khor B et al, 2011]. Με την αναγνώριση του βακτηριακού MDP ενεργοποιείται το μονοπάτι της αυτοφαγίας μετά και την αλληλεπίδραση του NOD2 και της πρωτεΐνης *ATG16L1*. Πολυμορφισμοί αυτού του γονιδίου (όπως και του *NOD2*) έχουν συνδεθεί με τη CD. Η μετάλλαξη T300A σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου [Guan Q, 2019], [Zhang YZ et al, 2014], ενώ ασθενείς ομόζυγοι για τη μετάλλαξη παρουσιάζουν μη φυσιολογική σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων TLR (Toll-Like Receptors), καθώς και προβλήματα στη λειτουργία των κυττάρων Paneth [Cohen LJ et al, 2019], επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στη βάση της κρύπτης του ιστού και είναι υπεύθυνα για την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (πχ. ντιφενσίνες) για την άμυνα έναντι μικροοργανισμών και αυξητικών παραγόντων στα αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα [Barreto E et al, 2022].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών ενεργοποίησης NF-κB και αυτοφαγίας μέσω αναγνώρισης σήματος από τον υποδοχέα NOD2.

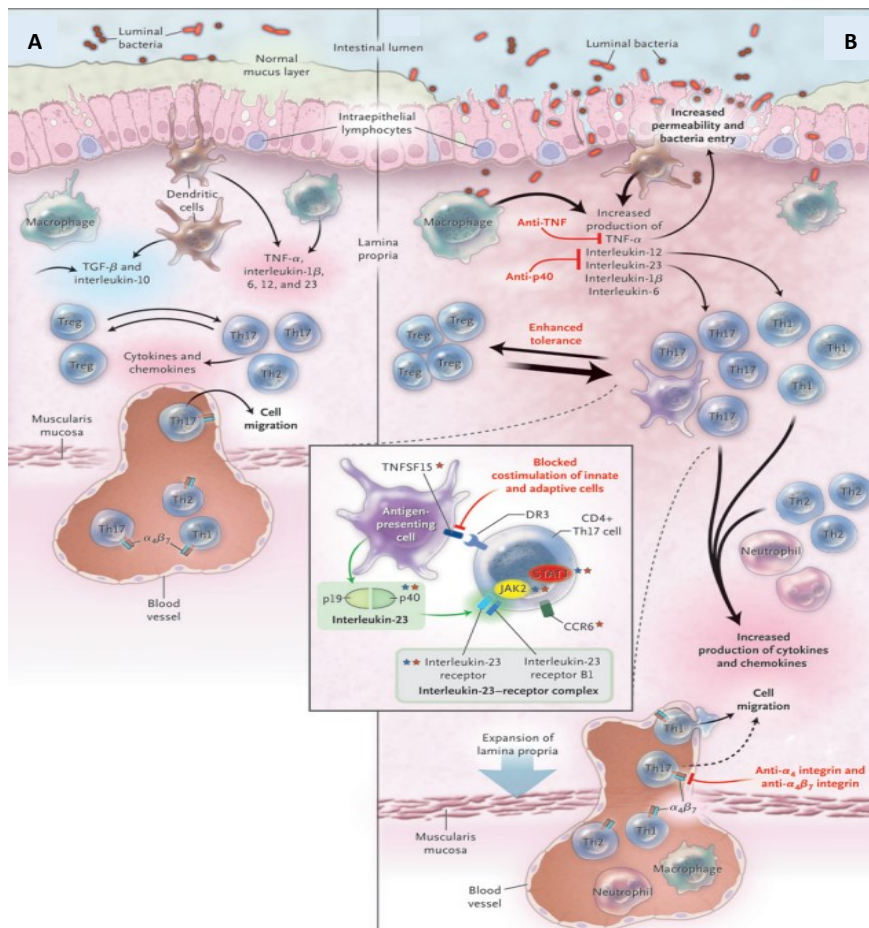
(δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με την IBD αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό όλων των πληθυσμών, όμως παρατηρείται ετερογένεια κατά την εμφάνιση της νόσου μεταξύ πληθυσμών με διαφορετική γεωγραφική κατανομή. Για παράδειγμα, οι παραλλαγές του *NOD2* εντοπίζονται σε Ευρωπαίους ασθενείς, χωρίς όμως να συμβαίνει το ίδιο σε αυτούς από χώρες της Ανατολής. Επίσης, αν και πολλά άτομα φέρουν γενετικούς τόπους που σχετίζονται με την IBD, λίγα είναι τα άτομα που όντως αναπτύσσουν τη νόσο [Guan Q, 2019]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αιτιοπαθογένεια της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου είναι περίπλοκη, καθώς δεν οφείλεται μόνο στη γενετική προδιάθεση των ασθενών αλλά και σε πρόσθετους περιβαλλοντικούς και ανοσολογικούς παράγοντες.

1.1.3.2 Ανοσολογικοί παράγοντες

Οι έρευνες των τελευταίων ετών γύρω από την ανοσολογική σκοπιά της εμφάνισης φλεγμονώδους νόσου του εντέρου έχουν δώσει πληροφορίες σχετικά με την ανοσία του βλεννογόνου και τη μη φυσιολογική λειτουργία τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας στους ασθενείς.

Σε έναν υγιή εντερικό ιστό (**Εικόνα 5A**), υπάρχει μια ποικιλία κυττάρων του ανοσοποιητικού τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας που περιορίζουν την είσοδο παθογόνων στο έντερο με διάφορους μηχανισμούς.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των διαφορών μεταξύ εντερικών βλεννογόνων ενός (A) ατόμου με υγιές ανοσοποιητικό σύστημα και (B) ατόμου με φλεγμονώδη νόσο [Abraham C et al, 2009].

Ένας από τους μηχανισμούς άμυνας είναι η φαγοκυττάρωση των παθογόνων από τα μακροφάγα της υποβλεννογόνιου στοιβάδας. Έκκριση TGF-β και IL-10 με αντιφλεγμονώδη δράση αλλά και φλεγμονωδών μεσολαβητών από κύτταρα της έμφυτης ανοσίας συνεισφέρουν στην άμυνα του οργανισμού. Όσον αφορά τα T κύτταρα, τόσο τα ρυθμιστικά (Tregs) όσο και τα T κύτταρα-τελεστές (Th1, Th2, Th17) βρίσκονται σε ομοιοστατική ισορροπία [Abraham C et al, 2009].

Η IBD χαρακτηρίζεται από μια χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου η οποία δεν μπορεί να ρυθμιστεί και οφείλεται στη δυσλειτουργία τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας του οργανισμού. Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού στην αντιμετώπιση ενός παθογόνου και γι' αυτό το λόγο έχει άμεση, μη ειδική δράση εντός λεπτών ή ωρών. Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, δενδριτικά, επιθηλιακά κα.) αναγνωρίζουν το παθογόνο μέσω των υποδοχέων TLRs (Toll-Like Receptors) στην

επιφάνεια ή των NOD-like υποδοχέων στο εσωτερικό των κυττάρων. Στην IBD, η έκφραση και η λειτουργία των υποδοχέων αυτών διαταράσσεται οδηγώντας σε παθολογικό φαινότυπο. Παράγονται αυξημένα επίπεδα Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 και χημειοκινών [Abraham C et al, 2009]. Ακόμη, η αλλοίωση του επιθηλιακού φραγμού (διαταραχή της στιβάδας βλέννας, δυσλειτουργία των στεγανών συνδέσεων του επιθηλίου) οδηγεί στην αυξημένη εντερική διαπερατότητα και αυξημένη βακτηριακή προσκόλληση στο επιθήλιο (**Εικόνα 5B**) [Zhang YZ et al, 2014].

Όσον αφορά την επίκτητη ανοσία, σε αντίθεση με την έμφυτη περιλαμβάνει ειδικούς μηχανισμούς άμυνας και για το λόγο αυτό δρα σε ημέρες μετά τη μόλυνση. Τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκινών που αναφέραμε ότι παράγονται από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας στρατολογούν πλήθος Th1 και Th2 κυττάρων τα οποία με τη σειρά τους επάγουν τη φλεγμονή. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα Th1 μέσα από έρευνες έχουν συνδεθεί με τη CD, καθώς στρατολογούνται από την IL-12 και παράγουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες IL-2 και IFN- γ από ό,τι τα T-κύτταρα από ασθενείς με UC ή από άτομα ελέγχου. Αντίστοιχα, τα κύτταρα Th2 έχουν συνδεθεί με την UC, όπου υπάρχουν υψηλότερα επίπεδα της IL-13 από ό,τι τα T κύτταρα από μάρτυρες ή ασθενείς με CD [Zhang YZ et al, 2014]. Ακόμη, στην IBD παρατηρείται έντονη διεύρυνση των ορίων της υποβλεννογόνιου στοιβάδας, που περιέχει υψηλό αριθμό CD4⁺ T-κυττάρων, εκκρίνουν επίσης αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών και χημειοκινών με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση πρόσθετων λευκοκυττάρων και κατά συνέπεια έναν κύκλο φλεγμονής [Abraham C et al, 2009]. Επιπρόσθετα, η IL-6 και ο TGF- β επάγουν τη διαφοροποίηση των CD4⁺ προς Th17 κύτταρα που με τη σειρά τους παράγουν πλήθος κυτταροκινών, όπως IL-17A (υψηλά επίπεδα τόσο σε CD όσο και σε UC [Sugihara T et al, 2010]), IL-17F, IL-21 (υψηλά επίπεδα σε βλεννογόνο IBD [Sarra M. et al, 2010]) και IL-22 [Zhang YZ et al, 2014].

1.1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την έκθεση σε περιβαλλοντική ρύπανση, καθώς και την ψυχική υγεία του ατόμου. Ο βασικότερος και πιο μελετημένος παράγοντας κινδύνου είναι το κάπνισμα. Το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά το ρίσκο για εμφάνιση της CD, όμως φαίνεται να καταστέλλει την ανάπτυξη της UC. Οι τοξικές ουσίες στον καπνό του τσιγάρου επηρεάζουν την ακεραιότητα του εντερικού επιθηλίου και δυσχεραίνουν τις

αποκρίσεις της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας [Papoutsopoulou S et al, 2020]. Έρευνες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα επάγει φλεγμονώδη Th1-διαμεσολαβούμενη απόκριση, καθώς η νικοτίνη που περιέχεται στο τσιγάρο δρα στην υπομονάδα α7 των νικοτινικών υποδοχέων (nAChRs) και μεσολαβεί στη μείωση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα TNF-α. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει το μηχανισμό με τον οποίο φαίνεται πως το κάπνισμα δρα «ευεργετικά» για τη UC, η οποία όπως αναφέραμε προηγουμένως είναι Th2-διαμεσολαβούμενη [Johnson GJ et al, 2005] [Papoutsopoulou S et al, 2020]. Ένας ακόμη σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας στην αιτιοπαθογένεια της νόσου είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση. Δεν είναι τυχαίο ότι όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα επιδημιολογικά στοιχεία φανερώνουν πως η έξαρση της νόσου συμβαδίζει με την εκβιομηχάνιση των χωρών. Μια έρευνα στο Ηνωμένο Βασίλειο έδειξε τη συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων NO₂ και SO₂ στην ατμόσφαιρα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της IBD. Συγκεκριμένα, τα παιδιά και οι νεαροί ενήλικες που κατοικούσαν σε περιοχές με υψηλά επίπεδα ρύπων που σχετίζονται με την κυκλοφορία (NO₂) εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά CD, ενώ αυτοί που κατοικούσαν σε περιοχές με ρύπανση από τη βιομηχανία (SO₂) είχαν περισσότερες πιθανότητες για ανάπτυξη UC. Τα παιδιά φάνηκε πως ήταν πιο επιρρεπή στην τοξική επίδραση των ρύπων, κάτι που δικαιολογείται με βάση την καθημερινότητά τους που τους θέλει να περνούν μεγαλύτερο ποσοστό του χρόνου τους σε εξωτερικούς χώρους σε σύγκριση με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Ως εκ τούτου, εκτίθενται περισσότερο στην ατμοσφαιρική αυτή ρύπανση και απορροφούν μεγαλύτερες ποσότητες ρύπων τους οποίους καταβολίζουν λιγότερο αποτελεσματικά [Karlan GG et al, 2010]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα που είχαν καταγράψει χαμηλότερα επίπεδα στρες εμφάνισαν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, κάτι που έθεσε τις βάσεις για την υπόθεση ότι διάφορες συνιστώσες της ψυχικής υγείας, συμπεριλαμβανομένης της κατάθλιψης και του άγχους, είναι πολύ πιθανό να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδείνωση της IBD. Πράγματι, μια μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε αντικαταθλιπτική αγωγή είχαν λιγότερες υποτροπές της νόσου [Goodhand JR et al, 2012].

1.1.4 Θεραπεία της νόσου

Η θεραπεία της IBD θα πρέπει αρχικά να στοχεύει στην επαγωγή της ύφεσης της νόσου και στη συνέχεια στη διατήρηση αυτής της φάσης. Η φλεγμονή που προκαλείται στο γαστρεντερικό ιστό όταν ένα άτομο ασθενεί με φλεγμονώδη νόσο

του εντέρου είναι ο κύριος στόχος των θεραπευτικών προσεγγίσεων που έχουν αναπτυχθεί, οι οποίες περιλαμβάνουν κατά κύριο λόγο αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Σε αυτή την κατηγορία φαρμάκων ανήκουν τα **κορτικοστεροειδή**, τα οποία αποτελούν τη σημαντικότερη θεραπευτική μέθοδο για την πρόκληση της ύφεσης της νόσου. Ακόμη, οι **φαρμακευτικές ενώσεις με βάση το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ (5-ASA)**, όπως για παράδειγμα η σουλφασαλαζίνη και η μεσαλαζίνη έχουν αποδειχτεί ασφαλείς και αποτελεσματικές για την αντιμετώπιση της UC, όχι όμως για τη CD. Στην περίπτωση της CD οι ενώσεις αυτές πιθανότατα θα ήταν ωφέλιμες σε περιπτώσεις ήπιας νόσου και μόνο σε πολύ υψηλές δόσεις [Wright EK et al, 2018].

Μια άλλη κατηγορία φαρμάκων για την αντιμετώπιση της IBD είναι οι **ανοσοτροποποιητές** (immunomodulators). Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι θειοπουρίνες (όπως για παράδειγμα η αζαθειοπρίνη και η 6-μερκαπτοπουρίνη) και η κύρια λειτουργία τους είναι η διατήρηση της φάσης ύφεσης τόσο στη CD όσο και στη UC. Για τους ασθενείς με δυσανεξία στις θειοπουρίνες χρησιμοποιείται ευρέως η μεθοτρεξάτη. Παρόλα αυτά, οι θειοπουρίνες είναι γνωστές για τις τοξικές τους επιπτώσεις, γι' αυτό το λόγο πρέπει να γίνεται σωστή και ολοκληρωμένη ενημέρωση των ασθενών πριν τη χορήγησή τους [Wright EK et al, 2018]. Οι γνωστότεροι κίνδυνοι περιλαμβάνουν τη λευκοπενία, διάφορες ιογενείς λοιμώξεις, καθώς επίσης και αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης λεμφώματος ή καρκίνου του δέρματος [Ariyaratnam J. et al, 2014].

Σε περιπτώσεις επίμονης νόσου που δεν καταστέλλεται με ανοσοτροποποιητικές θεραπείες, προσεγγίζονται οι **βιολογικές φαρμακευτικές θεραπείες** και συγκεκριμένα η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, επίσης γνωστά ως mAbs (monoclonal Antibodies), είναι συνθετικές ενώσεις και δεσμεύονται σε ειδικά επιλεγμένες πρωτεΐνες-στόχους στο σώμα [Bayer V, 2019]. Η πρώτη κατηγορία αυτών των βιολογικών φαρμάκων είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του TNF-α. Για την αντιμετώπιση της CD χρησιμοποιούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα adalimumab και infliximab, ενώ για τη UC πέρα από αυτά τα δύο γίνεται και χρήση του golimumab. Η συνδυαστική θεραπεία (δηλαδή η χορήγηση θειοπουρινών και η ταυτόχρονη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντι-TNF-α) φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με την απλή θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα [Wright E.K. et al, 2018]. Ωστόσο, η χρήση αυτών των αντι-TNF-α μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει συσχετιστεί με την επανεμφάνιση λοιμώξεων όπως η φυματίωση ή η ηπατίτιδα B [Dave M. et al, 2014]

καθώς και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μελανώματος [Raaschou P. et al, 2013]. Το μονοκλωνικό αντίσωμα vedolizumab έχει ως κύριο ρόλο την αναστολή της διακίνησης των λευκοκυττάρων στο έντερο μέσω αναστολής της α -4 β -7 ιντεγκρίνης. Αυτό οδηγεί στην επιλεκτική αντιφλεγμονώδη δράση του εντέρου, κάτι που καθιστά το συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα πιο ασφαλή επιλογή σε σύγκριση με τα αντι-TNF- α . Τέλος, το μονοκλωνικό αντίσωμα ustekinumab έχει αποτελεσματική δράση έναντι της CD. Τόσο το vedolizumab όσο και το ustekinumab δεν έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση κακοήθειας [Wright EK et al, 2018].

1.2 Μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

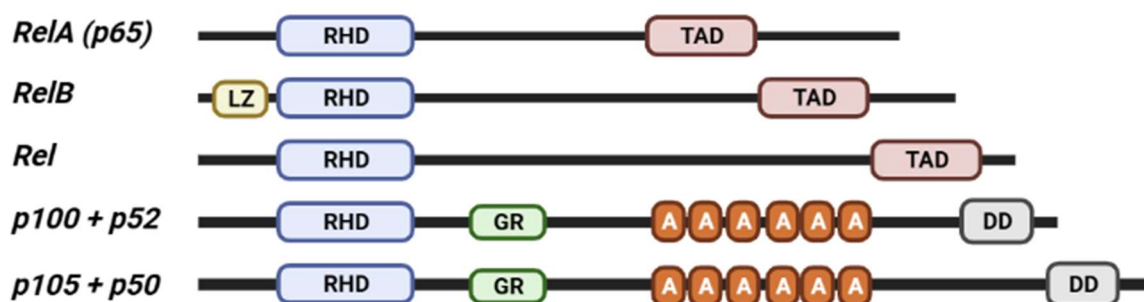
Η λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) περιγράφηκε πρώτη φορά το 1986 από τους Ranjan Sen και David Baltimore, οι οποίοι τον περιέγραψαν ως μια πυρηνική πρωτεΐνη που εντοπίζεται μόνο σε κύτταρα που μεταγράφουν γονίδια της ελαφριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης [Sen R & Baltimore D, 1986]. Μετά την ανακάλυψή του σχεδόν 40 χρόνια πριν, ο NF- κ B έχει βρεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, λόγω της πολυδιάστατης λειτουργίας του, και της συμμετοχής του στην παθογένεση πολλών ασθενειών. Πλέον γνωρίζουμε ότι ο NF- κ B εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και ρυθμίζει την έκφραση περίπου 500 γονιδίων (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>), τα οποία συμμετέχουν σε σημαντικές φυσιολογικές διεργασίες όπως η φλεγμονή, η ανοσία, ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος [Zinatizadeh MR et al, 2020].

Ο NF- κ B αποτελεί βασικό ρυθμιστή της ανοσίας και συγκεκριμένα της φλεγμονώδους απόκρισης, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων χημειοκινών και προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNF- α και η IL-1 β που είναι ισχυρά μόρια-επαγωγής του NF- κ B. Ενεργοποιείται μετά από πλήθος σημάτων, συμπεριλαμβανομένων των μοριακών μοτίβων από παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Pathways, PAMPs) της έμφυτης ανοσίας, όπως για παράδειγμα η αναγνώριση του βακτηριακού λιποσακχαρίτη LPS από τον υποδοχέα TLR4. Όσον αφορά την επίκτητη ανοσία, το σήμα για την ενεργοποίηση του NF- κ B έρχεται από την αναγνώριση των αντιγόνων του παθογόνου που παρουσιάζονται

από το αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και αναγνωρίζονται από τους TCR των T κυττάρων και τους BCR των B κυττάρων [Zinatizadeh MR et al, 2020].

1.2.2 Μέλη οικογένειας NF-κB

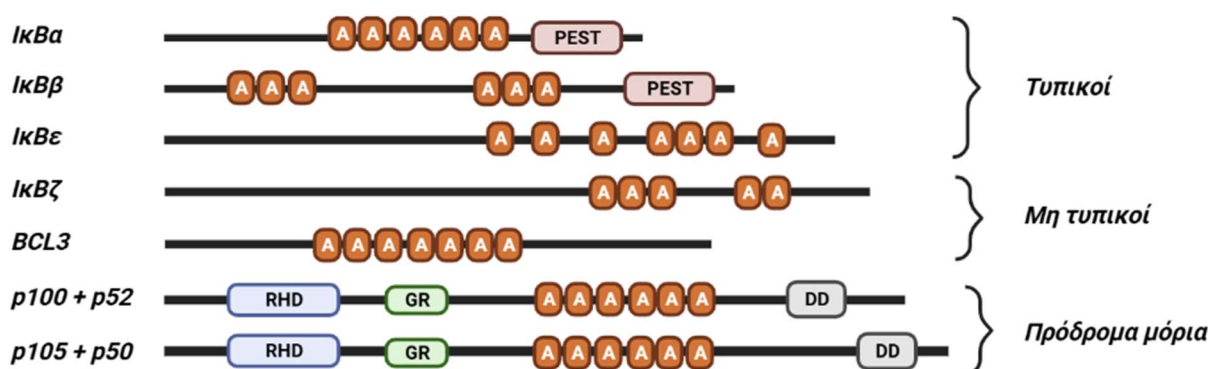
Η ονομασία NF-κB χρησιμοποιείται για την αναφορά σε έναν μεταγραφικό παράγοντα, όμως στην πραγματικότητα πρόκειται για μια οικογένεια πέντε παραγόντων, τις πρωτεΐνες RelA (p65), RelB, c-Rel, p100/p52 και p105/p50 οι οποίες συνδυάζονται και δημιουργούν 15 πιθανούς συνδυασμούς ομο- ή ετεροδιμερών πρωτεϊνών (**Εικόνα 6**). Όσον αφορά τη δομή των πρωτεϊνών, αυτή απεικονίζεται στην εικόνα 6. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας έχουν μια περιοχή ομολογίας, τη Rel Homology Domain (RHD) 300 αμινοξέων κοντά στο αμινοτελικό τους άκρο, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA, το διμερισμό, αλλά και την αλληλεπίδραση με τους αναστολείς τους, τις πρωτεΐνες IκBs (βλέπε 1.2.3). Οι RelA, RelB και c-Rel έχουν μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Transcription Activation Domain, TAD) κοντά στο καρβοξυτελικό τους άκρο, οι οποίες δεν υπάρχουν στις p100 και p105. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν πρόδρομα μόρια των p52 και p50 αντίστοιχα, τα οποία προκύπτουν μετά από πρωτεόλυση και απομάκρυνση του τμήματος πλούσιο σε αγκυρίνη (Ankyrin Repeat, AnkR). Οι περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη (Glycine Rich, GR) δίνουν το σήμα για την επεξεργασία στο πρωτεάσωμα. Η RelB είναι η μόνη πρωτεΐνη με φερμουάρ λευκίνης (Leucine Zipper, LZ) στο αμινοτελικό της άκρο [Zinatizadeh MR et al, 2020], [Carmody, R] et al, 2007].



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας NF-κB (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

1.2.3 Πρωτεΐνες IκB – αναστολείς του NF-κB

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB είναι αυστηρά ρυθμιζόμενο, καθώς επηρεάζει την έκφραση πολλών γονιδίων. Οι κύριοι ρυθμιστές του NF-κB είναι οι πρωτεΐνες της οικογένειας αναστολέων IκB που συνήθως βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Οι αναστολείς IκB μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες: τους τυπικούς (IκBa, IκBβ, IκBε), τους μη τυπικούς (IκBζ, BCL3) και τα πρόδρομα μόρια (p100/p52 και p105/p50). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 7**, όλες αυτές οι πρωτεΐνες έχουν παρόμοια δομή: έχουν μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων αγκυρίνης, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με την περιοχή RHD του NF-κB. Όσον αφορά τον εντοπισμό τους, οι αναστολείς IκBa, IκBβ, IκBγ και IκBε βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζουν την πυρηνική μετατόπιση του NF-κB. Αυτή επιτυγχάνεται μόνο μετά από την πρωτεασωμική αποικοδόμηση των παραγόντων αυτών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση αυτών των αναστολέων επάγεται από τον παράγοντα NF-κB, επομένως πρόκειται για ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Τέλος, οι IκBζ, IκBNS, Bcl-3 εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, χωρίς να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους [Carmody, RJ et al, 2007].

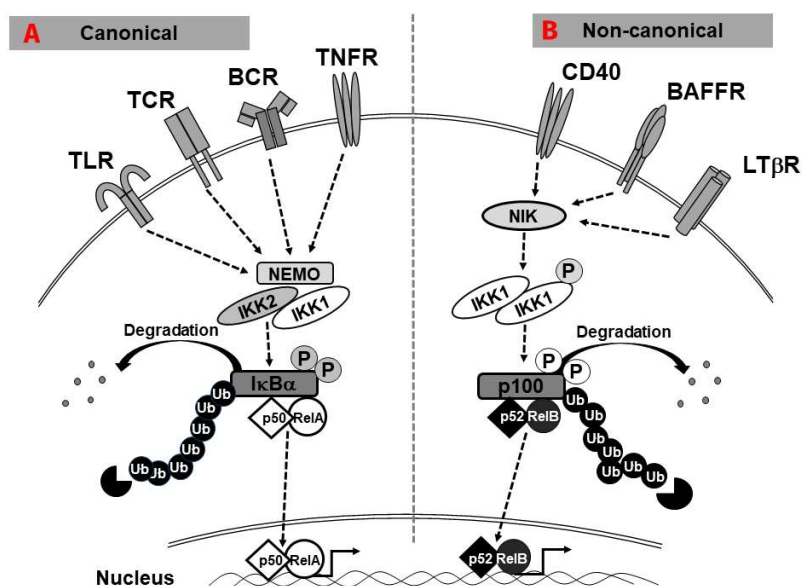


Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της δομής των πρωτεϊνών- αναστολέων του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

1.2.4 Κανονικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB στην πραγματικότητα συμμετέχει σε 2 σηματοδοτικά μονοπάτια: το κανονικό (canonical pathway) και το μη κανονικό ή εναλλακτικό μονοπάτι (noncanonical pathway). Ένα πλήθος μορίων, όπως για παράδειγμα φλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF, IL-1) ή μοριακά μοτίβα από παθογόνα (Pathogen-Associated Molecular Pathways, PAMPs) λειτουργούν ως σήματα και αναγνωρίζονται από υποδοχείς τύπου Toll (Toll-Like Receptors, TLRs) και

υποδοχείς των Β και Τ λεμφοκυττάρων (BCRs και TCRs αντίστοιχα). Η **Εικόνα 8Α** απεικονίζει το κανονικό σηματοδοτικό μονοπάτι: το σήμα για τη φλεγμονή ενεργοποιεί το σύμπλεγμα NEMO/IKK1/2. Η πρωτεΐνη NEMO (NF-κΒ Essential Modulator) είναι μια πρωτεΐνη-αντάπτορας και συγκεκριμένα η IKK γ , ενώ οι IKK1/2 είναι οι κινάσες IKK α και IKK β , είναι δηλαδή σύμπλεγμα κινάσων των αναστολέων ΙκΒ. Με την ενεργοποίηση του συμπλόκου αυτού, οι κινάσες δεσμεύονται σε αναστολείς ΙκΒ και φωσφορυλιώνουν σερίνες στο αμινοτελικό τους άκρο, με αποτέλεσμα την ουβικιτινυλίωση και κατά συνέπεια την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα. Το διμερές NF-κΒ πλέον είναι ελεύθερο να μεταφερθεί στον πυρήνα και να ρυθμίσει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Σε αυτά τα γονίδια-στόχους συμπεριλαμβάνονται αυτά των ΙκΒ α ,β,ε και το p100 που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά για το διμερές NF-κΒ. Επιπλέον, η πρωτεΐνη NEMO λειτουργεί ως «ικρίωμα» μεταξύ των IKK και ΙκΒ α , κατευθύνοντας έτσι τη δραστηριότητα της IKK στο ΙκΒ α . Έτσι, εξασφαλίζεται ότι μέσω του NEMO ενεργοποιούνται τα διμερή RelA/p50 που στα περισσότερα κύτταρα συνδέονται με τον ΙκΒ α [Mitchell S et al, 2016].



Εικόνα 8. Συνοπτική παρουσίαση των σηματοδοτικών μονοπατιών του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, καθώς και των ποικίλων υποδοχέων που τον ενεργοποιούν. (Α) Κανονικό (canonical) μονοπάτι, εξαρτώμενο από τη δράση της κινάσης IKK2 και (Β) Εναλλακτικό (non-canonical) μονοπάτι, εξαρτώμενο από τη δράση της κινάσης IKK1 [Papoutsouroulou S et al, 2021].

1.2.5 Μη κανονικό (εναλλακτικό) μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ

Το μη κανονικό ή εναλλακτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ ελέγχει ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, όπως η επιβίωση και ωρίμανση των Β κυττάρων, η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων αλλά και ο μεταβολισμός στα οστά [Dejardin E. et al, 2006]. Τα σήματα που πυροδοτούν την έναρξη του εναλλακτικού μονοπατιού σηματοδότησης του NF-κΒ είναι κυρίως αναπτυξιακά σήματα που ενεργοποιούν τους υποδοχείς TNF (όπως BAFFR, CD40, LTβR, RANK, TNFR2 κα). Τα σήματα αυτά ενεργοποιούν το σύμπλοκο NIK/IKK1, όπου NIK είναι μια κινάση που επάγει τον NF-κΒ (NF-κΒ Inducing Kinase) (**Εικόνα 8B**). Το σύμπλοκο αυτό φωσφορυλιώνει μια σερίνη του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης p100 [Zinatizadeh MR et al, 2020] που συνήθως βρίσκεται στο ανασταλτικό σύμπλοκο IκΒδ και τη μετατρέπει σε p52. Έτσι, η p52 δεσμεύει τον παράγοντα RelB και δημιουργείται διμερές που μετατοπίζεται στον πυρήνα για την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων-στόχων. Επίσης, το p100 αποικοδομείται μερικώς και απελευθερώνονται με αυτό τον τρόπο τα διμερή που ανέστειλε το IκΒδ [Mitchell S et al, 2016].

1.3 Ο NF-κΒ στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου

Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες αιτιοπαθογένειας της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου είναι η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Έρευνες έχουν δείξει ότι κατά την παθογένεση της IBD παρατηρείται απορρυθμισμένη σηματοδότηση και παραγωγή κυτοκινών σε μακροφάγα, επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου αλλά και λεμφοκύτταρα, καθώς και ότι ο παράγοντας NF-κΒ παίζει πρωταγωνιστικό ρυθμιστικό ρόλο σε αυτό.

Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν ότι στη χρόνια φλεγμονή του εντέρου των ασθενών ο παράγοντας NF-κΒ είναι ενεργοποιημένος. Σε μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα από τα δείγματα εντερικού ιστού βρέθηκαν αυξημένα ποσοστά NF-κΒ p65, τα οποία συσχετίστηκαν σημαντικά με τη σοβαρότητα της φλεγμονής (μεγάλη ποσότητα ενεργοποιημένου NF-κΒ σημαίνει σοβαρή νόσος) [Atreya I et al, 2008]. Εκτός από αυτούς τους δυο τύπους κυττάρων, προφλεγμονώδη ρόλο με τη μεσολάβηση του παράγοντα NF-κΒ φάνηκε να παίζουν και οι ινοβλάστες της υποβλεννογόνιου στιβάδας [Gelbmann CM et al, 2003]. Τα διμερή NF-κΒ με p65 έχουν προφλεγμονώδη δράση, ενώ το διμερές p50 συνήθως μπλοκάρει θέσεις δέσμησης του NF-κΒ και συνεπώς την έκφραση

γονιδίων-στόχων. Επίσης, ασθενείς με CD εξέφραζαν σε μεγαλύτερο βαθμό τον p65 από τους ασθενείς με UC [Schreiber S et al, 1998].

Τα μακροφάγα της βλεννογόνου παράγουν και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες TNF-α, IL-1 και IL-6 τα οποία είναι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που ρυθμίζονται από τον NF-κΒ και φαίνεται να εμπλέκονται άμεσα στην παθολογική εικόνα του εντέρου [Atreya I et al, 2008]. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αφορά τη δράση των TNF-α και IL-1 τα οποία μεσολαβούν για την αυξημένη έκφραση μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης θεμέλιας ουσίας (Matrix Metalloproteinase, MMP) με αποτέλεσμα τη βλάβη της εξωκυττάριας ουσίας και την αποδόμηση του βλεννογόνου [Pallone F et al, 2001]. Στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ο NF-κΒ ρυθμίζει τόσο την προ- όσο και την αντιφλεγμονώδη απόκριση, με σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου αλλά και την εντερική ανοσολογική ομοιοστάση [Atreya I et al, 2008]. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη σε ποντίκια, οι ερευνητές ανέστειλαν τη λειτουργία του NEMO και κατά συνέπεια τη σηματοδότηση NF-κΒ. Το αποτέλεσμα ήταν η διαταραχή της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου και η χρόνια εντερική φλεγμονή, καθώς τα κύτταρα χωρίς NEMO εμφάνισαν υψηλά ποσοστά απόπτωσης και μειωμένη παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων [Nenci A et al, 2007].

1.4 Απορρύθμιση του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης NF-κΒ σε άλλες ασθένειες

Η χρόνια φλεγμονή και συγκεκριμένα η απορρύθμιση της λειτουργίας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ έχει αποδειχτεί ότι συνδέεται άμεσα με την παθογένεση πολλών ασθενειών εκτός της IBD, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η οστεοαρθρίτιδα, ο διαβήτης, ο καρκίνος αλλά και παθήσεις του ΚΝΣ (**Εικόνα 9**). Πολλές μορφές καρκίνου συνδέονται άμεσα με τον NF-κΒ, καθώς αυτός ο παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση πάνω από 500 γονιδίων που σχετίζονται με την ογκογένεση [Gurta SC et al, 2018]. Συγκεκριμένα, η απορρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος στην IBD που οδηγεί σε χρόνια φλεγμονή στον εντερικό ιστό σχετίζεται με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Πολλές μελέτες γονιδιώματος έχουν δείξει ότι παρατηρείται σημαντική αύξηση της έκφρασης 5 γονιδίων (*MMP10*, *LCN2*, *REG1A*, *REG3A*, *DUOX2*) και στις δυο ασθένειες, αποκαλύπτοντας έτσι τη στενή σύνδεσή τους. Επίσης, η σηματοδότηση των IL-4 και IL-13 χαρακτηρίστηκε ως το κυρίαρχο κοινό μονοπάτι στους ασθενείς με IBD και καρκίνο του παχέος εντέρου [Derakhshani A et al, 2022].

Ο NF-κB εμπλέκεται και στην παθογένεση ρευματοειδούς αρθρίτιδας αλλά και οστεοαρθρίτιδας. Σύμφωνα με τους Roman-Blas JA et al, οι παράγοντες p50 και p65 (RelA) ανιχνεύονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες και στις δύο αυτές ασθένειες, με την ενεργοποίηση του NF-κB να είναι υψηλότερη στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ακόμη, σε πρωτογενή ινοβλαστοειδή αρθριτικά κύτταρα ασθενών εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα κινασών IKK και συγκεκριμένα οι IKKα/IKKβ εκφράζονται σε σταθερή βάση [Roman-Blas JA et al, 2006].

Τέλος, η δυσλειτουργία του μονοπατιού NF-κB συνδέεται και με παθήσεις του ΚΝΣ όπως για παράδειγμα η νόσος του Alzheimer. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το β αμυλοειδές πεπτίδιο ενεργοποιεί τον NF-κB, ο οποίος έχει υψηλότερη πυρηνική δραστηριότητα στους χολινεργικούς νευρώνες του πρόσθιου εγκεφάλου ασθενών. Ο εκφυλισμός αυτού του τύπου νευρώνων είναι ο παράγοντας που συμβάλλει στη γνωστική εξασθένιση στη νόσο του Alzheimer [Kumar A et al, 2004].



Εικόνα 9. Συσχετισμός του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB με την ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

1.5 Αναστολή δραστηριότητας NF-κB

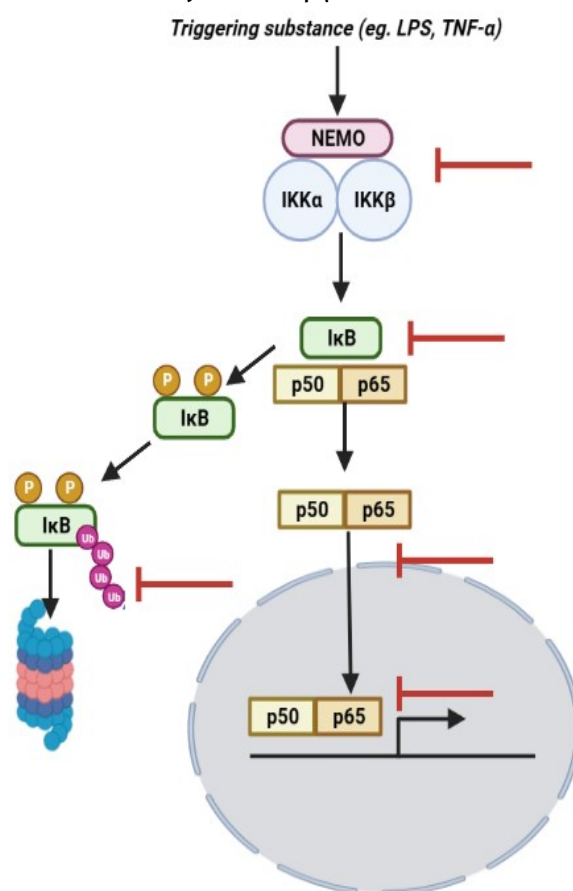
1.5.1 Στόχοι αναστολέων σηματοδότησης NF-κB

Όλα τα παραπάνω δεδομένα εξηγούν την επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων αποτελεσματικής αναστολής του NF-κB και των μονοπατιών ενεργοποίησής του. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότεροι από 700 αναστολείς, μεταξύ των οποίων διάφορα πεπτίδια, μικρά DNA/RNA, πρωτεΐνες μικροβίων και ιών, αντιοξειδωτικά κ.α. μερικά από τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Αυτοί οι αναστολείς μπορούν να ενταχθούν σε 3 κατηγορίες: τους

γενικούς αναστολείς ενεργοποίησης NF-κB, αυτούς που στοχεύουν σε ένα μοναδικό στάδιο του μονοπατιού αλλά και αυτούς που στοχεύουν πολλαπλά [Gurta SC et al, 2010]. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως (βλέπε 1.1.4), (κορτικοστεροειδή, αντι-TNF-α αντισώματα κ.α.) φάνηκε ότι είχαν αντιφλεγμονώδη δράση απενεργοποιώντας μερικά και έμμεσα τον παράγοντα NF-κB. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί μια έρευνα στην οποία οι ασθενείς με IBD μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδών εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά πυρηνικού p65 σε σχέση με τους ασθενείς χωρίς θεραπεία. Στην ουσία, τα κορτικοστεροειδή επάγουν την έκφραση της IκBα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της πρωτεΐνης, τη δέσμευσή της στον NF-κB και την παραμονή του στο κυτταρόπλασμα [Atreya I et al, 2008].

Αυτοί οι παράγοντες ενώ αναστέλλουν μερικώς τον NF-κB, αυτό γίνεται με έμμεσο τρόπο. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη πιο ευαίσθητων αναστολέων ειδικών για τον NF-κB αλλά και επιμέρους βήματα στο μονοπάτι σηματοδότησής του (**Εικόνα 10**). Η πρώτη προσέγγιση αφορά την αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών. Με την αναστολή των κινασών IKK που ενεργοποιούν τους αναστολείς IκB, αυτοί δεν φωσφορυλιώνονται και συνεπώς δεν ενεργοποιούνται.

Με αυτό τον τρόπο, το σύμπλοκο αναστολέα- NF-κB παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Ορισμένα παραδείγματα αυτού του είδους των αναστολέων είναι τα ανάλογα ATP, μόρια με αλλοστερική δράση σε IKK και μόρια που αλληλεπιδρούν με την κυστεΐνη 179 στο βρόχο ενεργοποίησης των IKK. Να σημειωθεί ότι μια αναστολή αυτού του είδους θα μπορούσε να επιτευχθεί και σε γονιδιακή βάση με μεταλλάξεις π.χ. στο σημείο πρόσδεσης του ATP [Gurta SC et al, 2010]. Ακόμη, έχει μελετηθεί η αναστολή του μονοπατιού με τη χρήση πρωτεϊνικών φωσφατάσων. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A) που είναι μια φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης, έχει αποδειχτεί ότι αποφωσφορυλιώνει και

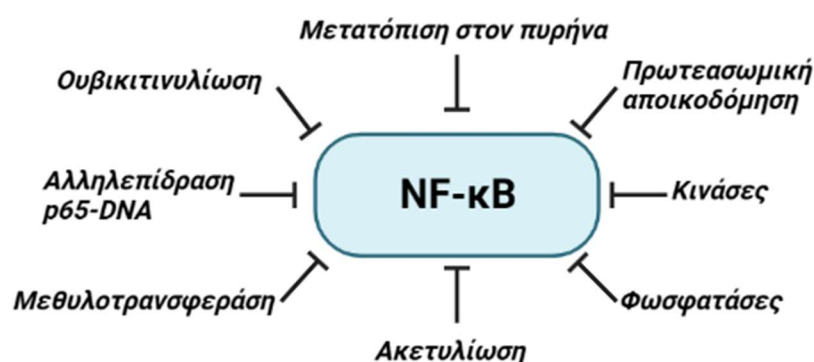


Εικόνα 10. Στόχοι για τη θεραπευτική αναστολή του NF-κB (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

έτσι ρυθμίζει τη δραστηριότητα της ΙΚΚβ [Barisic S et al, 2008].

Μια ακόμη προσέγγιση είναι η αναστολή της ουβικιτινυλίωσης και του πρωτεασώματος. Είναι γνωστό ότι η φωσφορυλίωση του αναστολέα ΙκΒ οδηγεί στην ουβικιτινυλίωσή του και κατά συνέπεια η αποικοδόμησή του από το 26S πρωτεάσωμα. Οι Yaron et al. έδειξαν ότι ορισμένα φωσφοπεπτίδια κατάφεραν να εμποδίσουν την αποικοδόμηση του ΙκΒα, καθώς δρούσαν ανταγωνιστικά για τη σύνδεση με τη λιγάση ουβικιτίνης [Yaron A et al, 1997].

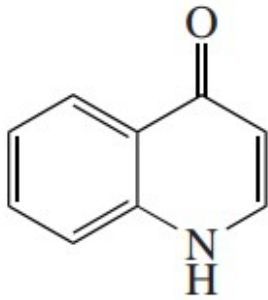
Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόρια για το μπλοκάρισμα της μεταφοράς του NF-κΒ στον πυρήνα. Συγκεκριμένα, η βιβλιογραφία αναφέρει πως ορισμένα μικρά πεπτίδια περνούν την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας υδρόφοβης περιοχής τους και ανταγωνίζονται το διμερές NF-κΒ για τους μηχανισμούς μεταφοράς στον πυρήνα [Gupta SC et al, 2010]. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι τα μικρά αυτά πεπτίδια είναι πιθανό να εμποδίσουν την πυρηνική μεταφορά και άλλων μεταγραφικών παραγόντων [Torgerson TR et al, 1998]. Τέλος, υπάρχουν αναστολείς για το μπλοκάρισμα της πρόσδεσης του διμερούς NF-κΒ στο DNA, όταν αυτό έχει μπει στον πυρήνα. Κάποια ολιγονουκλεοτίδια-«δόλωμα» (decoy nucleotides, ODNs) μπορούν να συνδεθούν άμεσα με τον NF-κΒ μέσω των αλληλουχιών κΒ που περιέχουν. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια μπορούν να τροποποιηθούν με τρόπο ώστε να αυξηθεί η σταθερότητά τους. Εκτός από αυτά, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι ορισμένες λακτόνες στοχεύουν τόσο στη δραστηριότητα των ΙΚΚ μετά από την αλληλεπίδραση με την κυστεΐνη 179 στο βρόχο ενεργοποίησης της κινάσης, όσο και στην πρόσδεση της RelA στο DNA αφού αλληλεπιδρούν με την κυστεΐνη 38 στο βρόχο πρόσδεσης στο DNA [Gupta SC et al, 2010] (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11. Πιθανοί στόχοι για την αναστολή της οδού ενεργοποίησης του NF-κΒ (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

1.5.2 Οργανικά μόρια – αναστολείς

Σε αυτή τη μελέτη θα χρησιμοποιηθούν μικρά οργανικά μόρια για την αναστολή της δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Ορισμένα από αυτά τα οργανικά μόρια ανήκουν στις κινολόνες, μια ομάδα διάφορων ισομερών κετονών που στην ουσία είναι κινολονικά καρβοξυλικά οξέα ή 4-κινολόνες και δομικά περιέχουν σκελετό 4-οξο-1,4-διυδροκινολόνης, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 12**.



Εικόνα 12. Δομή κινολόνης [Serafin A et al, 2009]

Οι κινολόνες είναι ειδικοί αναστολείς τόσο για τη βακτηριακή γυράση του DNA (τοποϊσομεράση II) όσο και για την τοποϊσομεράση IV, εμποδίζοντας τους μηχανισμούς της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η αδρανοποίηση αυτών των ενζύμων καταστρέφει τα βακτήρια, επομένως αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο αποκτούν την αντιμικροβιακή και βακτηριοκτόνο ιδιότητά τους [Athanasellis G et al, 2003] [Serafin A et al, 2009].

Συγκεκριμένα μας ενδιαφέρει η ομάδα των κινολονών (η δομή τους φαίνεται στην **Εικόνα 13**), ετεροκυκλικών ενώσεων με α,β-ακόρεστες καρβονυλικές δομές που αντιδρούν με νουκλεόφιλα μέσω Michael προσθήκης και κυρίως με σουλφιδριλικές ομάδες κυστεϊνών. Σε αυτή την αντίδραση βασίζεται η επιλογή αυτών των ενώσεων ως μικρών οργανικών μορίων-αναστολέων του NF-κΒ, καθώς ο στόχος είναι να υπάρξει αλληλεπίδραση μεταξύ των κινολονών με 2 κυστεΐνες του p65, τη cys38 και τη cys120. Με αυτό τον τρόπο, ο παράγοντας p65 αδυνατεί να συνδεθεί στο DNA επομένως δεν μπορούν να εκφραστούν τα γονίδια-στόχος.



Εικόνα 13. Δομή κινολονώνης

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιοποίηση συγκεκριμένης διαγονιδιακής ανθρώπινης κυτταρικής σειράς για τη μελέτη της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Καθορίστηκαν οι ακριβείς πειραματικές συνθήκες καλλιέργειας και ενεργοποίησης, όπως ο αριθμός των κυττάρων, ο χρόνος καλλιέργειας, η δόση και ο χρόνος ενεργοποίησης.

Πρωτότυπες μικρομοριακές οργανικές ενώσεις οι οποίες συντέθηκαν στο Εργαστήριο ΒιοΟργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας δοκιμάστηκαν κάτω από διαφορετικές συνθήκες και έγινε αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν *in vitro* τη δράση του φλεγμονώδους μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Τα πειράματα της συγκεκριμένης εργασίας αποτέλεσαν την αρχή για περαιτέρω δοκιμασίες προκειμένου να γίνει εις βάθος μελέτη της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ.

3. Υλικά – Μέθοδοι

3.1 Κυτταροκαλλιέργειες

3.1.1 Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας εργασίας είναι η NF-κB Luciferase Reporter HeLa Stable Cell Line από την εταιρεία Signosis. Πρόκειται για μια διαγονιδιακή κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων η οποία εκφράζει το γονίδιο της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του κανονικού μονοπατιού σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB/p65. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου ελέγχεται από την αλληλουχία που αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από το διμερές p65/p50. Η κυτταρική σειρά αυτή αναπτύχθηκε από τη Signosis μέσω της συνεπιμόλυνσης των κυττάρων με φορέα αναφοράς λουσιφεράσης NF-κB και φορέα έκφρασης της υδρομυκίνης. Οι ανθεκτικοί στην υδρομυκίνη κλώνοι μετά από επαγωγή της σηματοδότησης μέσω TNF-α ελέγχθηκαν για δραστηριότητα λουσιφεράσης.

3.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλοι οι χειρισμοί κυττάρων έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), με την προσθήκη αυξητικών παραγόντων [Fetal Bovine Serum (FBS)] και αντιβιοτικών (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη). Για την καλλιέργειά τους χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένες φλάσκες και επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

3.1.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν παρατηρείται 70-90% κάλυψη της επιφάνειας, με σκοπό την αφαίρεση των νεκρών κυττάρων. Τα κύτταρα HeLa είναι επιθηλιακά κύτταρα τραχήλου, επομένως κατά την ανάπτυξή τους δημιουργούν μονοστοιβάδα κυττάρων προσκολλημένη στο πλαστικό. Η αποκόλλησή τους γίνεται με τη βοήθεια της θρυψίνης, μιας ενζυμικής πρωτεάσης που διευκολύνει την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας, ενώ επιτυγχάνεται επίσης η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και του υποστρώματος στο οποίο καλλιεργούνται. Η

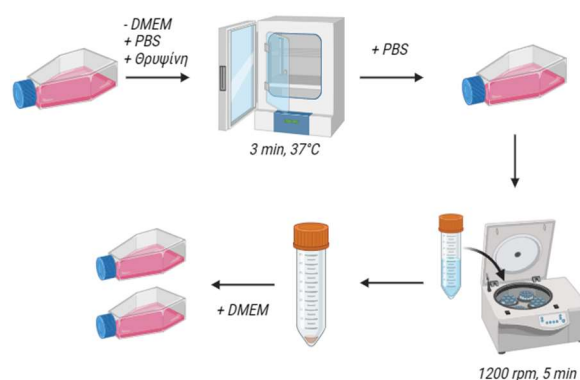
ανακαλλιέργεια των κυττάρων έγινε με αφαίρεση του προηγούμενου θρεπτικού υλικού, πλύση κυττάρων με ισότονο διάλυμα phosphate-buffered saline (PBS) και επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο DMEM.

3.1.4 Υποδιαίρεση (split) κυττάρων

Για την υποδιαίρεση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν:

Υλικά
Pipette controller (PIPETBOY acu 2)
Σιφώνια (5 ml, 10 ml)
Βαθμονομημένες πιπέτες
Ρύγχη πιπετών (tips)
Αποστειρωμένες φλάσκες
Επωαστικός κλίβανος
Falcon
Φυγόκεντρος

Αντιδραστήρια
Θρεπτικό μέσο DMEM
Ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS
Διάλυμα θρυψίνης



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας υποδιαίρεσης των κυττάρων (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

Η διαδικασία υποδιαίρεσης των κυττάρων είναι η εξής:

1. Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και κάνουμε πλύση με 2-3 ml PBS
2. Προσθέτουμε 0,5 ml διαλύματος θρυψίνης και τα βάζουμε στον επωαστήρα για 3 min στους 37°C
3. Προσθέτουμε 10 ml PBS και αναδεύουμε
4. Μεταφέρουμε το εναιώρημα σε falcon και το φυγοκεντρούμε (1200 rpm, 5 min)
5. Κρατάμε το ίζημα και προσθέτουμε 2 ml DMEM
6. Αναδεύουμε με πιπετάρισμα
7. Επαναιώρηση σε θρεπτικό DMEM και διαχωρισμός σε νέες φλάσκες

3.1.5 Αριθμός κυττάρων

Από το εναιώρημα κυττάρων βάζουμε από 10 μl σε 2 πλάκες Neubauer με σκοπό να γίνει η μέτρηση των κυττάρων σε οπτικό μικροσκόπιο. Χρησιμοποιούμε 2 πλάκες Neubauer προκειμένου να κάνουμε 2 μετρήσεις και στη συνέχεια να υπολογίσουμε το μέσο όρο του αριθμού κυττάρων.

Μετά τη μέτρηση είχαμε:

1^η πλάκα = 30 κύτταρα
2^η πλάκα = 40 κύτταρα

M.O. = 35 κύτταρα

$35 \cdot 10^4$ κύτταρα στο 1 ml δείγματος
x κύτταρα στα 3 ml δείγματος

$x = 105 \cdot 10^4 = 1 \cdot 10^6$ cells total

Στα 3 ml του falcon στο οποίο βρισκόταν τα κύτταρα, προσθέσαμε 7 ml θρεπτικό μέσο DMEM, με το συνολικό όγκο να φτάνει τα 10 ml. Από αυτό, προσθέσαμε 300 μl σε κάθε πηγαδάκι του 48-well plate (επομένως σε κάθε well = $3 \cdot 10^4$ κύτταρα) και τοποθετήσαμε τα κύτταρα στον επωαστήρα.

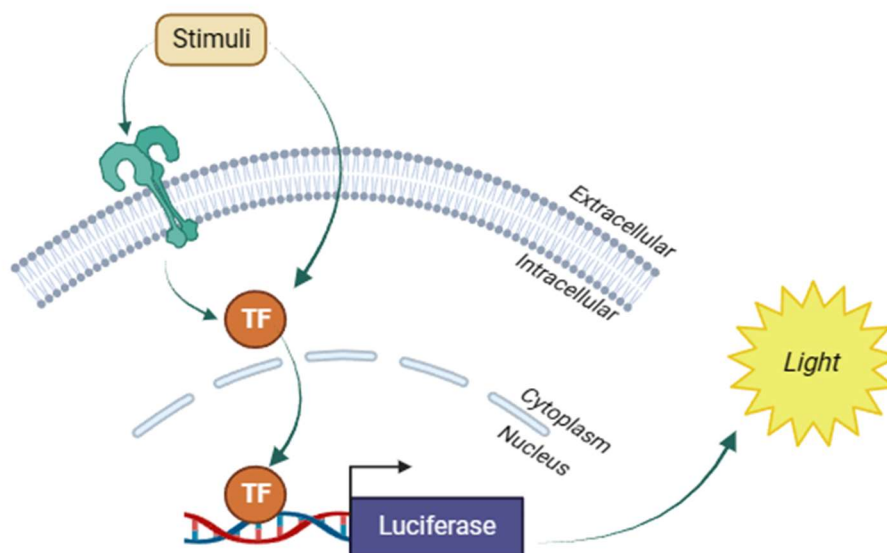
3.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η δοκιμασία λουσιφεράσης (luciferase assay) χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την παρακολούθηση της ενεργοποίησης ή της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, μετά από την παρουσία κατάλληλων ερεθισμάτων. Στην παρούσα μελέτη το stimulation των κυττάρων έγινε με τη χρήση του παράγοντα TNF-α.

3.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η δοκιμασία λουσιφεράσης είναι μια φωτομετρική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάκριση της ικανότητας μιας πρωτεΐνης είτε να διεγείρει είτε να αναστέλλει την ενεργοποίηση της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Βασισμένοι σε αυτή την αρχή, εξετάσαμε την επιτυχημένη ή όχι αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε κυτταρική σειρά στην οποία εκφράζεται το γονίδιο της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχό του [βλέπε 3.1.1]. Η λουσιφεράση, ένα ένζυμο που ανήκει σε οικογένεια οξειδωτικών ενζύμων, καταλύει το υπόστρωμά της (λουσιφερίνη) και παράγει φως μέσω του φαινομένου της χημειοφωταύγειας. Η

μέτρηση της έντασης του φωτός γίνεται με ειδικό εργαστηριακό όργανο που ονομάζεται λουμινόμετρο. Η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 15:



Εικόνα 15. Αρχή της μεθόδου της δοκιμασίας λουσιφεράσης (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

3.2.2 Πειραματική διαδικασία

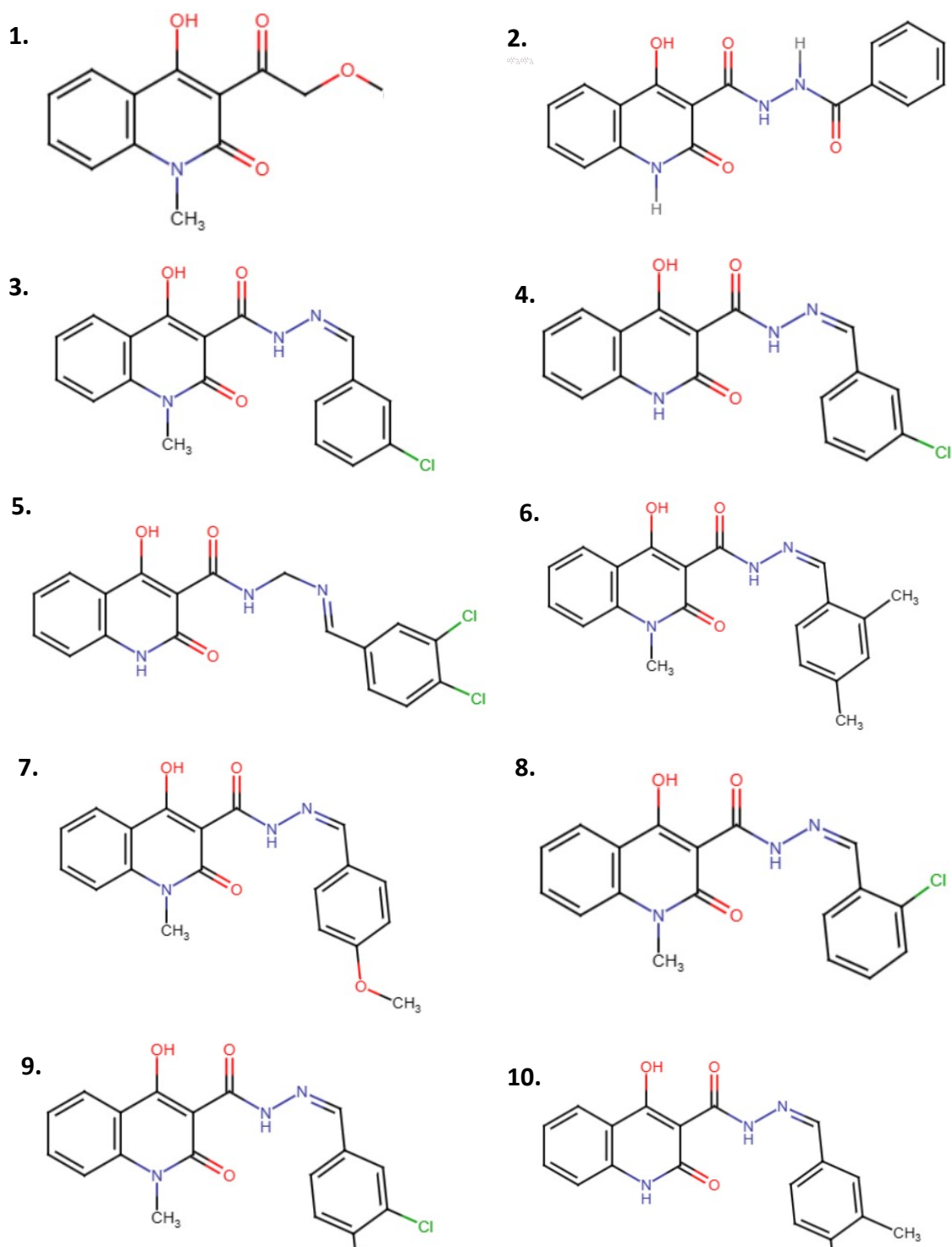
Υλικά	Αντιδραστήρια
Βαθμονομημένες πιπέτες	Recombinant human TNF alpha protein (ab9642)
Ρύγχη πιπετών (tips)	Ισότονο διάλυμα φωσφορικών PBS
96-well plate χημειοφωταύγειας (λευκό)	Αντιδραστήριο Bright-Glow 1:1 με PBS
Λουμινόμετρο EnSpire Multimode Plate Reader	

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα :

1. Προσθέτουμε 20 ng/ml human TNF-α για το stimulation των κυττάρων
2. Αφαιρούμε το medium μετά από 2 ώρες
3. Κάνουμε πλύση με 100 μl PBS
4. Προσθέτουμε 100 μl αντιδραστηρίου Bright-Glow της εταιρείας PROMEGA, αραιωμένο 1:1 με διάλυμα PBS
5. Επώαση για 5 λεπτά
6. Μεταφέρουμε στο λευκό 96-well plate χημειοφωταύγειας
7. Κάνουμε τις μετρήσεις στο λουμινόμετρο Multimode Plate Reader της εταιρείας Perkin Elmer

3.3 Αναστολείς του NF-κΒ

Τα οργανικά μόρια που εξετάστηκαν ως πιθανοί αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, ανήκουν στις κινολόνες [βλέπε 1.5.2] και απεικονίζονται παρακάτω:



Εικόνα 16. Μικρά οργανικά μόρια-αναστολείς [όλες οι εικόνες σχεδιάστηκαν με το [Chemspace - the largest catalog of small molecules and biologics \(chem-space.com\)](http://chem-space.com)]

4. Αποτελέσματα

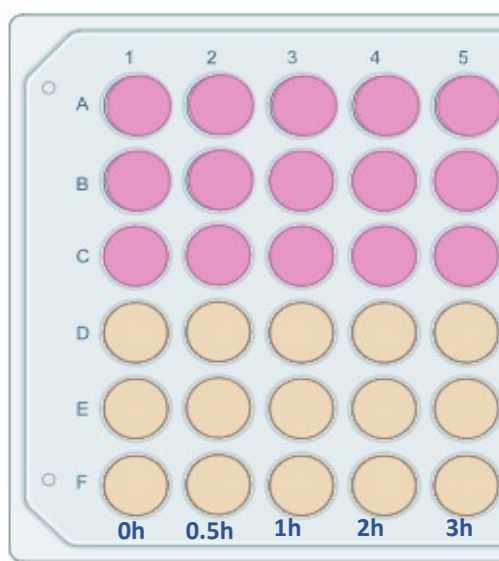
4.1 Συνθήκες καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς HeLa/NF-κB-Luc

Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά δοκιμάστηκαν ορισμένες συνθήκες, όπως ο αριθμός των κυττάρων και ο χρόνος καλλιέργειας. Οι συνθήκες στις οποίες καταλήξαμε είναι οι εξής:

- Μέρα 1: Καλλιέργεια 1×10^4 κυττάρων σε 100μl πλήρες θρεπτικό υλικό ανά πηγαδάκι, σε 96-well πιάτο καλλιέργειας.
- Τα κύτταρα αφήνονται να πολλαπλασιαστούν μέχρι την επόμενη ημέρα
- Μέρα 2: 16 ώρες αργότερα τα κύτταρα φαίνονται να καταλαμβάνουν το 80-90% της επιφάνειας και χρησιμοποιούνται σε πειραματική διαδικασία.

4.2 Ενεργοποίηση κυττάρων και διμεθυσουλφοξείδιο

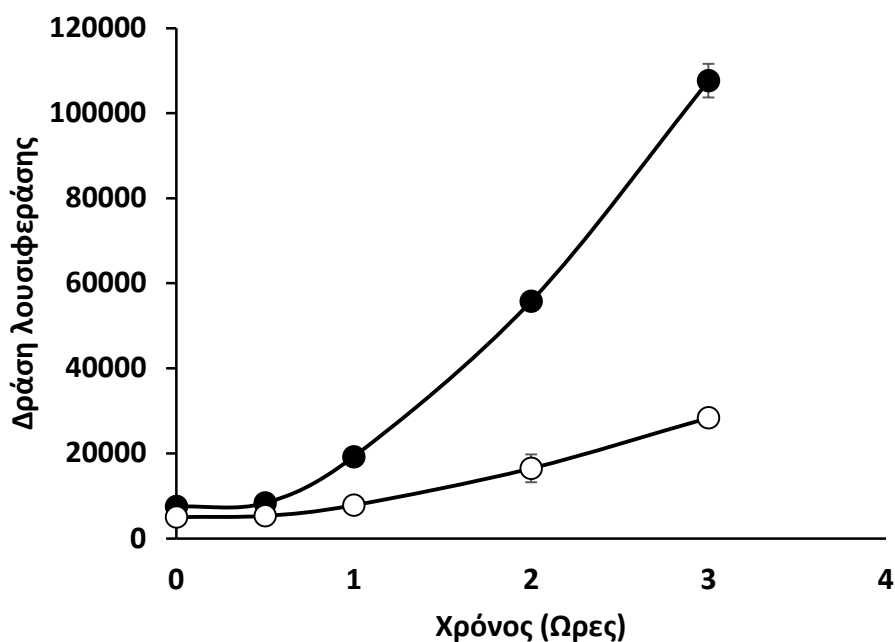
Ο οργανικός διαλύτης διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων των οργανικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Είναι γνωστό όμως ότι το DMSO μπορεί να επηρεάσει κυτταρικές λειτουργίες και να επιφέρει κυτταρικό θάνατο. Προκειμένου να ελέγξουμε και να αξιολογήσουμε τη δράση του στα κύτταρα, στο αρχικό πείραμα ελέγχθηκε η επίδραση συγκεκριμένης συγκέντρωσης DMSO (20μM) σε σχέση με το χρόνο ενεργοποίησης.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση του 48-well plate που χρησιμοποιήθηκε. Στα πηγαδάκια με ροζ χρώμα έγινε ενεργοποίηση των κυττάρων μόνο με TNF, ενώ σε αυτά με κίτρινο πριν το stimulation προστέθηκε διάλυμα DMSO με τελική συγκέντρωση 20 μM. (δημιουργήθηκε με το [Scientific Image and Illustration Software | BioRender](#))

Στην **Εικόνα 17**, φαίνονται οι συνθήκες του πειράματος όπου στα μισά πηγαδάκια που χρησιμοποιήθηκαν έγινε ενεργοποίηση των κυττάρων (θετικός μάρτυρας), ενώ στα υπόλοιπα προστέθηκε διάλυμα DMSO (τελική συγκέντρωση 20 μ M) πριν από την ενεργοποίηση. Η διάρκεια της ενεργοποίησης ήταν 0, 0.5, 1, 2 και 3 ώρες για τα πηγαδάκια των στηλών 1 έως 5 αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκαν 3 πηγαδάκια για κάθε συνθήκη (triplicates) για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας.

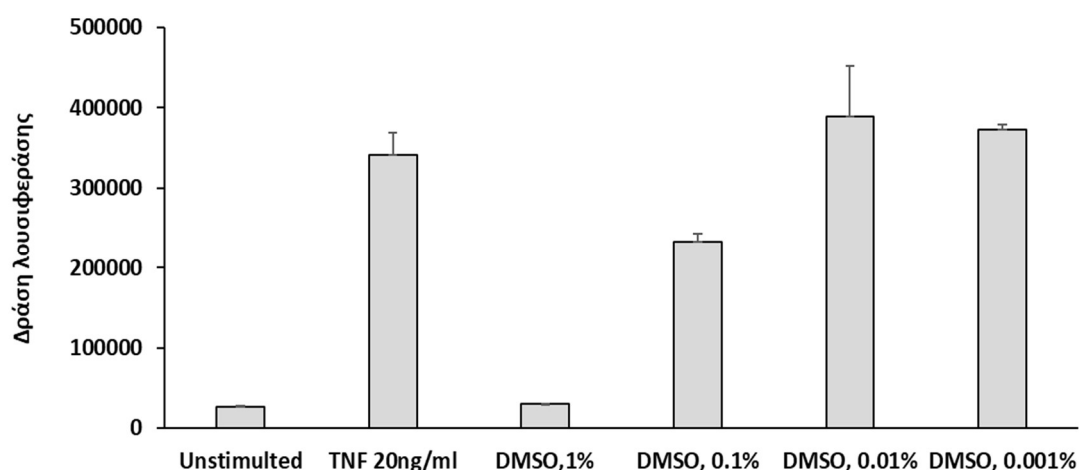
Για κάθε συνθήκη υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών από τα 3 αντίστοιχα πηγαδάκια. Στον άξονα x του γραφήματος σημειώνεται ο χρόνος σε ώρες, ενώ στον άξονα y η φωταύγεια. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, το DMSO αναστέλλει την παραγωγή σήματος της χημειοφωταύγειας με αυξανόμενη επίδραση με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα 18. Επίδραση του DMSO στη παραγωγή σήματος χημειοφωταύγειας σε κύτταρα HeLa/NFkB-Luc σε συνάρτηση με το χρόνο. Κύτταρα ενεργοποιημένα με TNF απουσία DMSO (μαύροι κύκλοι) ή παρουσία 20 μ M DMSO (άσπροι κύκλοι).

4.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του DMSO

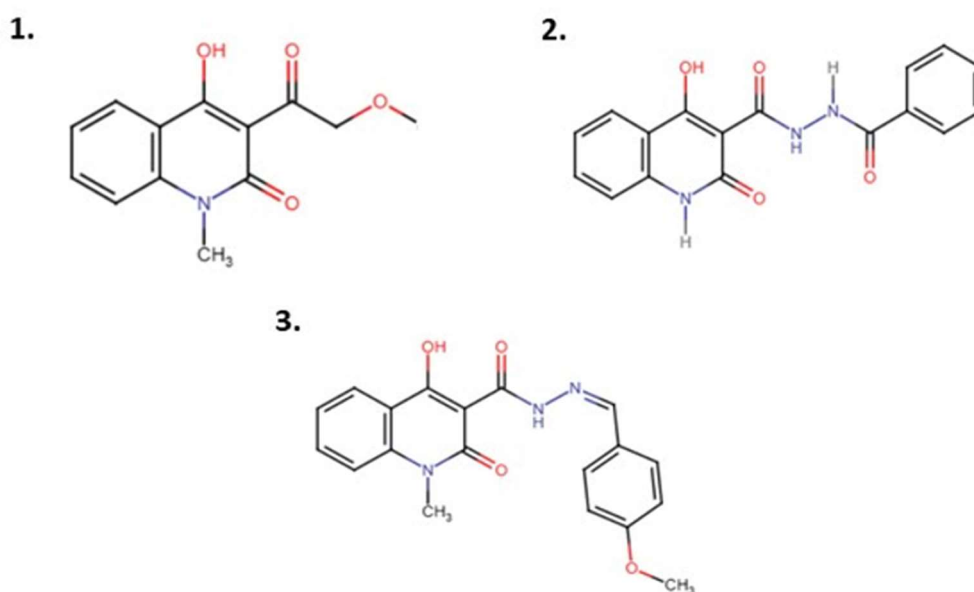
Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος, αποφασίσαμε να εξετάσουμε την επίδραση που θα έχουν στα κύτταρα διάφορες δόσεις του διαλύτη DMSO έτσι ώστε να προσδιορίσουμε την τελική συγκέντρωσή του που θα χρησιμοποιηθεί στα διαλύματα των αναστολέων. Οι αραιώσεις του DMSO έγιναν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας λίγο πριν χρησιμοποιηθούν, πάντα τα διαλύματα των αραιώσεων ήταν φρέσκα. Χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις κάθε συνθήκης (n=3) και υπολογίστηκε ο μέσος όρος, ενώ ως δείγματα-μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν πηγαδάκια με μη ενεργοποιημένα κύτταρα και πηγαδάκια μόνο με προσθήκη του παράγοντα TNF. Ως το μέγιστο 100% πήραμε την τιμή των ενεργοποιημένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη DMSO. Στο γράφημα της **Εικόνας 19** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος, όπου φαίνεται ότι απαιτείται αραιώση του DMSO τουλάχιστον 1:10000 (0.01% v/v), ώστε να μηδενιστεί η επίδραση του διαλύτη στην αντίδραση της λουσιφεράσης.



Εικόνα 19. Επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύτη DMSO (% v/v) στην παραγωγή χημειοφωταύγειας. Οι τιμές απεικονίζουν την επί τοις εκατό δράση λουσιφεράσης έχοντας ως μάρτυρα το δείγμα στο οποίο απουσιάζει το DMSO.

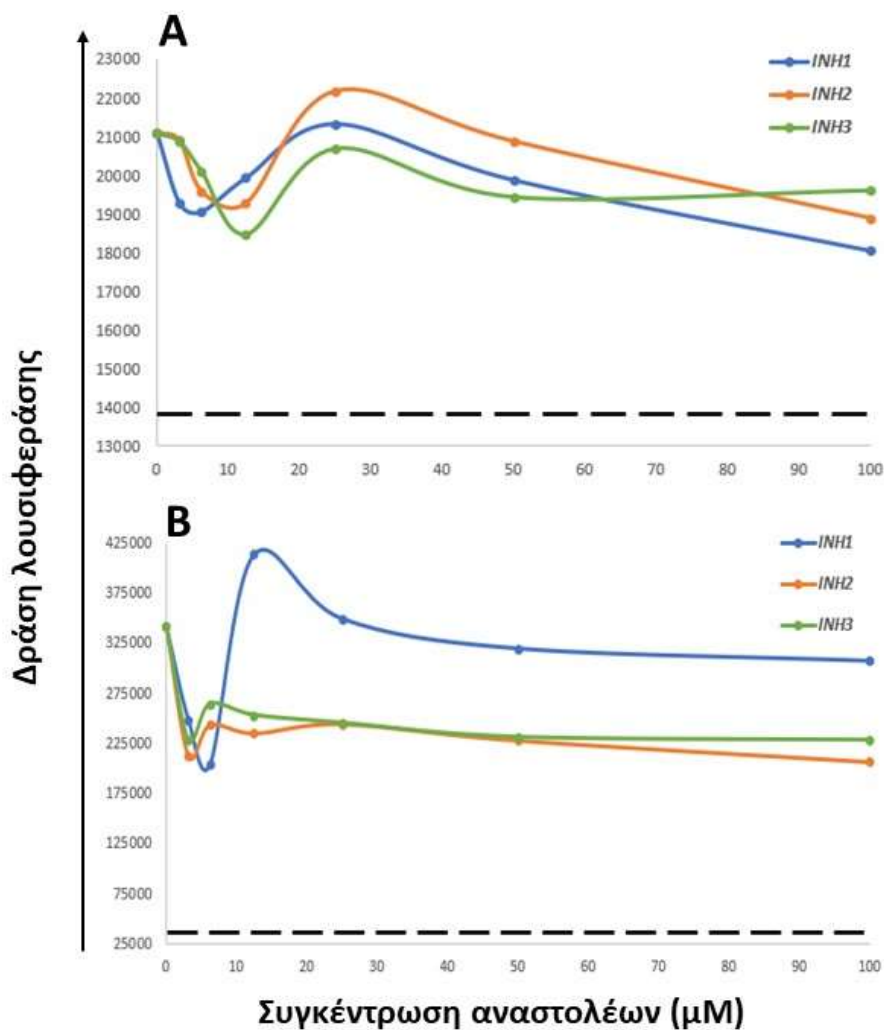
4.4 Μελέτη δράσης των κιναζολινονών

Λόγω της ανασταλτικής δράσης του DMSO τα αρχικά διαλύματα των αναστολέων έπρεπε να παρασκευαστούν σε μεγάλη συγκέντρωση (100mM). Δυστυχώς μόνο τρεις ενώσεις ήταν διαλυτές σε αυτήν τη συγκέντρωση και γι'αυτό το λόγο μπόρεσαν να μελετηθούν στην εργασία (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Οι τρεις ενώσεις κιναζολινονών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη. 1. (INH1), 2. (INH2) και 3.(INH3).

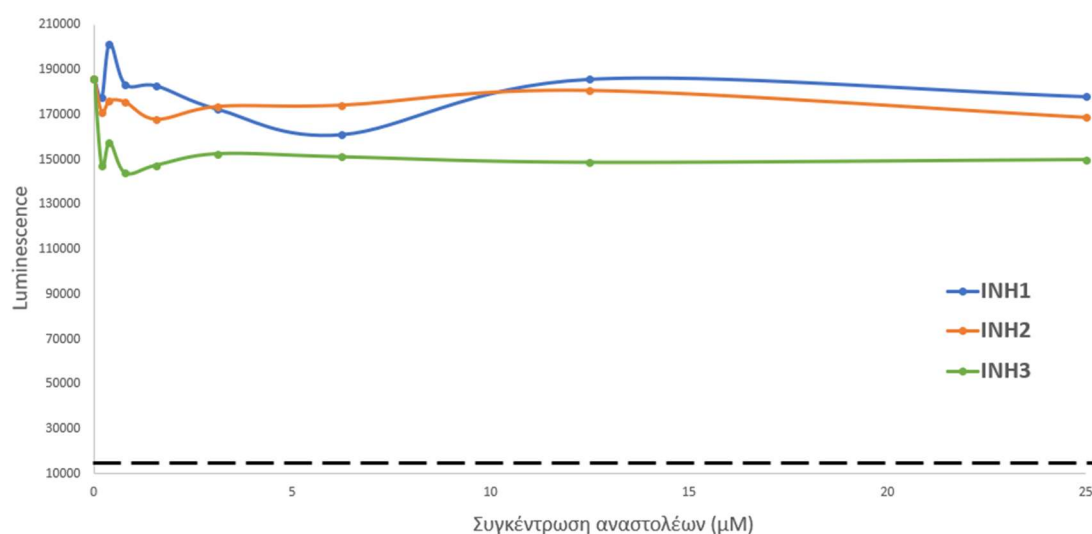
Για λόγους ευκολίας και κατανόησης, οι 3 αναστολείς αναφέρονται ως «Inhibitor 1», «Inhibitor 2», και «Inhibitor 3». Το επόμενο πείραμα αφορούσε τη μελέτη της ικανότητας των τριών μικρών οργανικών μορίων να αναστείλουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και συνεπώς την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 3.125 μM, 6.25 μM, 12.5 μM, 25μM, 50 μM, και 100 μM. Οι καλλιέργειες προεπώαστηκαν παρουσία αναστολέων για 30 λεπτά και μετά ακολούθησε προσθήκη TNF για 1 και για 3 ώρες (**Εικόνες 21A** και **21B**, αντίστοιχα).



Εικόνα 21. Επίδραση κινολονών στην αντίδραση χημειοφωταύγειας σε καλλιέργειες HeLa/NfκB-Luc κυττάρων μετά από ενεργοποίηση για 1 ώρα (A) και 3 ώρες (B). Με μαύρη διακεκομμένη γραμμή εμφανίζεται η τιμή των μη ενεργοποιημένων κυττάρων (1 ώρα=13910, 3 ώρες=26186,7), ενώ ως τιμή αναφοράς πήραμε την τιμή των κυττάρων χωρίς προσθήκη κάποιου αναστολέα (1 ώρα=21096, 3 ώρες=341960).

Βάσει των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι και οι τρεις ενώσεις έχουν ανασταλτική επίδραση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 12,5 μΜ) με τον Inhibitor 3 να παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα συνδυάζοντας τις πληροφορίες από τα δύο γραφήματα. Αντίθετα ο Inhibitor 1 φαίνεται να προκαλεί ενεργοποίηση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, ιδίως μετά από 3 ώρες ενεργοποίησης με TNF.

Ακολούθησε πείραμα, στο οποίο μελετήθηκαν τα ίδια μόρια-αναστολείς (Inhibitors 1,2,3) αλλά σε ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις: 0.19 μM , 0.39 μM , 0.78 μM , 1.56 μM , 3.125 μM , 6.25 μM , 12.5 μM και 25 μM . Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, έγινε προεπάση των κυττάρων παρουσία των αναστολέων για 30 λεπτά και ακολούθησε προσθήκη TNF για 3 ώρες. Ως δείγματα-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν μόνο ενεργοποιημένα κύτταρα απουσία αναστολέων (θετικός μάρτυρας) και κύτταρα εν ηρεμία (αρνητικός μάρτυρας). Στην **Εικόνα 22** απεικονίζεται το γράφημα με τα αποτελέσματα μετά τη μέτρηση σε λουμινόμετρο.



Εικόνα 22. Γράφημα φωταύγειας κυττάρων στο πείραμα επώασης για 3 ώρες με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων των 3 αναστολέων σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις αυτές. Με μαύρη διακεκομμένη γραμμή εμφανίζεται η τιμή των μη ενεργοποιημένων κυττάρων (11046), ενώ ως τιμή αναφοράς θεωρήθηκε η τιμή των ενεργοποιημένων κυττάρων χωρίς προσθήκη αναστολέα (186096).

Φαίνεται ότι σε συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα, η προσθήκη του Inhibitor 3 παρουσιάζει ανασταλτική επίδραση στη δράση της λουσιφεράσης, σε αντίθεση με τις άλλες δύο ενώσεις.

5. Συζήτηση

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) περιλαμβάνει τη νόσο του Crohn (CD) και την ελκώδη κολίτιδα (UC) και είναι μια χρόνια, πολυπαραγοντική πάθηση που περιλαμβάνει υποτροπιάζουσες φλεγμονές του εντέρου. Η νόσος εκδηλώνεται ως αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης στο μικροβίωμα του εντέρου του ξενιστή, το οποίο επηρεάζεται περαιτέρω από περιβαλλοντικούς παράγοντες και τη γενετική σύσταση του ατόμου. Επιδημιολογικά, τον τελευταίο καιρό παρατηρείται μια αξιοσημείωτη αύξηση της εμφάνισης φλεγμονωδών νόσων του εντέρου παγκοσμίως. Αυτό υποδηλώνει μια σημαντική σχέση μεταξύ της νόσου και περιβαλλοντικών παραγόντων (ιδίως της εκβιομηχάνισης), με τις ανεπτυγμένες χώρες της Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής να έχουν σημειώσει τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης της νόσου. Είναι ενδιαφέρον ότι η IBD ήταν ασυνήθιστη στις ανατολικές χώρες πριν από δύο δεκαετίες, ωστόσο πρόσφατες έρευνες δείχνουν μια απότομη αύξηση της συχνότητάς της [Guan Q, 2019], [Mak WY et al, 2019].

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, ιδιαίτερα της φλεγμονώδους απόκρισης, ελέγχοντας την έκφραση γονιδίων χημειοκινών και προφλεγμονωδών κυτοκινών με δύο διακριτές οδούς σηματοδότησης: την κανονική και την εναλλακτική. Το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κΒ είναι ένα εξαιρετικά ρυθμισμένο σύστημα. Ο κύριος ρυθμιστής του NF-κΒ είναι μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστή ως οικογένεια αναστολέων IκΒ, οι οποίες βρίσκονται συνήθως στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζουν τον NF-κΒ να εισέλθει στον πυρήνα, κάτι που συμβαίνει μόνο όταν αυτοί οι παράγοντες διασπαστούν από το πρωτεάσωμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκφραση αυτών των αναστολέων διεγείρεται από τον NF-κΒ, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης. Η απορρύθμιση αυτού του μονοπατιού μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες, καθώς αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την παθογένεση πλήθους χρόνιων ασθενειών, μεταξύ των οποίων και πολλά αυτοάνοσα νοσήματα [Zinatizadeh MR et al, 2020], [Carmody RJ et al, 2007], [Mitchell S et al, 2016].

Όλο και περισσότερες έρευνες τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας NF-κΒ ενεργοποιείται και σε ασθενείς που πάσχουν από IBD, οδηγώντας σε διατάραξη της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου και στην επακόλουθη εμφάνιση επίμονης εντερικής φλεγμονής [Atreya I et al, 2008]. Αυτά τα δεδομένα υπογραμμίζουν την άμεση ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών στρατηγικών για την αναστολή του NF-κΒ και των οδών ενεργοποίησής του. Στη διεθνή βιβλιογραφία, έχουν υπάρξει πολυάριθμες περιγραφές για την αξιοποίηση διαφόρων αναστολέων, οι οποίοι όμως αναστέλλουν μόνο εν μέρει τον NF-κΒ με έμμεσο τρόπο. Για να αντιμετωπίσουν αυτόν τον περιορισμό, οι ερευνητές έχουν αναλάβει διάφορες προσπάθειες για να δημιουργήσουν πιο στοχευμένους αναστολείς που στοχεύουν ειδικά τον NF-κΒ και το μονοπάτι σηματοδότησης του.

Σε αυτό το πλαίσιο, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν μικρομοριακά οργανικά μόρια ως πιθανοί αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ με την αξιοποίηση της δοκιμασίας λουσιφεράσης για τον έλεγχο της αναστολής της μεταγραφής. Οι οργανικοί αυτοί αναστολείς συντέθηκαν από το εργαστήριο βιοοργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και διαλύθηκαν σε διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου, που συνήθως αναφέρεται ως DMSO. Το DMSO, χρησιμοποιείται ευρέως στα ερευνητικά εργαστήρια και στις χημικές βιομηχανίες ως απρωτικός πολικός διαλύτης τόσο πολικών όσο και μη πολικών μορίων [Karim M. et al, 2023], [Li X. et al, 2022].

Για το λόγο αυτό, έπρεπε ως πρώτο βήμα να μελετήσουμε την πιθανότητα να έχει κάποια επίδραση στα κύτταρα ο διαλύτης DMSO και να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο να προκαλεί από μόνος του κάποια αναστολή της σηματοδότησης. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι παρατηρείται μειωμένη φωταύγεια παρουσία 20 μM DMSO και συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης τόσο μεγαλύτερη είναι η έκταση της αναστολής λόγω του DMSO. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα όπου δείχνουν επίδραση του DMSO στη μεταγραφή γονιδίων, καθώς και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, οι Moskot M. et al αναφέρουν ότι ο διαλύτης DMSO μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο σε συγκεντρώσεις που θεωρήθηκαν υψηλότερες (0,5-3% v/v), ενώ είχε επίδραση και στο μεταγράφομα, αυξορρυθμίζοντας ή μειορρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων [Moskot M. et al, 2019].

Κατ'επέκταση, το επόμενο βήμα ήταν να προσδιορίσουμε τη βέλτιστη συγκέντρωση του διαλύτη ώστε να αποφύγουμε τις ανασταλτικές επιδράσεις που παρουσίασε στο πρώτο πείραμα. Σταδιακές αραιώσεις του DMSO έδειξαν πολύ μεγάλη ανασταλτική δράση στις υψηλές συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτό της συγκέντρωσης 1% να φτάνει στο ποσοστό αναστολής 92% σε σύγκριση με τα κύτταρα control. Αντίθετα, δεν υπήρχε καμία ανασταλτική δράση σε αραιώσεις από 1:10.000 (0.01% v/v) και πάνω. Γι'αυτό και τα επόμενα πειράματα έγιναν σε μεγάλες αραιώσεις του οργανικού διαλύτη.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση των 3 αναστολέων σε κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν για 1 και 3 ώρες. Συγκρίνοντας τις δύο συνθήκες φαίνεται ότι με την πάροδο του χρόνου το σήμα του θετικού μάρτυρα (απουσία αναστολέα) χημειοφωταύγειας αυξάνεται δραματικά, όπως είναι αναμενόμενο (1ώρα= 21000 και 3 ώρες= 350.000). Κατ'επέκταση το γεγονός ότι στη συνθήκη επώασης 1 ώρας παρατηρούμε ότι και οι 3 αναστολείς εμφανίζουν παρόμοια καμπύλη στο γράφημα είναι αναμενόμενο, διότι είναι πολύ μικρή η ενεργοποίηση της λουσιφεράσης. Όσον αφορά το γράφημα επώασης 3 ωρών, οι διαφορές των καμπυλών μεταξύ των τριών αναστολέων είναι πιο εμφανείς. Τη σημαντικότερη διαφοροποίηση παρουσιάζει ο inhibitor 1, ο οποίος σημειώνει τη μικρότερη ικανότητα αναστολής του NF-κΒ, ενώ οι inhibitors 2 και 3 έχουν σχεδόν ίδια καμπύλη στο γράφημα. Η μειωμένη ανασταλτική ικανότητα του inhibitor 1 μπορεί να οφείλεται στη δομή του μορίου, που είναι πιθανότατα ευέλικτη. Στο τελευταίο μας πείραμα, μελετήθηκαν οι ίδιοι αναστολείς σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε συνθήκη stimulation 3 ωρών και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεγαλύτερη αναστολή του NF-κΒ σημείωσε με επαναληψιμότητα ο Inhibitor 3. Οι αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες των 10μM δεν μπορούν να εξηγηθούν, αλλά είναι πιθανό να οφείλονται και στην επίδραση του DMSO, εφόσον η συγκέντρωση του είναι υψηλότερη του 0.01% v/v. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο Inhibitor 3 σε συγκέντρωση 5μM προκαλεί τη μέγιστη αναστολή και αυτή θα χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω πειράματα σχετικά με τη δράση του. Στη διεθνή βιβλιογραφία, ερευνητές έχουν εξετάσει τη χρήση σεσκιτερπενικών λακτονών, οι οποίες φαίνεται πως αναστέλλουν πλήρως την πρόσδεση του NF-κΒ στο DNA σε συγκεντρώσεις έως 20 μM [A.J. Garcia-Pineros et al, 2001], [A.J. Garcia-Pineros et al, 2004]. Ακόμη, οι A.R. Khaled et al περιέγραψαν τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ως «δόλωμα» τα οποία περιέχουν ειδικά στοιχεία δέσμευσης για να ανταγωνιστούν την πρόσδεση του NF-

κΒ στο DNA. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι επιτεύχθηκε μείωση της δεσμευτικής δραστηριότητας του NF-κΒ μετά από επεξεργασία με ολιγονουκλεοτίδια σε συγκέντρωση 2 μΜ [A.R. Khaled et al, 1998].

Περαιτέρω μελέτες θα επικεντρωθούν στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ και στον έλεγχο της μεταγραφής, προκειμένου να εντοπιστεί το σημείο της ανασταλτικής δράσης. Επιπρόσθετα, θα γίνουν δοκιμασίες σε πρωτογενείς καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων ποντικού (3D-organoids), όντας πιο φυσιολογικό σύστημα μελέτης, καθώς και σχεδιασμός *in vivo* πειραμάτων. Ως απώτερος στόχος των ερευνητών παραμένει η ευρεία κατανόηση των παθοφυσιολογικών συστημάτων που καθορίζουν τη νόσο και σε συνδυασμό με τα ερευνητικά δεδομένα θα οδηγήσουν στο σωστό σχεδιασμό των κατάλληλων φαρμακευτικών σκευασμάτων για τη θεραπεία της νόσου.

6. Βιβλιογραφία

- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2009 Nov 19;361(21):2066-78
- A.J. Garcia-Pineros, V. Castro, G. Mora, T.J. Schmidt, E. Strunck, H.L. Pahl, I. Merfort, Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39713–39720
- A.J. Garcia-Pineros, M.T. Lindenmeyer, I. Merfort, Role of cysteine residues of p65/NF-kappaB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential, *Life Sci.* 75 (2004) 841–856.
- A.R. Khaled, E.J. Butfiloski, E.S. Sobel, J. Schiffenbauer, Use of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides to inhibit NF-kappaB expression and lymphocyte function, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86 (1998) 170–179
- Ariyaratnam J, Subramanian V. Association between thiopurine use and nonmelanoma skin cancers in patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 163-169
- Athanasellis, G., Gavrielatos, E., Igglessi-Markopoulou, O. and Markopoulos, J. (2003), Novel 'quinolone' metal complexes: Synthesis and spectroscopic studies of mg(II), zn(II) and ba(II) complexes with N-methyl (or NH)-3-acetyl-4-hydroxy quinolin-2-one ligands. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 40: 645-648
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med.* 2008 Jun;263(6):591-6
- Barreto E Barreto L, Rattes IC, da Costa AV, Gama P. Paneth cells and their multiple functions. *Cell Biol Int.* 2022 May;46(5):701-710
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet.* 2012 Nov 3;380(9853):1590-605. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9. Epub 2012 Aug 20. Erratum in: *Lancet.* 2013 Jan 19;381(9862):204.
- Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing* 35 (2019) 150927
- Carmody, R. J., & Chen, Y. H. (2007). Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol*, 4(1), 31-41

- Cohen LJ, Cho JH, Gevers D, Chu H. Genetic Factors and the Intestinal Microbiome Guide Development of Microbe-Based Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2019 Jun;156(8):2174-2189
- Dave M, Purohit T, Razonable R, Loftus EV. Opportunistic infections due to inflammatory bowel disease therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20: 196-212
- de Bruyn M, Vandooren J, Ugarte-Berzal E, Arijs I, Vermeire S, Opdenakker G. The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2016 Sep;51(5):295-358.
- Dejardin E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1161-79
- Derakhshani A, Javadrashid D, Hemmat N, Dufour A, Solimando AG, Abdoli Shadbad M, Duijf PHG, Brunetti O, Silvestris N, Baradaran B. Identification of Common and Distinct Pathways in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: A Hypothesis Based on Weighted Gene Co-Expression Network Analysis. *Front Genet*. 2022 Mar 31;13:848646
- Gelbmann CM, Leeb SN, Vogl D, Maendel M, Herfarth H, Schölmerich J, Falk W, Rogler G. Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts. *Gut*. 2003 Oct;52(10):1448-56
- Goodhand JR, Greig FI, Koodun Y, McDermott A, Wahed M, Langmead L, Rampton DS. Do antidepressants influence the disease course in inflammatory bowel disease? A retrospective case-matched observational study. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 1232-1239
- Greuter T, Manser C, Pittet V, Vavricka SR, Biedermann L; on behalf of Swiss IBDnet, an official working group of the Swiss Society of Gastroenterology. Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease. *Digestion*. 2020;101 Suppl 1:98-104.
- Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res*. 2019 Dec 1;2019:7247238.
- Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-kB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Oct-Dec;1799(10-12):775-87
- Gupta SC, Kunnumakkara AB, Aggarwal S, Aggarwal BB. Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Front Immunol*. 2018 Sep 27;9:2160

- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jan;12 Suppl 1:S3-9.
- Johnson GJ, Cosnes J, Mansfield JC. Review article: smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005 Apr 15;21(8):921-31
- Kaplan GG, Hubbard J, Korzenik J, Sands BE, Panaccione R, Ghosh S, Wheeler AJ, Villeneuve PJ. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol*. 2010 Nov;105(11):2412-9
- Karim M, Boikess RS, Schwartz RA, Cohen PJ. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Arch Dermatol Res*. 2023 Aug;315(6):1465-1472
- Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):307-17
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A.M. et al. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 82, 434–448 (2004)
- Li X, Wang X, Li Y, Xiao J, Du Y. Application of DMSO as a methylthiolating reagent in organic synthesis. *Org Biomol Chem*. 2022 Jun 8;20(22):4471-4495
- Mak WY, Zhao M, Ng SC, Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Mar;35(3):380-389.
- Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 May;8(3):227-41
- Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Kloska A, Piotrowska E, Narajczyk M, Gabig-Cimińska M. The Role of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Gene Expression Modulation and Glycosaminoglycan Metabolism in Lysosomal Storage Disorders on an Example of Mucopolysaccharidosis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 14;20(2):304.
- Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF, Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007 Mar 29;446(7135):557-61
- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2012 Nov 3;380(9853):1606-19. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0. Epub 2012 Aug 20.
- Pallone F, Monteleone G. Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2001 Jul;17(4):307-12

- Papoutsopoulou S, Satsangi J, Campbell BJ, and Probert CS. Review article: impact of cigarette smoking on intestinal inflammation-direct and indirect mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther* 2020
- Papoutsopoulou S, Campbell BJ. Epigenetic Modifications of the Nuclear Factor Kappa B Signalling Pathway and its Impact on Inflammatory Bowel Disease. *Curr Pharm Des.* 2021;27(35):3702-3713
- Plantinga TS, Joosten LA, Netea MG. ATG16L1 polymorphisms are associated with NOD2-induced hyperinflammation. *Autophagy.* 2011 Sep;7(9):1074-5.
- Raaschou P, Simard JF, Holmqvist M, Askling J; ARTIS Study Group. Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. *BMJ* 2013; 346: f1939
- Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1332-1339
- Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006 Jun;55(6):749-53.
- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998 Apr;42(4):477-84
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), 921-928
- Serafin, A., Stańczak, A. The complexes of metal ions with fluoroquinolones. *Russ J Coord Chem* 35, 81–95 (2009)
- Sidletskaya K, Vitkina T, Denisenko Y. The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2020 Jun 23;15:1481-1493
- Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2010; 160: 386-393
- Torgerson TR, Colosia AD, Donahue JP, Lin YZ, Hawiger J. Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6084-92

- Wright EK, Ding NS, Niewiadomski O. Management of inflammatory bowel disease. *Med J Aust.* 2018 Sep 1;209(7):318-323.
- Yaron A, Gonen H, Alkalay I, Hatzubai A, Jung S, Beyth S, Mercurio F, Manning AM, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *EMBO J.* 1997 Nov 3;16(21):6486-94
- Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 7;20(1):91-9.
- Zhou N, Chen WX, Chen SH, Xu CF, Li YM. Inflammatory bowel disease unclassified. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2011 Apr;12(4):280-6.
- Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF-kB) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.* 2020 Jul 18;8(3):287-297