

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ  
ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CRH ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ TLR-4**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΕΠΕΑΕΚ:  
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ**

**Πραγματοποιήθηκε στο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΑΛΙΣΣΑΦΗ ΘΕΜΙΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004**

**Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια κλινικής Χημείας, τομέας εργαστηριακής Ιατρικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.**

**Υπό την επίβλεψη των:**

**Καθηγητή κλινικής Χημείας, κων Ανδρέα Μαργιωρή,**

**Λέκτορα Κλινικής Χημείας, κων Χρήστο Τσατσάνη**

**Τριμελής Επιτροπή:**

**Γανωτάκης Δ., Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας**

**Μαργιωρός Α., Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής**

**Θερμού Α., Αναπληρώτρια καθηγήτρια φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής**

*Στους παππούδες και γιαγιάδες μου,*

*Στον αδερφό μου Νικήτα,*

*Στους γονείς μου.*

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω, τον κ. Χρήστο Τσατσάνη, Λέκτορα Κλινικής Χημείας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν δέχτηκε να συνεργαστώ μαζί του, για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή . Χωρίς την βοήθεια αυτή δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, τον κ. Ανδρέα Μαργιωρή, Καθηγητή Κλινικής Χημείας και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Ρένα Δερμιτζάκη και την Αριάδνη Ανδρουλιδάκη, που ήταν πάντα στο πλευρό μου έτοιμες να με βοηθήσουν σε κάθε δυσκολία που προέκυπτε.

Ευχαριστώ τους συνεργάτες μου Μιχάλη, Άντα και Γεδεών (πολύτιμη η συμβολή και η υπομονή τους), τους φίλους μου Ιφιγένεια, Νικιάνα, Ελένα, Χάρη, Βασίλη και Δημήτρη για τις υπέροχες στιγμές, τα όνειρα και τις αγωνίες που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια.....

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς και τον αδερφό μου για την αγάπη και την στήριξη που μου έδωσαν στις δύσκολες στιγμές.....

## ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΑΛΙΣΣΑΦΗ ΘΕΜΙΣ

### Κατοικία

Τσουδερών 11  
Ηράκλειο - Κρήτης  
Τ.Κ. 71201  
Τηλ. 281-0242645

### Μόνιμη Κατοικία

Γ. Σουρή 30  
Γαλάτσι, Αθήνα  
Τ.Κ. 11147  
Τηλ. 210-2924987  
**E-mail:** [themisstop@hotmail.com](mailto:themisstop@hotmail.com)  
[themis@chemistry.uoc.gr](mailto:themis@chemistry.uoc.gr)

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Πτυχιούχος Χημείας, B.Sc  
Τμήμα Χημείας,  
Σχολή Θετικών και  
Τεχνολογικών Επιστημών  
Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
Ηράκλειο 71409  
Βαθμός πτυχίου 7,89

ΙΟΥΝΙΟΣ 2002

Π.Μ.Σ. : Παρακολούθηση Μεταπτυχιακού  
Προγράμματος  
«Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών  
Προϊόντων με βιολογική δραστηριότητα.»  
Τμήμα Χημείας,  
Σχολή Θετικών και  
Τεχνολογικών Επιστημών  
Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
Ηράκλειο 71409

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ  
ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Διπλωματική εργασία  
Με τίτλο : “*Επίδραση βαρέων μετάλλων στα  
ογκογονίδια της οικογένειας Ras.*” 2000-2002

Τμήμα Χημείας  
Τομέας Βιοανόργανης Χημείας  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διπλωματική εργασία  
στα πλαίσια του Μ.Δ.Ε. 2003  
Με τίτλο : “*Μελέτη της επίδρασης των  
νευροπεπτιδίων της οικογένειας  
CRH στην έκφραση του  
υποδοχέα TLR-4*”

Τμήμα Ιατρικής  
Τομέας Εργαστηριακής Ιατρικής  
Εργαστήριο Κλινικής Χημείας  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

**ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-  
ΒΡΑΒΕΙΑ**

**Τετράμηνη Υποτροφία ΕΠΕΑΕΚ :** 2003  
«Απομόνωση και Σύνθεση Φυσικών  
Προϊόντων με βιολογική δραστηριότητα.»  
Λόγω επιδόσεων στα μαθήματα.

**ΓΛΩΣΣΕΣ**

Επάρκεια στα Αγγλικά  
Κάτοχος Proficiency Cambridge 2000

**ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ  
ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Βοηθός στην Ανόργανη Χημεία στο 2002-2003  
3<sup>ο</sup> έτος Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βοηθός στα εργαστήρια Γενικής Χημείας 2003  
Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

## **ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ**

Εργαστηριακός Βοηθός (παρασκευάστρια) 2000  
στα Εργαστήρια Οργανικής ΙΙ  
Τμήμα Χημείας,  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΓΡΑΠΤΩΝ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ (POSTER)**

### **1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΩΝ H-ras.**

Θ. Αλυσάφη, Κ. Καβρουλάκη, Δ. Καρδάσης, Α. Σαλίφογλου  
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

19<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας

«Η ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»

Ηράκλειο, 6-10 Νοεμβρίου 2002

Πρακτικά Συνεδρίου Σελ. 192-194

### **2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

Θ. Αλυσάφη<sup>α</sup>, Α. Ανδρουλιδάκη<sup>β</sup>, Χ. Τσατσάνης<sup>β</sup>, Α. Μαργιωρής<sup>β</sup>

<sup>α</sup>Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

<sup>β</sup>Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο

9<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ανώγεια, Ρεθύμνου Κρήτης, 27-29 Ιουνίου 2003

Πρακτικά Συνεδρίου Σελ. 82

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1 ΦΛΕΓΜΟΝΗ.....	12
1.1.1 Ορισμός και μεσολαβητές.....	12
1.1.2 Κύτταρα που ενέχονται στην φλεγμονή.....	15
1.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΥΡΟΕΝΔΡΟΚΡΙΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	22
1.3 ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	27
1.3.1 Γενικά για την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH).....	27
1.3.2 Πεπτίδια συγγενή με το CRH.....	29
1.3.3 UCN.....	30
1.3.4 Ανίχνευση CRH, UCN στο ανοσολογικό σύστημα.....	31
1.3.5 Υποδοχείς του CRH στο ανοσοποιητικό.....	32
1.3.6 Υποδοχέας τύπου I του CRH (CRHR1).....	33
1.3.7 Υποδοχέας τύπου II του CRH (CRHR2).....	34
1.3.8 Ο ρόλος των CRH, UCN στη φλεγμονή.....	35
1.4 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR.....	38
1.4.1 Προσδέτες των υποδοχέων TLR.....	40
1.4.2 Ενδοτοξίνη ή LPS.....	41
1.4.3 Διαβίβαση σήματος – Έκφραση TLR4.....	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1 Βιολογικά Υλικά.....	48
2.1.1 Λιποπολυσακχαρίδη.....	48
2.1.2 Κυτταρική σειρά μονόκυττάρων/μακροφάγων ποντικού (Raw 264.7).....	48
2.1.3 Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονόκυττάρων THP-1.....	48
2.2 Μέθοδοι.....	49
2.2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	49
2.2.2 Κυτταρική σειρά μωλώματος ποντικού RAW 264.7.....	49
2.2.3 Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονόκυττάρων THP-1.....	49
2.3 Απομόνωση mRNA.....	50
2.3.1 Μέθοδος εκλεκτικής επέκτασης του DNA με ανάστροφο γονιδιακό ανασυνδυασμό (RT-PCR).....	51
2.3.2 Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	52
2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	53
2.3.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης.....	56
2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) ..	57
2.5 Μελέτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA).....	59
2.5.1 Απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων.....	60
2.5.2 Μελέτες σύνδεσης νουκλεοπρωτεϊνών (DNA-Protein Binding Studies)....	60
2.6 Μέθοδος μέτρησης ολικών πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα (Bradford)	



2.7	Συλλογή δείγματος και Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος για μέτρηση πρωτεϊνών με ανοσολογικό προσδιορισμό .....	62
2.8	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε συνθήκες αποδιάταξης .....	63
2.8.1	Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδιου 30% .....	64
2.8.2	Προετοιμασία δειγμάτων .....	64
2.8.3	Ανοσοαποτύπωση ( <i>Western Blotting</i> ) .....	64
2.8.4	Ανοσοαποτύπωση .....	65
2.9	Προετοιμασία πλασμιδίου .....	66
2.9.1	Μετασχηματισμός βακτηρίων ( <i>Transformation</i> )- Καλλιέργεια βακτηρίων .....	66
2.9.2	Πέψη πλασμιδίου .....	68
2.9.3	<i>Midi Prep</i> .....	69
2.10	Διαμόλυνση κυττάρων ( <i>Transfections</i> ) .....	71
2.11	Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης .....	71
2.12	Κυτταρομετρία ροής ( <i>FACS</i> ) .....	73
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	74
3.1	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CRH ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TLR4 .....	75
3.1.1	Η CRH και τα συγγενή με αυτήν πεπτίδια UCN1 και UCN2, επάγουν την έκφραση του mRNA του υποδοχέα TLR4, στην κυτταρική σειρά RAW264.7 .....	75
3.1.2	Η Επαγωγή της έκφρασης του TLR4 από τα νευροπεπίδια CRH, UCN και UCNII γίνεται στο επίπεδο του προαγωγέα. ....	81
3.1.3	Η LPS-επαγόμενη μείωση της έκφρασης του TLR4 αναστέλλεται από την παρουσία CRH ή UCN ή UCN2 .....	84
3.1.4	Τα νευροπεπίδια CRH, UCN και UCN2, επάγουν την έκφραση του υποδοχέα TLR4 μέσω του υποδοχέα CRHR2. ....	89
3.2	ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CRH ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ PU.1 .....	91
3.2.1	Τα νευροπεπίδια προκαλούν την μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 στον πυρήνα. ....	92
3.2.2	Τα νευροπεπίδια UCN, UCN2, CRH ενεργοποιούν την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 στο DNA, σε κύτταρα RAW264.7 .....	94
3.2.3	Η ενεργοποίηση του PU.1 από τα νευροπεπίδια μεσολαβείται από τον υποδοχέα CRHR2. ....	95
3.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ UCN, UCNII ΚΑΙ CRH ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ .....	97
3.3.1	Μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην ενεργοποίηση της PKC. ....	98
3.3.2	Μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB. ....	100
3.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ TLR4 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ THP-1. ....	102
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	105
5.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	112
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	115

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όταν η corticotropin releasing hormone (CRH) εκφράζεται σε περιφερικούς ιστούς, έχει προ-φλεγμονώδη δράση. Στο παρελθόν έχουμε δείξει ότι η CRH αυξάνει την επαγόμενη από το LPS έκκριση προφλεγμονώδων κυτοκινών. Ως γνωστόν το LPS σηματοδοτεί μέσω του υποδοχέα TLR-4 για να προκαλέσει τις προφλεγμονώδεις δράσεις του και έχει επίσης διαπιστωθεί, ότι η έκφραση του υποδοχέα TLR-4, είναι αυξημένη κατά την διάρκεια της φλεγμονής. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα ο σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH, στην έκφραση του υποδοχέα TLR-4 στα μακροφάγα κύτταρα. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού σαν μοντέλα μακροφάγων επιλέξαμε την κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού Raw264.7 και την κυτταρική σειρά μονοκυττάρων ανθρώπου THP-1. Παρατηρήσαμε ότι με επίδραση των κυττάρων Raw264.7 με τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2, προκλήθηκε αύξηση των επιπέδων του mRNA του TLR-4. Το αποτέλεσμα της επίδρασης των νευροπεπτιδίων πραγματοποιείται στο μεταγραφικό επίπεδο μέσω της ενεργοποίησης του ελάχιστου υποκινητή. Ο υποκινητής του υποδοχέα TLR-4 περιέχει αρκετά σημεία πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα PU.1, ο οποίος καθοδηγεί την έκφρασή του. Επίδραση των κυττάρων Raw264.7 με οποιοδήποτε από τα τρία νευροπεπτίδια, είχε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη πρόσδεση του PU.1. Η επαγωγή της πρόσδεσης του PU.1 γίνεται μέσω του υποδοχέα CRHR2, αφού η δράση αυτή αναστέλλεται από την anti-sauvagine30. Επίδραση των κυττάρων με τα νευροπεπτίδια παρουσία LPS μειώνει την ανασταλτική επίδραση του LPS στην έκφραση του υποδοχέα TLR-4, γεγονός που υποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου η CRH αυξάνει την LPS-επαγόμενη έκκριση προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Τα δεδομένα μας προτείνουν ότι το σήμα του CRHR2 επιδρά στην ενεργοποίηση των μακροφάγων από το LPS αυξάνοντας την έκφραση του υποδοχέα TLR-4 μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα PU.1

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 ΦΛΕΓΜΟΝΗ

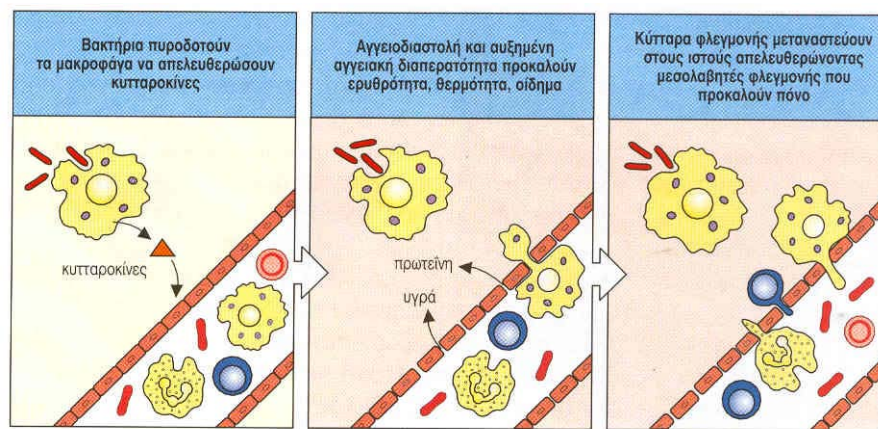
### 1.1.1 Ορισμός και μεσολαβητές

Με την είσοδο κάποιου μολυσματικού παράγοντα στον οργανισμό, αρχίζει η φλεγμονώδης αντίδραση, που αποτελεί μέρος της μη ειδικής ανοσοαπάντησης και προηγείται των ειδικών αποκρίσεων. Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα έχουν υποδοχείς επιφάνειας εξελιγμένους, ώστε να αναγνωρίζουν και να συνδέουν κοινά συστατικά πολλών βακτηριακών επιφανειών. Η προσκόλληση βακτηριακών μορίων σε αυτούς τους υποδοχείς πυροδοτεί τα κύτταρα να εγκυστώνουν το βακτήριο και επίσης επάγει την έκκριση κυτταροκινών και άλλων χημικών μεταβιβαστών από τα μακροφάγα. Οι κυτταροκίνες είναι χυμικοί μεταβιβαστές που απελευθερώνονται από τα κύτταρα και επηρεάζουν τη συμπεριφορά άλλων κυττάρων. Οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα, σαν απόκριση σε βακτηριακά συστατικά, έχουν μια ποικιλία δράσεων που συνοπτικά είναι γνωστές ως **φλεγμονή**. Η φλεγμονή ορίζεται παραδοσιακά από τέσσερις λατινικές λέξεις *dolor*, *rubor*, *calor* και *tumor*, που σημαίνουν: πόνος, ερυθρότητα, θερμότητα και οίδημα και όλες αντανακλούν τις επιπτώσεις στα τοπικά αιμοφόρα αγγεία που είναι δύο κυρίως (Εικόνα 1.1).

Η πρώτη συνίσταται σε αύξηση της διαμέτρου των αγγείων, έχοντας σαν αποτέλεσμα την αύξηση του όγκου αίματος τοπικά – εξ αυτού η θερμότητα και η ερυθρότητα – και η μείωση της ταχύτητας ροής του αίματος.

Σε φυσιολογικές όμως συνθήκες, τα λευκοκύτταρα περιορίζονται, στο κέντρο του αυλού των αιμοφόρων αγγείων, όπου η ροή είναι γρηγορότερη. Στις φλεγμονώδεις περιοχές όπου τα αγγεία είναι διατεταγμένα, η πιο αργή ροή του αίματος επιτρέπει στα λευκοκύτταρα να μετακινηθούν από το κέντρο των αιμοφόρων αγγείων και να αλληλεπιδράσουν με το αγγειακό ενδοθήλιο. Επιπρόσθετα, σε αυτές τις αλλαγές, υπάρχει μία αύξηση στην αγγειακή διαπερατότητα, έχοντας σαν αποτέλεσμα την τοπική συσσώρευση υγρού – εξ αυτού και το οίδημα και ο πόνος – καθώς επίσης την συσσώρευση ανοσοσφαιρινών, συμπληρώματος και άλλων πρωτεϊνών του αίματος στους ιστούς.

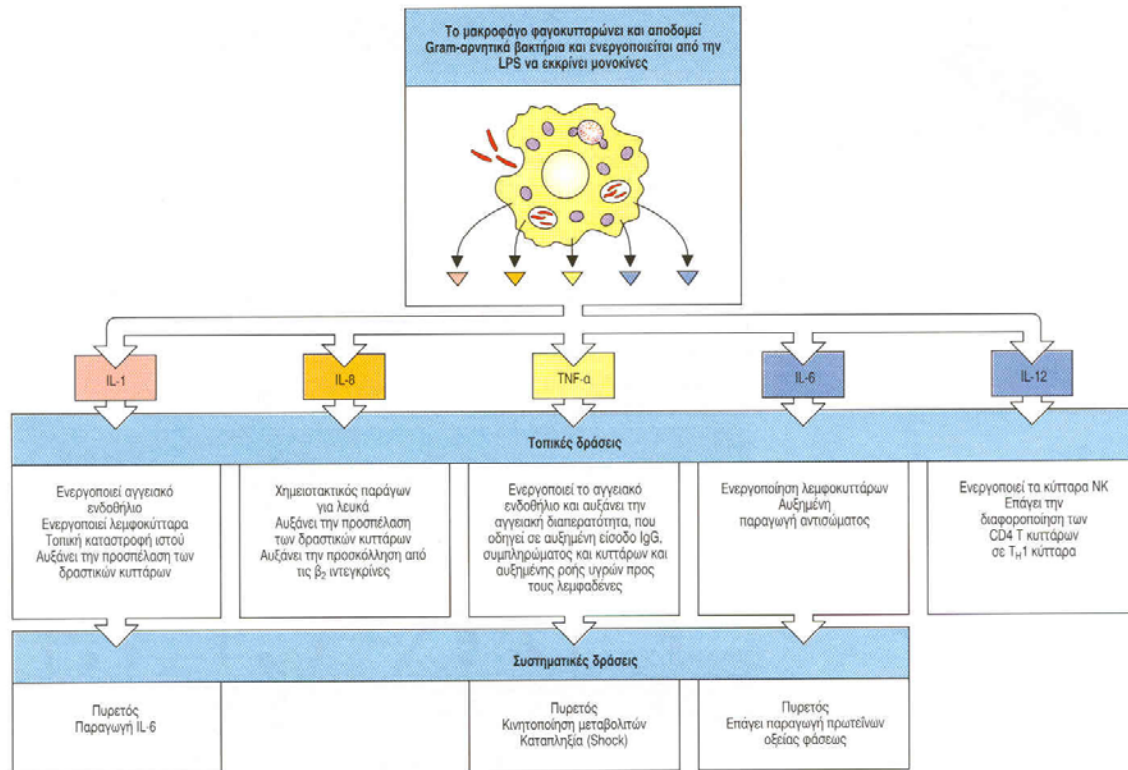
Η δεύτερη δράση αυτών των μεσολαβητών στο ενδοθήλιο είναι η επαγωγή της εκφράσεως των μορίων προσκολλήσεως τα οποία συνδέονται στην επιφάνεια των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και επαυξάνουν αρκετά τον ρυθμό με τον οποίο αυτά τα φαγοκύτταρα μεταναστεύουν μέσω των τοπικών αιμοφόρων τριχοειδών στους ιστούς, στις θέσεις των λοιμώξεων όπου έλκονται από άλλες κυτταροκίνες. Η μετανάστευση των κυττάρων στον ιστό είναι υπεύθυνη για τον πόνο.



**Εικόνα 1.1. Η βακτηριακή λοίμωξη πυροδοτεί μια φλεγμονώδη απόκριση.** Τα μακροφάγα που προσλαμβάνουν βακτήρια στους ιστούς αυξάνουν τη διαπερατότητα των αγγείων και επιτρέπουν σε υγρά και πρωτεΐνες να περάσουν στους ιστούς. Η προσκολλητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων τροποποιείται επίσης, ώστε τα κύτταρα που προσκολλώνται στο τοίχωμα του αγγείου, να εισέρχονται μέσω αυτού στους ιστούς: τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα δείχνονται εδώ να εισέρχονται στο μολυσμένο ιστό από ένα αιμοφόρο αγγείο. Η συσσώρευση παράγει οίδημα, θερμότητα και πόνο, που συλλογικά, είναι γνωστά ως φλεγμονή. Τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα είναι τα κύρια κύτταρα της φλεγμονής. Αργότερα, τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να συνεισφέρουν στη φλεγμονή.

Μια σπουδαία λειτουργία της φυσικής ανοσολογικής απάντησης είναι η στρατολόγηση περισσότερων φαγοκυττάρων και δραστικών μορίων στην περιοχή της λοίμωξεως μέσω απελευθέρωσης κυτταροκινών και άλλων μεσολαβητών της φλεγμονής. Οι κυτταροκίνες των οποίων η σύνθεση κινητοποιείται όταν μακροφάγα αναγνωρίζουν μικροβιακά συστατικά συχνά καλούνται μονοκίνες, γιατί παράγονται κυρίως από κύτταρα της μονοκυτταρικής –μακροφαγικής σειράς αυτές αποτελούν μία ομάδα δομικά διαφορετικών μορίων και περιλαμβάνει την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), την ιντερλευκίνη-6

(IL-6), την ιντερλευκίνη-8 (IL-8), την ιντερλευκίνη-12 (IL-12) και τον παράγοντα νεκρώσεως των όγκων (TNF- $\alpha$ ). Όλες έχουν σπουδαίες τοπικές και συστηματικές δράσεις που συνοψίζονται την Εικ.1.2.



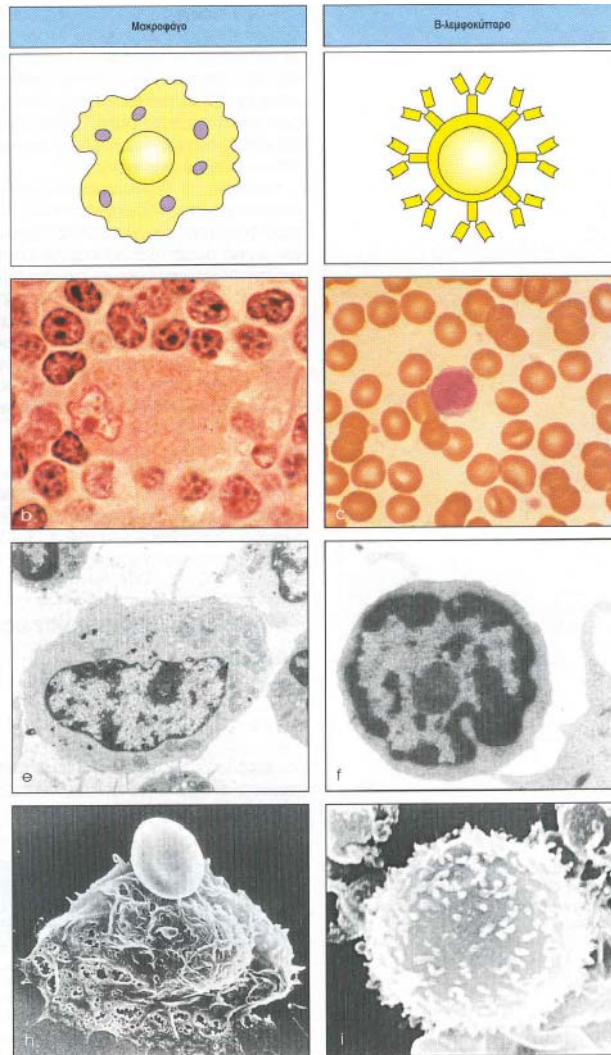
**Εικ. 1.2.** Σημαντικές μονοκίνες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα σε απάντηση στα προϊόντα των βακτηρίων, περιλαμβάνουν την IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 και TNF- $\alpha$

Οι άλλοι μεσολαβητές που απελευθερώνονται από τα μακροφάγα σε απάντηση στους λοιμογόνους παράγοντες αποτελούν μία μικτή ομάδα μορίων που περιλαμβάνει προσταγλαδίνες, νιτρικό οξύ, λευκοτριένες, ιδιαίτερα λευκοτριένη B4 (LBT4), τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF). Μαζί με αυτά τα προϊόντα των μακροφάγων η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τους λοιμογόνους παράγοντες συνεισφέρει τους μεσολαβητές της φλεγμονής C5a (το πιο δυναμικό) τον C3a, και σε λιγότερη έκταση τον C4a. Όσο είναι δυνατό για ένα μεσολαβητή της φλεγμονής ο C5a είναι επίσης ικανός να ενεργοποιήσει τα σιτευτικά κύτταρα, προκαλώντας τα να

απελευθερώσουν τα κοκκία που περιέχουν τα οποία περιλαμβάνουν ισταμίνη, σεροτονίνη (στα ποντίκια) και LBT4. Αυτές οι ουσίες συμβάλλουν στις αλλαγές που συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα στον τόπο της λοιμώξεως. Η συνδυασμένη τοπική δράση αυτών των μεσολαβητών συντελεί, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στις τοπικές δράσεις ενάντια στην μόλυνση διαμορφώνοντας την **φλεγμονώδη απόκριση**. Οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις αργότερα σε μία λοίμωξη συμπεριλαμβάνουν και τα λεμφοκύτταρα, δημιουργώντας μια ειδική, (επίκτητη) ανοσολογική απόκριση, που έχει ενεργοποιηθεί από αντιγόνο που προέρχεται από την περιοχή της λοιμώξεως και οδεύει μέσω των λεμφαγγείων σε έναν επιχώριο λεμφαδένα.(1)

### ***1.1.2 Κύτταρα που ενέχονται στην φλεγμονή***

Οι κύριοι κυτταρικοί τύποι που παρατηρούνται σε μια φλεγμονώδη απόκριση στις αρχικές φάσεις της είναι τα ουδετερόφιλα, ακολουθούμενα από τα μακροφάγα που ωριμάζουν σαν συνέχεια των προγόνων τους, των μονοκυττάρων, αυτά και άλλα κύτταρα που παρουσιάζονται παρακάτω είναι γνωστά ως **κύτταρα φλεγμονής** (Εικ. 1.3).



**Εικ. 1.3.** Κύτταρα φλεγμονής. Εδώ παρουσιάζονται δύο εκπρόσωποι τους: τα μακροφάγα και τα Β-λεμφοκύτταρα. Στην πάνω σειρά δείχνονται με τη μορφή που συνήθως αναπαρίστανται στα βιβλία, στη δεύτερη σειρά, όπως εμφανίζονται στο οπτικό μικροσκόπιο, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διελεύσεως (3<sup>η</sup> σειρά) και σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως (4<sup>η</sup> σειρά).

### 1. Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα

Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που φτάνουν στην θέση της φλεγμονής. Ανήκουν στη μυελοειδή κυτταρική σειρά και αποτελούν το 90% των πολυμορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων που βρίσκονται σε κυκλοφορία. Ο βασικός τους ρόλος στη φλεγμονή είναι η φαγοκυττάρωση. Ωστόσο, εάν ενεργοποιηθούν μέσω των Fcγ υποδοχέων τους, απελευθερώνουν κυτταροτοξικές ουσίες και τα συστατικά των



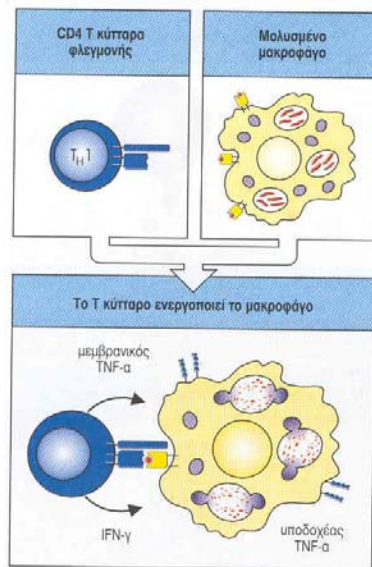
εκκριτικών τους κοκκίων στον εξωκυτταρικό χώρο (ένας πιθανά παθογενής μηχανισμός). Οι μικροοργανισμοί που έχουν φαγοκυτταρωθεί σχηματίζουν φαγοςώματα, τα οποία συντήκονται με τα λυσοσώματα των κυττάρων (περιέχουν οξικές υδρολάσες, μυελοπεροξιδάση, λυσοζύμη και λακτοφερίνη) και σχηματίζουν φαγολυσοσώματα. Τα ουδετερόφιλα ανταποκρίνονται ταχέως σε χημειοτακτικά ερεθίσματα και ενεργοποιούνται από τις κυτταροκίνες που παράγονται από τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και τα T-λεμφοκύτταρα. Φέρουν υποδοχείς για την ανοσοσφαιρίνη IgG και για τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος (2).

## 2. Μακροφάγα

Τα μονοκύτταρα του αίματος, εγκαταλείποντας την κυκλοφορία και μεταναστεύοντας στη θέση της φλεγμονής, ωριμάζουν σε μακροφάγα. Αποτελούν μαζί με τα ουδετερόφιλα τα κύρια φαγοκύτταρα του οργανισμού. Μέσω των υποδοχέων τους δεσμεύουν μικροοργανισμούς και ξένα σωματίδια και τα πέπτουν με κυτταροφαγία. Οι MFR (mannosyl- fucosyl receptor) υποδοχείς τους προσδέονται σε σάκχαρα της κυτταρικής επιφάνειας των μικροοργανισμών, ενώ ο CD14 υποδοχέας δεσμεύει την LBP πρωτεΐνη που επικαλύπτει τα gram-αρνητικά βακτήρια. Ο λιποπολυσακχαρίτης LPS των gram(-) βακτηρίων προσδέεται στον υποδοχέα TLR4, που εκφράζεται στα μακροφάγα και μεταδίδει το σήμα για την ενεργοποίηση του κυττάρου. Επίσης διαθέτουν 3 ξεχωριστούς υποδοχείς με διαφορετικές λειτουργίες για το θραύσμα Fc της ανοσοσφαιρίνης Γ. Άλλοι, όπως ο CR1, είναι υπεύθυνοι για την ενδοκυττάρωση μικροοργανισμών. Κομμάτια του αντιγόνου επιστρέφουν στην κυτταρική επιφάνεια συνδεδεμένα με μόρια της τάξης II του ΜΣΙ και παρουσιάζονται στα λεμφοκύτταρα. Λίγα είναι γνωστά για τους περισσότερους υποδοχείς που επιτρέπουν στα μακροφάγα να αναγνωρίζουν μικροβιακά συστατικά (10).

Τα μακροφάγα απαιτούν δύο σήματα για την ενεργοποίησή τους, εκ των οποίων μόνο ένα χρειάζεται να προέρχεται από ένα άμεσα δραστικό φλεγμονώδες T κύτταρο.

Το πρώτο σήμα, το οποίο ευαισθητοποιεί το μακροφάγο να αντιδράσει στο δεύτερο σήμα, εκπέμπεται από την κυτταροκίνη IFN- $\gamma$  που ενεργοποιεί τα μακροφάγα (Εικ. 1.4). Η IFN- $\gamma$  είναι η πιο χαρακτηριστική κυτταροκίνη που παράγεται από τα δραστικά T κύτταρα. Το δεύτερο σήμα μπορεί να προέρχεται από τα διαμεμβρανικά μόρια τα οποία εκφράζονται στα T κύτταρα που συναντούν το αντιγόνο στην επιφάνεια των μακροφάγων, είτε από μικρά ποσά βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών.



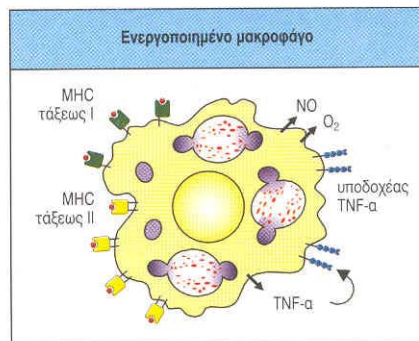
**Εικ. 1.4.** Τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα φλεγμονής ενεργοποιούν τα μακροφάγα να γίνουν πολύ βακτηριοκτόνα. Όταν ένα T κύτταρο φλεγμονής ειδικό για ένα βακτηριακό πεπτίδιο έρχεται σε επαφή με ένα μολυσμένο μακροφάγο, το T κύτταρο διεγείρεται να εκκρίνει παράγοντες ενεργοποίησης των μακροφάγων, με σημαντικότερο την IFN- $\gamma$ . Το μακροφάγο ευαισθητοποιείται να ανταποκριθεί στα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας, πιθανόν του TNF- $\alpha$  του T-κυττάρου.

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μέσω της κυτταρικής επαφής και της εκκρίσεως της IFN- $\gamma$  δημιουργεί μια σειρά από βιοχημικές αντιδράσεις που μετατρέπουν το μακροφάγο σε ένα ισχυρό αντιβακτηριακό κύτταρο (Εικ.1.5). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα συγχωνεύουν τα λυσοσώματά τους πιο αποτελεσματικά στα φαγοσώματα, εκθέτοντας ενδοκυττάρια ή προσφάτως φαγοκυτταρωμένα βακτήρια σε μία ποικιλία βακτηριοκτόνων λυσοσωματικών ενζύμων. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν ρίζες οξυγόνου και μονοξειδίου του αζώτου (NO<sup>•</sup>), τα οποία και τα δύο έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, καθώς και αντιβακτηριακά πεπτίδια.

Οι πιο γνωστοί ως τώρα παράγοντες ενεργοποίησης των μακροφάγων είναι η IFN- $\gamma$ , ο GM-CSF και ο TNF- $\alpha$ . Όταν αυτά ενεργοποιηθούν, παράγουν πλήθος άλλων κυτταροκινών και ενζύμων, υποδοχείς για τα Fc θραύσματα των ανοσοσφαιρινών, μόρια

των τάξεων I και II του ΜΣΙ (μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας) και μόρια προσκόλλησης (ιντεργκίνες π.χ.).

Η ενεργοποίηση των κυττάρων αυτών είναι ωστόσο ένα αρκετά πολύπλοκο φαινόμενο. Παίρνουν μέρος σε διάφορες λειτουργίες (μεταξύ των οποίων ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων, αναδιοργάνωση του ιστού, εξάλειψη μικροβίων και ιστική καταστροφή) καθεμία απ' τις οποίες ενεργοποιείται σε διαφορετικό στάδιο της ωρίμανσής τους και δεν είναι ανεξάρτητη του συγκεκριμένου κάθε φορά τοξικού παράγοντα ή του 'μείγματος' των λεμφοκινών στα οποία εκτίθενται. Επιπλέον, η κυτταρική σειρά των μονοκυττάρων/ μακροφάγων είναι ετερογενής και τα κύτταρα διαφέρουν σε χαρακτηριστικά, όπως η έκφραση των μορίων της ΜΣΙ II και των Fc υποδοχέων, η ανταπόκριση στις λεμφοκίνες και η παραγωγή περοξυδάσης.



**Εικ. 1.5. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα υφίστανται αλλαγές που μπορούν να αυξάνουν σημαντικά την αντιβακτηριακή τους δράση και να ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση. Η έκφραση των επιφανειακών MHC τάξεως II μορίων, αυξάνεται στα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία εκφράζουν τους TNF-α. Αυτό το αυτοκρινές ερέθισμα συνεργεί με την IFN-γ που εκκρίνεται από τα φλεγμονώδη CD4T κύτταρα για να αυξηθεί η αντιβακτηριακή δράση των μακροφάγων, ιδιαίτερα προκαλώντας την παραγωγή NO<sup>-</sup> και ριζών O<sub>2</sub>**

### 3. T-λεμφοκύτταρα

Η ωρίμανση των πρωταρχικών λεμφοκυττάρων του αιμοποιητικού ιστού γίνεται στο θύμο αδέν. Εκεί πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε κυτταροτοξικά (T<sub>c</sub>) και κύτταρα αρωγούς (T<sub>H</sub>).

Τα κυτταροτοξικά T- λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την απ' ευθείας εξόντωση των κυττάρων-στόχων και οι μηχανισμοί που πιθανώς χρησιμοποιούν (δεν είναι πλήρως

ξεκαθαρισμένο) είναι οι εξής δύο: α) από τα κυστίδια του λεμφοκυττάρου ελευθερώνονται διάφορες πρωτεάσες και πρωτεΐνες ομόλογες με το συστατικό C9 του συμπληρώματος (περφορίνες) και δημιουργούν πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου- στόχου καταστρέφοντας το, β) τα T<sub>c</sub> ενεργοποιούν έναν υποδοχέα της επιφάνειας του κυττάρου-στόχου και μεταβιβάζεται ένα μήνυμα απόπτωσης του κυττάρου αυτού.

Τα αρωγά T- κύτταρα επάγουν τις αντιδράσεις άλλων κυττάρων. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα TH1 και τα TH2, που διαφέρουν λειτουργικά. Τα πρώτα μεσολαβούν σε κυτταροτοξικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Βοηθούν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και εκκρίνουν IFN- $\gamma$ , IL-2 και καχεκτίνη. Τα δεύτερα ενεργοποιούν τα B- κύτταρα, τα εωζινοφίλα και τα ιστιοκύτταρα και παράγουν IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 και IL-13. Σχετίζονται με τη χυμική ανοσία.

Η διαφοροποίηση των T-κυττάρων βασίζεται στους αντιγονικούς υποδοχείς που εκφράζονται στην επιφάνειά τους. Υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων, οι TCR-1 και οι TCR-2. Πρόκειται για ετεροδιμερή πολυπεπτιδικών αλυσίδων  $\alpha$ ,  $\beta$  (TCR-2) και  $\gamma$ ,  $\delta$  (TCR-1) που συνδέονται με 5 πολυπεπίδια, το CD3 σύμπλεγμα. Το τελευταίο πιθανώς παίζει ρόλο στη διαβίβαση του σήματος που λαμβάνει το κύτταρο από την δέσμευση του αντιγόνου. Περίπου το 85-95% των T-κυττάρων του αίματος εκφράζει τον TCR-2 και το 15% τον TCR-1 (3).

Τα TCR-2+ διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τους συνυποδοχείς CD4 και CD8 που φέρουν στην επιφάνειά τους. Τα CD4+ κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα που παρουσιάζονται σ' αυτά (από κύτταρα παρουσιαστές όπως είναι π.χ. τα μακροφάγα) συνδεδεμένα με μόρια της τάξης II του ΜΣΙ. Πρόκειται ουσιαστικά για τα TH κύτταρα και ο διαχωρισμός τους σε TH1 και TH2 αφορά το είδος των κυτταροκινών που εκκρίνουν (4). Τα CD8+, στα οποία το αντιγόνο παρουσιάζεται από μόρια της τάξης I του ΜΣΙ, είναι κατά κύριο λόγο T<sub>c</sub> κύτταρα. Τα TCR-1+ δεν εκφράζουν CD4 ή CD8 υποδοχείς (αν και μερικά μπορεί να φέρουν τον CD8) και ο ρόλος τους στην ανοσοαπάντηση δεν είναι ξεκαθαρισμένος.

#### 4. B-λεμφοκύτταρα

Τα Β-λεμφοκύτταρα είναι τα μόνα κύτταρα ικανά να παράγουν αντισώματα. Φέρουν στην επιφάνεια τους έναν αντιγονικό υποδοχέα που δεν είναι άλλος από ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης προσδεδεμένης στην μεμβράνη του κυττάρου. Ο υποδοχέας δημιουργείται μετά από σωματικές αναδιατάξεις που οδηγούν στην παραγωγή δύο μορίων ανοσοσφαιρίνης. Οι αναδιατάξεις αυτές συμβαίνουν κατά την διάρκεια της αναπτύξεως των Β-κυττάρων στον μυελό των οστών και ρυθμίζονται έτσι ώστε κάθε κύτταρο να παράγει υποδοχείς μιας και μόνης ειδικότητας (5). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια μεγάλη ποικιλία υποδοχέων Β-κυττάρων κατά τα πρώιμα στάδια αναπτύξεως των Β-κυττάρων.

Η αλληλεπίδραση των αντιγόνων με έναν μικρό κλώνο ώριμων Β-λεμφοκυττάρων (εκφράζοντα IgM και IgD) που υπάρχουν στους περιφερικούς λεμφικούς ιστούς, επιφέρει δύο κύριες αλλαγές σε αυτά τα κύτταρα: α) τον πολλαπλασιασμό που έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη του κλώνου και β) την διαφοροποίηση που οδηγεί σε κύτταρα που εκκρίνουν συνεχώς αντισώματα ή γίνονται κύτταρα-μνήμης (6). Αυτές οι λειτουργίες επάγονται από κυτταροκίνες που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα και από μακροφάγα (7).

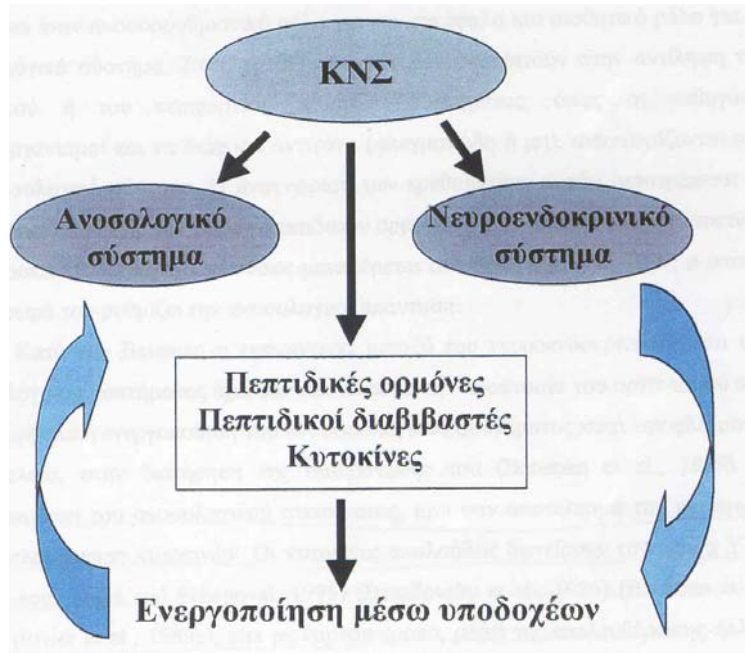
#### 5. Κύτταρα φυσικοί φονείς (NK)

Αποτελούν το 15% των λευκοκυττάρων του αίματος και χαρακτηρίζονται από το γεγονός ότι δεν διαθέτουν τους συνηθισμένους αντιγονικούς υποδοχείς (TCR ή Ig). Ο CD16 υποδοχέας τους, ο οποίος εκφράζεται και από πολλά λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα (όπως και οι περισσότεροι υποδοχείς τους), εμπλέκεται σε έναν από τους μηχανισμούς ενεργοποίησής τους (8). Σημαντική είναι ίσως η παρουσία του CD56, τον οποίο διαθέτουν ελάχιστα άλλα λευκοκύτταρα, ενώ διαθέτουν και έναν, μέτριας συγγένειας υποδοχέα της IL-2. Δέσμευση του τελευταίου με την αντίστοιχη κυτταροκίνη επάγει αντιδράσεις μη ειδικής κυτταροτοξικότητας. Τα NK μπορούν καταστρέψουν, κύτταρα μολυσμένα με ιούς καθώς και κύτταρα-στόχους 'επικαλυμμένα'

με IgG αντισώματα μέσω των CD16 υποδοχέων τους. Αυτή η αντίδραση ονομάζεται εξαρτημένη από αντίσωμα κυτταρικά επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (9). Κατόπιν διέγερσής τους παράγουν, όπως και τα Β-, Τ- λεμφοκύτταρα, IFN- $\gamma$ , IL-2 και TNF- $\alpha$ .

## ***1.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΥΡΟΕΝΔΡΟΚΡΙΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ***

Υπάρχει πλήθος δεδομένων που υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας αμφίδρομης επικοινωνίας ανάμεσα στο ανοσολογικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα, με αποτέλεσμα να θεωρείται σήμερα ότι αποτελούν μία συνεργαζόμενη ενιαία οντότητα, το νευροενδοκρινικό-ανοσολογικό σύστημα (Εικ.2.1). Το ανοσολογικό σύστημα υπόκειται σε μερική τουλάχιστον ρύθμιση από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) η οποία ασκείται κυρίως μέσω του υποθάλαμο-υποφυσιο-άξονα (ΥΨΑ). Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια κοινών, και για τα δύο συστήματα, μορίων (κυτταροκινών, πεπτιδικών ορμονών και νευροδιαβιβαστών) και υποδοχέων τους.

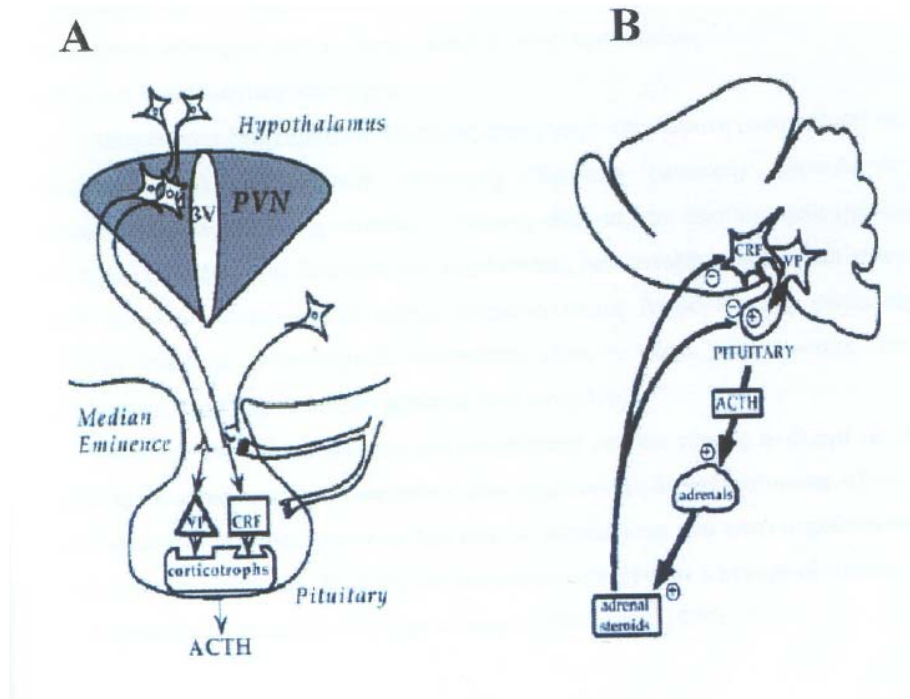


**Εικ. 2.1.** Σχηματικό διάγραμμα της επικοινωνίας μεταξύ του ανοσολογικού και του νευροενδοκρινικού συστήματος, η οποία επιτυγχάνεται με κοινούς και για τα δύο συστήματα υποδοχείς και προσδέτες.

Η επικοινωνία ανάμεσα στο νευροενδοκρινικό και το ανοσοποιητικό σύστημα προτείνει έναν ανοσορρυθμιστικό ρόλο για τον εγκέφαλο και αισθητικό ρόλο για το ανοσολογικό σύστημα. Έτσι, ερεθίσματα που δεν υποπίπτουν στην αντίληψη του κεντρικού ή του περιφερικού νευρικού συστήματος, όπως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και τα διάφορα αντιγόνα (φλεγμονώδη ή μη), αναγνωρίζονται από το ανοσολογικό σύστημα. Η αναγνώριση των ερεθισμάτων αυτών μετατρέπεται σε πληροφορία που έχει την μορφή πεπτιδικών ορμονών, νευροδιαβιβαστών, κυτταροκινών και χυμοκινών, η οποία ακολούθως μεταφέρεται στο ΚΝΣ (11), το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση.

Ο υποθάλαμο- υποφυσιο- επινεφριδιακός άξονας (ΥΥΕ) και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα είναι οι κύριοι ρυθμιστές των ομοιοστατικών μηχανισμών, που ενεργοποιούνται σε καταστάσεις stress που σχετίζονται με φλεγμονώδεις επεξεργασίες (Εικ.2.2). Η ενεργοποίηση του γίνεται μέσω κυτταροκινών που ενεργοποιούν την

παραγωγή CRH στον υποθάλαμο, ενώ παράλληλα ασκούν διεγερτική δράση στο συμπαθητικό νευρικό σύστημα (12)(13).



**Εικ. 2.2.** Ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων. **A.** Νευρώνες του υποθαλάμου, συνθέτουν CRH και το ελευθερώνουν, το οποίο τελικά φτάνει στην υπόφυση, όπου διεγείρει την έκκριση ACTH. **B.** Η ACTH δρα στον φλοιό των επινεφριδίων τα απελευθερώνουν γλυκοκορτικοειδή, τα οποία ασκούν αρνητική ρύθμιση με αποτέλεσμα την αναστολή παραγωγής CRH και τελικά διατηρείται η ομοιόσταση.

Ο CRH και η AVP είναι ίσως οι σημαντικότεροι υποθαλαμικοί παράγοντες, οι οποίοι διεγείρουν την έκκριση της αδενοκορτικοτροπίνης (ACTH). Η ACTH προέρχεται από τη διάσπαση ενός πρόδρομου μορίου, την προ-οπιομελανοκορτικοτροπίνη (POCM), απ' την οποία προέρχεται και η β-ενδορφίνη, ένα νευροπεπτίδιο που, μεταξύ άλλων, ελαττώνει την αντίληψη του πόνου. Τόσο το CRH όσο και η AVP συντίθενται στον παρακοιλιακό πυρήνα και ελευθερώνονται από νευρικές απολήξεις φτάνοντας στην υπόφυση μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας. Η AVP δρα συνεργιστικά βοηθώντας την



δράση του CRH στην παραγωγή και έκκριση της ACTH. Μέσω της ACTH διεγείρεται στη συνέχεια η παραγωγή γλυκορτικοειδών από τα επινεφρίδια (14).

Τα γλυκορτικοειδή έχουν μέγιστη αντιφλεγμονώδη δράση (15). Αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων που έχει προκληθεί από την επίδραση αντιγονικού ερεθισμού καθώς και την διαδικασία παρουσίασης αντιγόνου, μέσω αναστολής της έκφρασης των μορίων της τάξης II του ΜΣΙ και της παραγωγής IL-1 και IL-2 (16)(17)(18). Επιπλέον καταστέλλουν την κυτταρική δραστηριότητα μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των αρωγών T-κυττάρων και των φονικών κυττάρων. Σχετικά ανθεκτικά στην ανοσοκατασταλτική δράση των γλυκορτικοειδών in vivo φαίνεται να είναι τα B- κύτταρα.

Έτσι, η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα από μια κατάσταση stress, όπως η φλεγμονή οδηγεί τελικά σε ανοσοκαταστολή. Η δράση αυτή έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της υπερβολικής και παρατεταμένης ενεργοποίησης του ανοσιακού συστήματος. Επιπλέον το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, όταν διεγερθεί, ενεργοποιεί την έκκριση ρενίνης με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης της αγγειοτενσίνης-II, ενός ισχυρού αγγειοσυσπαστικού παράγοντα που προκαλεί έκκριση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια και CRH από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Μέσω ενός πυκνού δικτύου συμπαθητικής νεύρωσης των λεμφικών οργάνων επιτυγχάνεται μεταξύ άλλων και έκκριση IL-6 με επακόλουθη ενεργοποίηση του ΥΥΕ , συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην ανοσοκαταστολή που ακολουθεί (19)(20).

Πολλοί παράγοντες που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής (ένα μίγμα κυτταροκινών και άλλων χυμικών μεταβιβαστών) επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα. Οι κυτταροκίνες ευοδώνουν τη διέγερση του άξονα που γίνεται από τους πολυσακχαρίτες της εξωτερικής στοιβάδας του τοιχώματος των gram(-) βακτηρίων (22)(23). Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες TNF-α, IL-1 και IL-6 παίζουν τον σπουδαιότερο ρόλο στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα (21). Επιπλέον ο TNF-α και η IL-1 διεγείρουν την έκκριση της IL-6, ενώ η IL-6 έχει παλίνδρομη αρνητική δράση στους TNF-α και IL-1. Η IL-6 δρα συνεργιστικά με τα γλυκορτικοειδή στη διαδικασία παραγωγής των πρωτεϊνών της οξείας φάσης από το ήπαρ κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Οι ιντερφερόνες και η IL-2 δρουν με έμμεσο τρόπο ευοδώνοντας την έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, ενώ η δράση της IL-2 συνοδεύεται από αύξηση

του cAMP και της προσταγλανδίνης E2. Ο PAF και τα προστανοειδή διεγείρουν άμεσα την έκκριση του CRH και της AVP.

Σημαντικό ρόλο στην ανοσιακή απάντηση έχει βρεθεί να παίζουν η β-ενδορφίνη και η αMSH, παράγωγα της POMC (24)(25). Εκτός από το υποθάλαμο- υποφυσιακό σύστημα, τα πεπτίδια αυτά εντοπίζονται μεταξύ άλλων σε B-, T- λεμφοκύτταρα και στα μακροφάγα και πιθανόν να βοηθούν τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων στη θέση της φλεγμονής.

Η IL-2 και η IL-4, δρώντας συνεργιστικά οδηγούν σε αντίσταση στη δράση των γλυκοκορτικοειδών στα T- λεμφοκύτταρα, μειώνοντας την αντίσταση των αντίστοιχων υποδοχέων τους(26)(27). Είναι πιθανό μάλιστα, η προδιάθεση για εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων να συνδέεται με την αντίσταση στη δράση των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο. Στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας η συγκέντρωση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στα λευκοκύτταρα είναι μειωμένη κατά 50%.

Η φλεγμονή είναι δυνατόν να δραστηριοποιήσει τον ΥΥΕ άξονα και με έμμεσους τρόπους, μέσω ενεργοποίησης του κεντρικού νωραδρενεργικού συστήματος από κυτταροκίνες και άλλους μεταβιβαστές που δρουν σε νευρώνες έξω από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Έχει βρεθεί ότι σε φλεγμονώδεις εστίες βρίσκονται σωματοαισθητικοί κεντρομόλοι νευρώνες έκκρισης του CRH μετά από περιφερική διέγερση.

### **1.3 ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΑ**

Τα νευροπεπτίδια βρίσκονται αποθηκευμένα στις απολήξεις των νευρικών κυττάρων, σε κοινά εκκριτικά κοκκία με τους νευροδιαβιβαστές. Εκκρίνονται σε απάντηση νευρικών διεγέρσεων και επιδρούν στις λειτουργίες άλλων κυττάρων, δηλαδή δρουν ως χυμικά μηνύματα τόσο στο ΚΝΣ όσο και στην περιφέρεια.

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRH) ανήκει στα υποθαλαμικά νευροπεπτίδια, ενώ μόρια προερχόμενα απ' το POMC, όπως η β-ενδορφίνη, οι εγκεφαλίνες και οι δυνορφίνες, ανήκουν στα νευροπεπτίδια της υπόφυσης και πιο ειδικά χαρακτηρίζονται ως οποιοειδή πεπτίδια. Επιπλέον, η ουσία P, το νευροπεπτίδιο Y, το VIP, η νευροτενσίνη και πολλά άλλα, μεταξύ των οποίων και η ουροκορτίνη (UCN), ένα πρόσφατα χαρακτηριζόμενο νέο μέλος της οικογένειας των 'τύπου- CRH' πεπτιδίων ανήκουν στα "νευροπεπτίδια του stress", όπως έχουν χαρακτηριστεί εξαιτίας του σημαντικού ρόλου τους κατά τη διάρκεια στρεσογόνων καταστάσεων.

#### **1.3.1 Γενικά για την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH)**

Ήδη από το 1948 ο Haggis και συνεργάτες (28) υπέθεσαν ότι η λειτουργία της πρόσθιας υπόφυσης ρυθμίζεται από υποθαλαμικούς παράγοντες που μεταφέρονται εκεί μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας, ενώ το 1955 δύο ανεξάρτητες ομάδες έδειξαν ότι υποθαλαμικά εκχυλίσματα επάγουν την έκκριση ACTH από τα κορτικοτρόφα κύτταρα της αδενούπόφυσης (29)(30). Η πρώτη από τις ομάδες, ονόμασε την υποτιθέμενη ουσία εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF), αλλά μόνο το 1981 κατέστη δυνατή η απομόνωση, χαρακτηρισμός και σύνθεση ενός βόειου υποθαλαμικού CRF (ο CRH) από τον Vale και συν. (31). Επρόκειτο για ένα πεπτίδιο μοριακού βάρους 4671 Da (μοριακό βάρος του ανθρώπινου CRH : 4758 Da) που αποτελείται από 41 αμινοξέα.

Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ανιχνεύονται στον υποθάλαμο και κυρίως στους πυρήνες υπεροπτικό, παρακοιλιακό και τοξωτό (32)(33). CRH έχει επίσης ανιχνευθεί στην νευρο-υπόφυση και στο μίσχο της υπόφυσης (34). Χαμηλότερες

συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται στον εγκεφαλικό φλοιό, θάλαμο, βασικά γαγγλία, ιππόκαμπο, γέφυρα, προμήκη, παρεγκεφαλίδα, και νωτιαίο μυελό (35)(36) καθώς και σε εξωπυραμιδικούς νευρώνες της οδοντωτής έλικας του υποθαλάμου (37).

Εκτός όμως από το κεντρικό νευρικό σύστημα το CRH ανιχνεύεται και σε άλλους ιστούς και όργανα στην περιφέρεια. Ο πλακούντας φαίνεται ότι είναι ο ιστός εκείνος που μετά τον υποθάλαμο παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες του πεπτιδίου (38). CRH ανιχνεύεται επίσης και στο αμνιακό υγρό και η συγκέντρωση του πεπτιδίου αυξάνεται στο πλάσμα των εγκύων γυναικών (39).

Εκτός όμως από τους παραπάνω ιστούς CRH έχει βρεθεί και σε άλλους ιστούς όπως στο στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τους πνεύμονες, το πάγκρεας, το ήπαρ, οι ωοθήκες, το ενδομήτριο, τα επινεφρίδια, παχύ έντερο, αλλά και σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (40)(41)(42). Το CRH έχει επίσης απομονωθεί και από νεοπλασματικούς ιστούς όπως από καρκίνους πνεύμονα και μαστού, από καρκινοειδή του θύμου και από νεοπλάσματα του μυελού των επινεφριδίων (42)(43)(44)(45).

Το CRH διαδραματίζει, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, βασικό ρόλο στην ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ από το ΚΝΣ. CRH αλλά και mRNA του ανιχνεύονται σε αφθονία στους νευρώνες του υποθαλάμου. Αυτοί οι νευρώνες προβάλλουν στην μέση εσοχή και απελευθερώνουν CRH το οποίο φθάνει στην υπόφυση μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας (46).

Στην υπόφυση το CRH ενεργοποιεί τους υποδοχείς του που βρίσκονται στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (47), με αποτέλεσμα την διέγερση της παραγωγής πεπτιδίων σχετιζόμενων με την προπιομελανοκορτίνη (POMC), όπως είναι η υποφυσιοτρόπος ορμόνη (ACTH), η β-ενδορφίνη και άλλες. Η ACTH με τη σειρά της διεγείρει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων.

### 1.3.2 Πεπτίδια συγγενή με το CRH

Η Urocortin, ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 40 αμινοξέα, η urotensin (48) και η sauvagine (49), παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό ομολογία με το CRH, για αυτό και θεωρούνται μέλη της ίδιας οικογένειας (Πίνακας 1). Από αυτήν την οικογένεια μόνο το CRH και η Urocortin εκφράζονται σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά, ενώ η urotensin ταυτοποιήθηκε στα ψάρια και η sauvagine στα αμφίβια

Peptide	Sequence	Length	Identity(%)
hCRF	SEEPPI <sup>1</sup> SLD <sup>2</sup> DLTFHLLREVLEMARAEQLAQQ <sup>3</sup> AHSNRKLM <sup>4</sup> EII	41	100
oCRF	SQEPPI <sup>1</sup> SLD <sup>2</sup> DLTFHLLREVLEMTKADQLAEQAHSNRKLLDIA	41	83
hUCN 1	DNPSLSID <sup>1</sup> DLTFHLLRTLLELARTQSQRERPEQNR <sup>2</sup> IIFDSV	40	43
hUCN 2	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCN 2	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQ <sup>1</sup> ATNAQILAHV	38	34
hUCN 3	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAG <sup>1</sup> AA <sup>2</sup> NAHLMAQI	38	32
mUCN 3	FTLSLDVPTNIMNILLFNIDKAKNLRAG <sup>1</sup> AA <sup>2</sup> NAQLMAQI	38	26

**Πίνακας 1.** Ομόλογες περιοχές ανάμεσα στα διάφορα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH.

### 1.3.3 UCN

Η Urocortin (UCN) ανακαλύφθηκε μόλις το 1995 στον μεσεγκέφαλο αρουραίου (50)(51). Η ομολογία της με το ανθρώπινο CRH βρέθηκε να πλησιάζει το 44%, ενώ ακόμα μεγαλύτερη ομοιότητα έχει με την ουροτενσίνη των ιχθύων.

Το ανθρώπινο γονίδιο της ουροκορτίνης έχει κλωνοποιηθεί και το πεπτίδιο έχει απομονωθεί από τον εγκεφαλικό ιστό όρνιθας. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις του πεπτιδίου στον εγκέφαλο βρέθηκαν να είναι περιορισμένες και σύντομα η UCN εντοπίστηκε σε πολλούς περιφερικούς ιστούς, όπως το πεπτικό σύστημα, η καρδιά, ο θύμος και ο σπλήνας. UCN, πεπτίδιο και mRNA, βρέθηκε σε ενεργοποιημένα και μη ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και στην κυτταρική σειρά Jurkat, ενώ ενδιαφέρον ήταν το ότι στα ίδια κύτταρα ο Bamberger και οι συνεργάτες του δεν βρήκαν CRH mRNA (52).

Με την RT-PCR μέθοδο ανιχνεύτηκε mRNA ουροκορτίνης σε μη διεγερμένο θύμο αρουραίου και στον σπλήνα(53), ενώ παρατηρήθηκε αύξηση στο διπλάσιο των επιπέδων mRNA στον θύμο μετά από διέγερση με LPS (54). Ωστόσο, το γεγονός ότι η περιφερική χορήγηση ACTH ή γλυκοκορτικοειδών εμφάνιζε παρόμοια αποτελέσματα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του mRNA της UCN ρυθμίζεται μέσω του ΥΥΕ άξονα και όχι από την απ' ευθείας δράση κάποιου παράγοντα όπως το LPS.

Πρόσφατα κλωνοποιήθηκαν άλλα δύο ομόλογα της ουροκορτίνης, η ουροκορτίνη II και η ουροκορτίνη III. Η UCNII ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από 38 αμινοξέα, κλωνοποιήθηκε από τον εγκέφαλο ποντικού. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα ακολούθως ταυτοποιήθηκε μία περιοχή που παρουσιάζει 76% ομολογία με την UCNII και ονομάστηκε αρχικά ανθρώπινο πεπτίδιο σχετιζόμενο με την Urocortin (Urocortin related peptide, URP), αλλά πιθανότατα πρόκειται για την ανθρώπινη UCNII (55).

Η UCNIII κλωνοποιήθηκε στον άνθρωπο και τον ποντικό και αποτελείται από 38 αμινοξέα. Το πεπτίδιο αυτό σχετίζεται δομικά περισσότερο με την UCNII (40% ομολογία) παρά με την Urocortin ή το CRH (55).

#### 1.3.4 Ανίχνευση CRH, UCN στο ανοσολογικό σύστημα

Το 1990 ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά CRH (πεπτιδίο και mRNA) σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (ανθρώπινα κυκλοφορούντα λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα) (56).

Πεπτιδίο και mRNA ανιχνεύτηκε σε σπληνοκύτταρα και στον αρθρικό θύλακο αρουραίων Lewis με φλεγμονώδη αρθρίτιδα (57), καθώς και σε ενεργοποιημένα με μιτογόνα T- κύτταρα, αλλά όχι στα σπληνικά B- κύτταρα ή στα μακροφάγα (58). Τελευταίες έρευνες εντόπισαν CRH mRNA στο ήπαρ, στον θύμο αδένα και τον σπλήνα (59), ενώ CRH πεπτιδίο βρέθηκε σε θύμο αρουραίου (60).

Χρησιμοποιώντας την υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης τεχνική του RT-PCR, οι Muglia et al απέδειξαν την παρουσία CRH mRNA σε σπληνοκύτταρα ποντικών και αφού τα διαχώρισε σε B-, T- λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, βρήκε ότι μόνο τα T κύτταρα περιείχαν CRH mRNA.

Στο θύμο CRH έχει εντοπιστεί στο μυελό και συγκεκριμένα στα επιθηλιακά κύτταρα και στα μακροφάγα, αλλά όχι στα λεμφοκύτταρα (61). Στον σπλήνα CRH βρέθηκε στον ερυθρό πολφό στις περιφερικές ζώνες σε θέσεις που εντοπίζονται B- λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Πολλά από τα κύτταρα που περιείχαν CRH στους λεμφοειδείς ιστούς ήταν κοντά σε νοραδρενεργικούς νευρώνες. Ίσως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού στον σπλήνα και το θύμο να μην είναι οι μόνες πηγές CRH, καθώς με ανοσοιστοχημικές τεχνικές αποκαλύφθηκε η παρουσία CRH σε νευρώνες μέσα και γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία στον σπλήνα, τον θύμο και τον αρθρικό θύλακο (62).

Το CRH εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως προκύπτει από τα παραπάνω τελευταία δεδομένα. Επειδή ωστόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα τόσο του πεπτιδίου όσο και του mRNA είναι πολύ χαμηλά, ο πραγματικός ρόλος του στη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης μπορεί να αξιολογηθεί μόνο κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού.

Πειράματα που έγιναν χρησιμοποιώντας παράγοντες ενεργοποίησης, όπως οι κυτταροκίνες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού και διεγείρουν την παραγωγή CRH από τον υποθάλαμο, το LPS ή κάποια μιτογόνα, είχαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Σε σπληνικά και θυμικά προσκολλημένα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν in vitro με IL-1 δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση της έκκρισης CRH (63),

ενώ το LPS και η ConA βρέθηκαν να αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα του εκκρινόμενου CRH σε B- και T- λεμφοκύτταρα αντίστοιχα (64).

Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε ότι το CRH εκκρίνεται ως απάντηση σε συγκεκριμένους ανοσοδιεγερτικούς παράγοντες που σχετίζονται με το στρες. Άλλα πειράματα έδειξαν ότι απ' τα συνολικά μονοκύτταρα του αίματος, τα προσκολλημένα συνεισφέρουν ελάχιστα στην παραγωγή CRH, ενώ τα CD4+ κύτταρα επέδειξαν ιδιαίτερη ανταπόκριση σε διέγερση από κυτταρικό στρες.

Η Urocortin ανιχνεύεται και αυτή σε κύτταρα και ιστούς του ανοσολογικού συστήματος. Η πρώτη ένδειξη ήταν η ανίχνευση mRNA αλλά και πεπτιδίου σε T-λεμφοκύτταρα της κυτταρικής σειράς Jurkat (65). Το mRNA της Urocortin ανιχνεύθηκε επίσης στον θύμο και στον σπλήνα επίμυων (66).

Το mRNA της Urocortin εκφράζεται και σε φλεγμαίνοντες ιστούς, όπως στον αρθρικό θύλακο ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και μάλιστα σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με την έκφραση στον αρθρικό θύλακο ασθενών με οστεοαρθρίτιδα.

### ***1.3.5 Υποδοχείς του CRH στο ανοσοποιητικό***

Μελέτες δέσμησης σε μεμβρανικά παρασκευάσματα και μελέτες με αυτοραδιογραφία, έδειξαν ότι το αρχικό βήμα στις δράσεις του CRH είναι η δέσμηση του σε ένα μεμβρανικό υποδοχέα. Ειδικές θέσεις σύνδεσης για το CRH ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπόφυσης επίμυος (67). Ειδικές θέσεις σύνδεσης για το CRH βρέθηκαν ακολούθως και σε άλλες περιοχές στον εγκέφαλο (68) αλλά και στην περιφέρεια (69)(70), συμπεριλαμβανομένου και του ανοσοποιητικού συστήματος (71).

Ο υποδοχέας του CRH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη με μια G-πρωτεΐνη, η οποία μεταβιβάζει το σήμα μέσω διέγερσης της παραγωγής της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP) (72)(73).

Πρόσφατες μελέτες κλωνοποίησης του υποδοχέα έδειξαν ότι υπάρχουν δύο κύριες μορφές του, ο CRHR1 και ο CRHR2. Οι δύο μορφές του υποδοχέα



παρουσιάζουν 70% ομολογία στο επίπεδο των αμινοξέων, έχουν διαφορετική ανατομική κατανομή (ο πρώτος εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο ενώ ο δεύτερος στην περιφέρεια), διαφορετικό φαρμακευτικό προφίλ (Πίνακας 2) (74) και διαφορετική λειτουργικότητα (75).

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά σύνδεσης των ανθρώπινων υποδοχέων hCRHR1 και hCRHR2

Πεπτίδιο	hCRHR1 (K <sub>i</sub> , nM)	hCRHR2α (K <sub>i</sub> , nM)	hCRHR2β (K <sub>i</sub> , nM)
hCRH	1.5	42	47
oCRH	1.1	230	320
rUCN	0.3	0.4	0.4
hUCN	0.4	0.3	0.5
URO	0.4	1.8	5.7
SVG	0.7	0.5	2.1

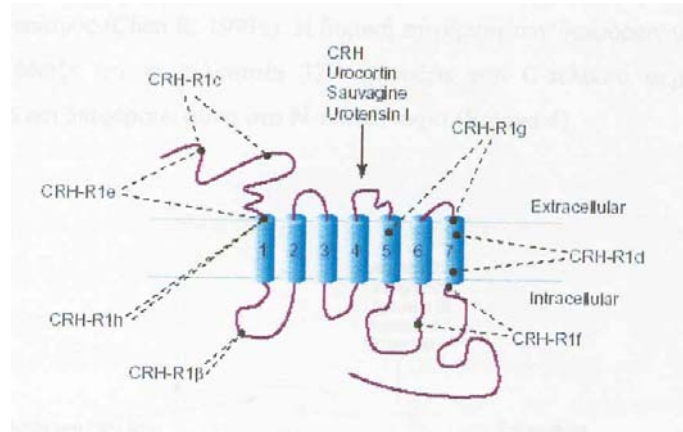
Οι σταθερές αναστολής της σύνδεσης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας σαν προσδέτη την [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>0</sup>]Svγ

### 1.3.6 Υποδοχέας τύπου I του CRH (CRHR1)

Ο CRHR1 περιέχει επτά υδρόφοβες α-έλικες και ταυτοποιείται ευρέως τόσο στον εγκέφαλο, όσο και στην περιφέρεια (76). Στον εγκέφαλο εκφράζεται κυρίως σε δομές του φλοιού και της παρεγκεφαλίδας.

Έχουν απομονωθεί διάφορες ποικιλομορφές του mRNA για τον CRHR1α, οι οποίες μπορεί να παριστούν διάφορες ισομορφές του και ονομάζονται R1b,c,d,e,f,g,h (Εικ.3.1) (77)

Ο CRHR1 προσδένει με την ίδια περίπου συγγένεια το CRH, την Urocortin I, την urotensin και την sauvagine, αλλά δεν αναγνωρίζει τις Urocortin II και III. Η κύρια λειτουργία του υποδοχέα φαίνεται να είναι η διαμεσολάβηση της φυσιολογικής απάντησης του οργανισμού στο στρες.



**Εικ. 3.1.** Οι διάφορες ισομορφές του CRHR1 δημιουργούνται με εναλλακτικό μάτισμα του CRHR1α. Στις ισομορφές αυτές διακρίνονται απαλείψεις ή ενθέσεις αμινοξέων στις θέσεις που σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές. Οι περισσότερες ισομορφές είναι ανεπαρκείς στη σύνδεση του προσδέτη και στις ιδιότητες διαβίβασης σήματος.

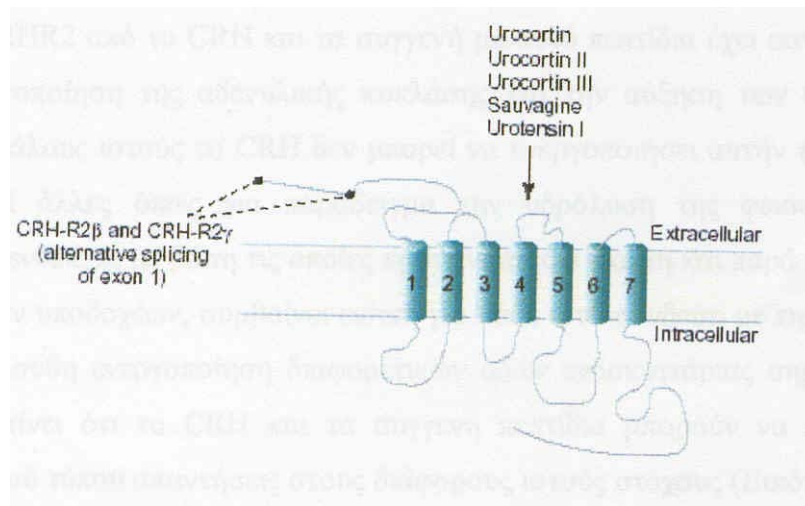
### 1.3.7 Υποδοχέας τύπου II του CRH (CRHR2)

Ο CRHR2 κλωνοποιήθηκε πιο πρόσφατα από τον υποθάλαμο επίμυος (78), την καρδιά ποντικού (79) και τον εγκέφαλο και την καρδιά ανθρώπου (80). Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις διαφορετικές μορφές αυτού του υποδοχέα με διαφορετική κατανομή στους ιστούς (81) : ο CRHR2α αποτελούμενος από 411 αμινοξέα, ο CRHR2β αποτελούμενος από 431 αμινοξέα (82) και ο CRHR2γ (83). Στον άνθρωπο εκφράζεται μόνο το ομόλογο του CRHR2α (84).

Ο CRHR2α εκφράζεται κυρίως σε νευρωνικές ομάδες, ενώ ο CRHR2β εκφράζεται περισσότερο σε μη-νευρωνικές ομάδες όπως στο χοριοειδές πλέγμα, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στον πνεύμονα και στο έντερο (85)(86). Η κατανομή

του CRHR2 στον εγκέφαλο είναι διαφορετική από εκείνη του CRHR1, με τον CRHR2 να εντοπίζεται κυρίως σε υποφλοιώδεις περιοχές (87) (Εικ. 3.2)

Ο CRHR2 συνδέει την Urocortin I, II και III, την urotensin και την sauvagine με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια σε σχέση με το CRH. Τα πεπτίδια της Urocortin I, II και III έχουν ανιχνευθεί σε ιστούς που εκφράζουν τον υποδοχέα 2 και φαίνεται ότι αντιπροσωπεύουν τους ενδογενείς προσδέτες του CRHR2 (88).



**Εικ. 3.2.** CRHR2α. Οι isoμορφές CRHR2β και CRHR2γ διαφέρουν μόνο στο N-τελικό άκρο το οποίο φαίνεται να είναι κρίτικης σημασίας για την σύνδεση του προσδέτη, αλλά περιέχουν ταυτόσημες εξωκυττάριες αγκύλες και διαμεμβρανικές ομάδες.

### 1.3.8 Ο ρόλος των CRH, UCN στη φλεγμονή

Ο μηχανισμός της φλεγμονής παρουσιάζει εξαιρετική πολυπλοκότητα καθώς μετέχουν πολύ παράγοντες ταυτοχρόνως όπως η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα και του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και αλληλεπιδράσεις μεταξύ πλήθους μορίων, όπως τα γλυκορτικοειδή, οι κυτταροκίνες και τα διάφορα νευροπεπτίδια, τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά.

Η διερεύνηση των επιδράσεων του CRH και της UCN, είναι πολύ δύσκολη τόσο σε πειράματα σε ανθρώπους όσο και σε ποντίκια. Για τα μεν πειράματα που γίνονται σε άνθρωπο, η δυσκολία έγκειται στο ότι η CRH-BP που κυκλοφορεί δεσμεύει ένα μεγάλο μέρος του χορηγούμενου πεπτιδίου με αποτέλεσμα ένα μικρό μόνο ποσοστό να φτάνει στο στόχο του. Ενώ στα πειράματα που γίνονται στα ποντίκια (όπου η CRH\_BP δεν κυκλοφορεί) είναι πολλές φορές δύσκολο να διαπιστώσει κανείς κατά πόσο η παρατηρούμενη αντίδραση είναι αποτέλεσμα της απ' ευθείας δράσης των πεπτιδίων ή οφείλεται στην ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα και στα τελικά προϊόντα του, τα γλυκοκορτικοειδή, οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των οποίων είναι γνωστές.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν την παρουσία CRH ή άλλων, τύπου-CRH πεπτιδίων (UCN π.χ.) σε περιοχές φλεγμονής και παρουσιάζονται παρακάτω:

Ιστοί αρουραίων στους οποίους είχε επαχθεί φλεγμονή με χημικό τρόπο, βρέθηκαν να περιέχουν CRH παρόλο που το πεπτίδιο δεν ανιχνεύθηκε σε ελεύθερη κυκλοφορία (89). Όταν ωστόσο, χορηγήθηκε περιφερειακά ένα CRH-αντίσωμα, η ανταλαρμίνη (ένας ειδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα CRH-R1), παρατηρήθηκε σημαντική καταστολή της κυτταρικής διήθησης και μείωση του φλεγμονώδους εκκρίματος.

Σε πειραματικά επαγόμενες φλεγμονές, σε αρουραίους με αρθρίτιδα, τα επίπεδα του CRH (πεπτιδίου και mRNA) στα διηθούντα μονοκύτταρα, βρέθηκαν αυξημένα (90). Επιπρόσθετα, απομονωμένα μονοκύτταρα του λεμφικού συστήματος του γαστρεντερικού που κατεργάστηκαν με CRH, βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στον πολλαπλασιασμό τους.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω πειράματα, θεωρήθηκε ότι το CRH εκκρίνεται από τα διηθούντα μακροφάγα και άλλα κύτταρα στη θέση της φλεγμονής και δρα τοπικά κυρίως ευοδώνοντας την φλεγμονή. Ωστόσο, αντιφλεγμονώδης δράση του CRH και της UCN έχει επίσης παρατηρηθεί, όπως φαίνεται και στα παρακάτω δεδομένα:

Στην αυτοάνοση ασθένεια της εγκεφαλομυελίτιδας, όπου παθογόνα T- κύτταρα παράγουν κυτταροκίνες όπως ο TNF-α που καταστρέφουν την μυελίνη, ενδοπεριτονιακή χορήγηση CRH ή UCN σε αρουραίους που έχουν μολυνθεί καταπραΰνει τα συμπτώματα. Στο αποτέλεσμα αυτό βέβαια μεσολαβεί μερικώς και η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα (91).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αγγειοδιασταλτική δράση του CRH και της UCN μετά από ενδοδερμική ένεση. Η μείωση της επαγομένης αγγειακής διαπερατότητας από την παρουσία κάποιου ανταγωνιστή του CRH-R1 ή κάποιου ανταγωνιστή του υποδοχέα 1 της ισταμίνης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο μηχανισμό της δράσης των πεπτιδίων αυτών ενέχονται τα ιστιοκύτταρα του δέρματος, τα οποία απελευθερώνουν ισταμίνη μετά από δέσμευση CRH ή UCN στους αντίστοιχους υποδοχείς.

Κατά την ανοσοαπάντηση ο πολλαπλασιασμός των ανοσοποιητικών κυττάρων είναι απ' τις σημαντικότερες διαδικασίες. Ο Mc Gillis και συν. έδειξε ότι επίδραση CRH (1nM) σε καλλιέργεια λεμφοκυττάρων από σπληνοκύτταρα αρουραίου διεγείρει τα λεμφοκύτταρα να πολλαπλασιαστούν (92). Μάλιστα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν απομονωμένα σπληνοκύτταρα έδειξαν ότι μόνο τα B- κύτταρα ανταποκρίνονται στη διέγερση. Επίσης, στα ίδια πειράματα βρέθηκε ότι η περιοχή δέσμευσης του CRH στα B- κύτταρα βρίσκεται στο C-άκρο του πεπτιδίου και όχι στο N-άκρο, το οποίο δεσμεύεται στον R1 υποδοχέα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η επίδραση του CRH στα NK κύτταρα in vitro. Το CRH φαίνεται να ενισχύει την έμμεσα κυτταροτοξική δράση των κυττάρων αυτών (93), μέσω μάλιστα των μακροφάγων κυττάρων (94).

Πολλές ενδείξεις υποδεικνύουν τη συμμετοχή των νευροπεπτιδίων του στρες στη ρύθμιση της ανοσοποιητικής απόκρισης. Η τοπικά εκκρινόμενη CRH έχει προφλεγμονώδης ιδιότητες, ενώ με αποκλεισμό του υποδοχέα 1 της CRH επιτυγχάνεται εξασθένιση της φλεγμονής. Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο μας, στην κυτταρική σειρά μακροφάγων RAW264.7, δείχνουν ότι η CRH έχει μια άμεση προφλεγμονώδη δράση στα μακροφάγα, προάγοντας έτσι την έκφραση κυτταροκινών που αρχικά προκαλείται από το LPS, ενώ η Urocortin, ένα ομόλογο της CRH, μειώνει την έκφραση των κυτταροκινών στα μακροφάγα.

Συμπερασματικά το CRH και η UCN εκκρίνονται τόσο από νευρικά όσο και από κύτταρα του ανοσοποιητικού, δρουν πάνω σε συγκεκριμένους υποδοχείς ενός μεγάλου αριθμού ανοσοαρμόδιων κυττάρων, αλληλεπιδρούν με κυτταροκίνες, νευροδιαβιβαστές και άλλες ορμόνες και διαδραματίζουν τελικά έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης. Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι η συστηματική χορήγηση CRH οδηγεί σε μερική ανοσοκαταστολή μέσω αύξησης των επιπέδων των κορτικοειδών και

ενεργοποίησης του συμπαθητικού συστήματος, ενώ στην περιφέρεια εμφανίζει ευοδωτική δράση στη φλεγμονή δρώντας ως αυτο- παρακρινική. Ίσως το περιφερικό CRH να παίζει κάποιο άμεσο ρόλο στα αρχικά στάδια της φλεγμονώδους ανοσοαπάντησης, ενώ το κεντρικό να δρα έμμεσα μέσω του νευρο-ενδοκρινικού συστήματος. Το πιο πιθανό είναι πάντως ότι η φλεγμονή ρυθμίζεται ταυτόχρονα από προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες οι οποίοι βρίσκονται σε μια πολύ ευαίσθητη ισορροπία, οποιαδήποτε μεταβολή της οποίας μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι αυτοάνοσες ασθένειες.

Τόσο ο προφλεγμονώδης ρόλος του τοπικά παραγόμενου CRH όσο και η αντιφλεγμονώδης δράση του κεντρικού CRH που δρα μέσω του ΥΥΕ άξονα, ωστόσο, παραμένουν αδιευκρίνιστα.

#### ***1.4 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ TLR***

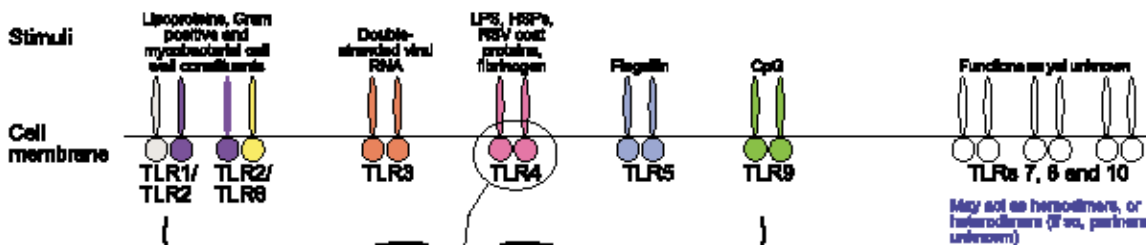
Όπως προαναφέρθηκε, η ανοσολογική απόκριση απαρτίζεται από την ειδική και μη ειδική απόκριση. Η ειδική, που επιτυγχάνεται με την μεσολάβηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων, αναγνωρίζει παθογόνα με μεγάλη συγγένεια μέσω υποδοχέων που μεταλλάσσονται συνεχώς. Ωστόσο η ειδική ανοσία δεν είναι αρκετά γρήγορη ώστε να προλαμβάνει να θανατώνει άμεσα τους μικροοργανισμούς. Έτσι, απαιτείται η ύπαρξη της μη ειδικής ανοσίας σαν πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, αφού είναι πιο γρήγορη στην αναγνώριση των ξενιστών κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης. Η αναγνώριση των παθογόνων στη μη ειδική ανοσία γίνεται από ειδικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν εξελιχθεί, ώστε να αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα μικροοργανισμών εξελικτικά συντηρημένα. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι αυτοί οι υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων TLR (Toll Like Receptor). Μετάδοση σήματος από τους TLRs, επάγει την παραγωγή προφλεγμονώδων κυτταροκινών, αντιμικροβιακών

πεπτιδίων και νιτρικού οξέος (NO). Οι TLRs μπορούν επίσης, να παράγουν σήματα που ενεργοποιούν την ειδική ανοσία, που μεσολαβείται από τα T και B κύτταρα. Συνεπώς ενεργοποιούν τόσο την μη ειδική όσο και την ειδική ανοσία.

Η πρώτη ανθρώπινη πρωτεΐνη της οικογένειας αυτής ανακαλύφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 90 και ονομάστηκε ανθρώπινη TLR1 (100,101). Το 1997 ο Janeway και η ομάδα του χαρακτήρισαν μια ακόμα πρωτεΐνη μέλος της οικογένειας TLR, την ανθρώπινη TLR4 και ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν το ρόλο της στην ανοσολογική απόκριση (102). Έως σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί 10 ανθρώπινες και 9 τρωκτικών διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια TLR (103,104,105). Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν σαν κοινό χαρακτηριστικό τη δομή τους. Έτσι, όλες έχουν μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης και μια ενδοπλασματική περιοχή από όπου ξεκινά η μετάδοση σήματος. Η ενδοπλασματική αυτή περιοχή, είναι ομόλογη με την αντίστοιχη περιοχή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 (IL-1R). Η περιοχή αυτή αποκαλείται Toll/IL-1R ομόλογη περιοχή (TIR). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι όλοι αυτοί οι υποδοχείς έχουν παρόμοιο μονοπάτι μετάδοσης σήματος.

Η κυτταροπλασματική περιοχή TIR, έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη. Αντίθετα η εξωκυττάρια περιοχή, η οποία ευθύνεται για την αναγνώριση των παθογόνων, έχει εξελιχθεί πολύ περισσότερο, γεγονός που υποδεικνύει την απαίτηση για συχνή αλλαγή, λόγω της συνεχούς μετάλλαξης των μικροβίων.

Πολλά είδη TLRs εκφράζονται στους διάφορους κυτταρικούς τύπους που ενέχονται στην πρώτη γραμμή άμυνας στους οργανισμούς, όπως τα μακροφάγα, ουδετερόφιλα, επιθηλιακά κύτταρα από το υπογάστριο και τον πνεύμονα και δερματικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα, εκφράζουν επίσης μια εντυπωσιακή ποικιλία υποδοχέων TLRs, που αντανάκλουν τον μοναδικό τους ρόλο στην ανίχνευση μικροοργανισμών και στην ενεργοποίηση του συστήματος της ειδικής ανοσίας. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι TLRs εκφράζονται επίσης σε B και T λεμφοκύτταρα. Οι υποδοχείς TLR είναι εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και όταν το κύτταρο εκτεθεί σε μικροοργανισμούς στρατολογούνται πλέον στα φαγοσωμάτια. Τέλος σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι διμερή άλλοτε ομοδιμερή και άλλοτε ετεροδιμερή, πρωτεϊνών της οικογένειας TLR (106), όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1



Εικ. 4.1. Διαφορετικά είδη TLRs μπορούν να δρουν σαν ομοδιμεροί ή ετεροδιμεροί.

#### 1.4.1 Προσδέτες των υποδοχέων TLR

Οι πιο γνωστοί προσδέτες των TLRs, είναι μοτίβα παθογόνων μορίων που έχουν διατηρηθεί εξελικτικά και καλούνται PAMPs (pathogen associated molecular patterns). Τα PAMPs έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά τα οποία τα καθιστούν ικανά να διεγείρουν την ανοσοαπάντηση (107). Πρώτον, παράγονται μόνο από τους παθογόνους μικροοργανισμούς και όχι από τα κύτταρα του ξενιστή, γεγονός που επιτρέπει στους ξενιστές να διακρίνουν εαυτό και μη. Δεύτερον, είναι απαραίτητα για την ικανότητα των μικροοργανισμών να επάγουν την ανοσοαπάντηση, για αυτό και έχουν διατηρηθεί εξελικτικά. Τέλος τα PAMPs αποτελούν θα λέγαμε ένα είδος μοριακής υπογραφής της τάξεως του κάθε παθογόνου. Έτσι όχι μόνο σηματοδοτούν την ύπαρξη μόλυνσης, αλλά δίνουν επίσης και σημαντικές πληροφορίες για τον τύπο του παθογόνου που προκάλεσε την μόλυνση.

Κάθε ξεχωριστό PAMP αναγνωρίζεται και από ειδικό υποδοχέα TLR. Συνοπτικά ο τύπος του PAMP και του TLR στον οποίο δεσμεύεται παρουσιάζεται στον πίνακα 3. Έτσι ενδεικτικά αναφέρουμε ότι οι πεπτιδογλυκάνες και τα λιποπεπτίδια δεσμεύονται



στον TLR2, το RNA διπλής έλικας (υικό) στον TLR3, το LPS στον TLR4, η flagellin στον TLR5 και τέλος ό,τι αποκρίνεται στο βακτηριακό DNA στον TLR9.

TLRs	Origin of ligands	Ligands
TLR2	Gram <sup>+</sup> bacteria	Lipoproteins [77,78] Peptidoglycan [30,79] (TLR2/6 [33] or TLR2/X [35]) <sup>a</sup> Lipoteichoic acids [79,80] Modulin (TLR2/6) [81] Lipopeptides (TLR2/X) [33,35] Lipoproteins, lipopeptides [82–85]
	<i>Staphylococcus</i> Bacteria	
	<i>Mycoplasma</i> , <i>Mycobacteria</i> , <i>Spirochetes</i>	
	<i>Mycoplasma</i>	MALP-2 (TLR2/6) [31,35]
	<i>Spirochetes</i>	Glycolipids [80]
	<i>Listeria</i>	Heat-killed bacteria [86]
	<i>Mycobacteria</i>	Lipoarabinomannan [25,87,88]
	<i>Porphyromonas</i> , <i>Spirochetes (Leptospira)</i>	LPS [28,29]
	Yeast	Zymosan (TLR2/6) [33,78]
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	GPI anchors [89]
	<i>Klebsiella</i>	Outer membrane protein A [90]
	<i>Neisseria meningitidis</i>	Soluble factors (TLR1/2) [34]
TLR3	Virus	dsRNA [47]
TLR4	Gram <sup>-</sup> bacteria	LPS [22–24]
	Gram <sup>+</sup> bacteria	Lipoteichoic acids [30]
	Plant	Taxol [48]
	Respiratory syncytial virus	F protein [49]
	Host	HSP60 [51,52] Fibronectin EDA domain [56]
TLR5	Bacteria with flagella	Flagellin [44]
TLR9	Bacteria	Unmethylated CpG DNA [10]

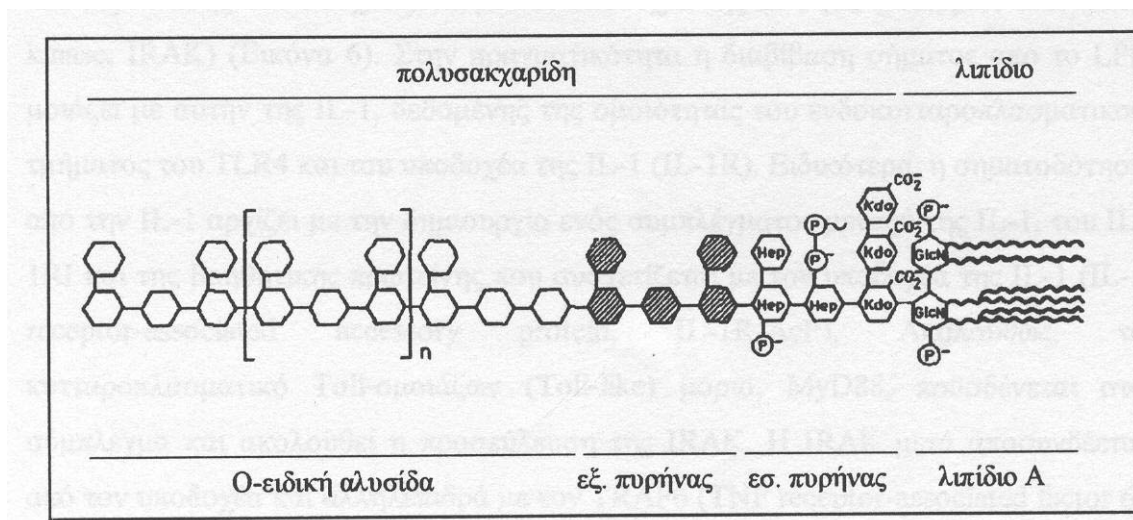
Πίνακας 3. TLRs και προσδέτες τους

#### 1.4.2 Ενδοτοξίνη ή LPS

Το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος των PAMPs, είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS) ή αλλιώς γνωστός ως ενδοτοξίνη, και αποτελεί το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των gram αρνητικών βακτηρίων (108). Όταν η ενδοτοξίνη επιδρά στα

μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ενεργοποιεί, προκαλώντας τα να εκκρίνουν ενδογενείς διαμεσολαβητές της φλεγμονής, όπως το NO, βιοδραστικά πεπτιδία και κυρίως κυτταροκίνες όπως η IL-1, IL-16 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου TNF-α. Ωστόσο, παρουσία μεγάλων ποσοτήτων ενδοτοξίνης στην κυκλοφορία, προκαλεί υπερβολική ενεργοποίηση των παραπάνω αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή λειτουργικών οργάνων και τελικά τον θάνατο. Η κατάσταση αυτή καλείται σηπτικό shock.

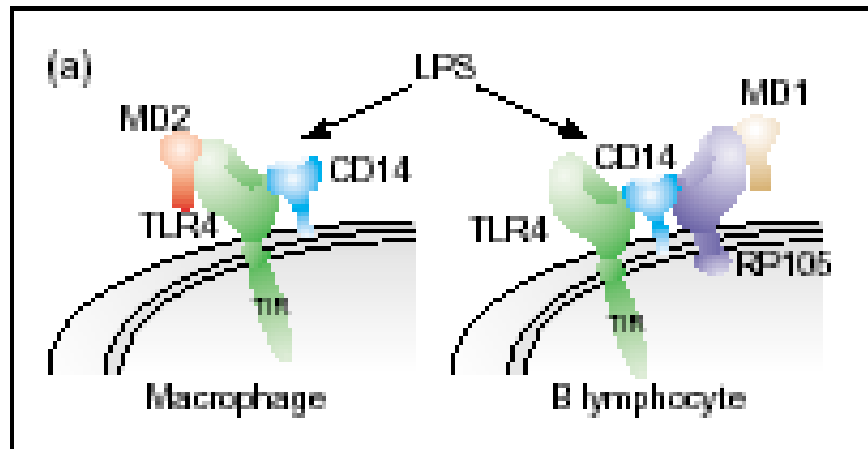
Όπως υποδηλώνει το όνομα του το LPS , αποτελείται από μια λιπιδική και μια πολυσακχαριτική ομάδα. Η πολυσακχαριτική ομάδα με τη σειρά της, αποτελείται από την Ο-ειδική αλυσίδα και τον πυρήνα. Η Ο-ειδική αλυσίδα ευθύνεται για την υψηλή αντιγονικότητα των Gram αρνητικών βακτηρίων και ποικίλει ευρέως ανάμεσα στα διάφορα είδη. Ο πυρήνας τώρα, είναι ένας ολιγοσακχαρίτης, ο οποίος διατηρεί σχετικά σταθερή δομή, ανάμεσα στα διάφορα είδη. Τέλος η λιπιδική ομάδα, ή αλλιώς λιπίδιο Α είναι το μέρος του LPS που ευθύνεται για τη δράση της ενδοτοξίνης (109). Η δομή του LPS παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικ. 4.2)



**Εικ. 4.2.** Χημική δομή της ενδοτοξίνης, ενός αντιβακτηριοειδούς. *Hep*: Επτόζη, *Kdo*: 2-κετο-3-δεοξυοκτονικό οξύ, *GlcN*: N-ακετυλ γλυκοζαμίνη, *P*: Φώσφορος

### 1.4.3 Διαβίβαση σήματος – Έκφραση TLR4

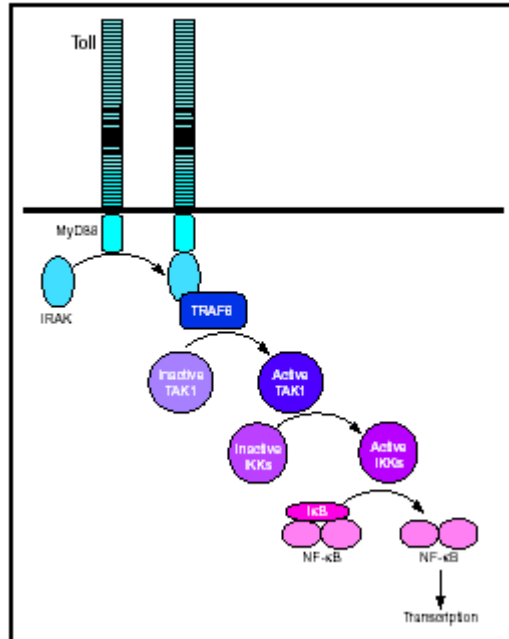
Από πολύ παλιά, ήταν γνωστό ότι το LPS προσδένεται στη δεσμευτική πρωτεΐνη LBP (LPS binding protein), μεγέθους 80 kDa και στην CD14 μια πρωτεΐνη 55 kDa. Αργότερα, όταν πια ανακαλύφθηκε ο ρόλος του υποδοχέα TLR4 στην αναγνώριση και διαβίβαση σήματος του LPS, αποδείχτηκε ότι μπορεί να υπάρξει και άμεση αλληλεπίδραση του LPS (χωρίς να δεσμεύεται στην CD14) με τον TLR4 (110). Περαιτέρω μελέτες (111), έδειξαν ότι απαιτείται ένα ακόμη μόριο για την σωστή λειτουργία και τοποθέτηση του TLR4 στην πλασματική μεμβράνη, η MD-2, μια βοηθητική πρωτεΐνη 25 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή, η οποία αλληλεπιδρά κατευθείαν με τον TLR4, πιστεύεται ότι βοηθά στην σταθεροποίηση του συμπλόκου του υποδοχέα. Έτσι η αναγνώριση του LPS στα μακροφάγα, γίνεται από ένα σύμπλοκο της πλασματικής μεμβράνης που αποτελείται από 3 τουλάχιστον πρωτεΐνες : TLR4, MD-2 και CD14 (Εικ. 4.3)



**Εικ. 4.3.** Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου του υποδοχέα του LPS στα μακροφάγα και τα Β-λεμφοκύτταρα. Το εκκρινόμενο μόριο MD-2 απαιτείται για την σταθεροποίηση του TLR4 στην πλασματική μεμβράνη στα μακροφάγα. Το CD14 απαιτείται για την πρόσδεση του LPS στο κύτταρο.

Με την πρόσδεση του LPS στο σύμπλοκο αυτό, ξεκινά η διαβίβαση σήματος από τον TLR4. Το μονοπάτι μετάδοσης σήματος του υποδοχέα TLR4 είναι παρόμοιο με αυτό του IL-1R και αυτό γιατί όπως αναφέρθηκε διαθέτουν όμοια περιοχή σηματοδότησης την TIR. Τόσο ο TLR4 όσο και ο IL-1R στρατολογούν μια συνδετική πρωτεΐνη την MyD88 (112,113). Η MyD88 αποτελείται από μια αμινο-τελική περιοχή θανάτου και μια καρβοξυ-τελική περιοχή που προσδένεται στην περιοχή TIR του TLR4. Η αμινο-τελική περιοχή της MyD88 αλληλεπιδρά με την αντίστοιχη περιοχή της πρωτεϊνικής κινάσης IRAK (IL-1R associated kinase), προσελκύνοντας την στον υποδοχέα γεγονός που προκαλεί τελικά την αυτοφωσφορυλίωσή της. Η φωσφορυλιωμένη IRAK με την σειρά της δημιουργεί ένα σύμπλοκο με μια συνδετική πρωτεΐνη την TRAF6, οδηγώντας στον ολιγομερισμό της. Με τον ολιγομερισμό αυτό ενεργοποιείται η Jnk και η TAK-1 μέλος της οικογένειας των MAP κινασών. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση των IKKs κινασών IKK1 και IKK2 (114), που με την σειρά τους φωσφορυλιώνουν την IκB και επάγουν την αποδιάταξη της, ελευθερώνοντας έτσι τον NF-κB, ο οποίος είναι πια έτοιμος να μεταφερθεί στον πυρήνα, όπου συνεργάζεται με άλλους παράγοντες, όπως τον PU.1 και τον CREB για να επάγουν την έκφραση μιας μεγάλης γκάμας γονιδίων (115). Τέλος αξίζει να αναφερθεί, ότι η περιοχή TIR του υποδοχέα TLR4 είναι πάρα πολύ ισχυρή και ενεργοποίηση μόνο 10 υποδοχέων ανά κύτταρο αρκεί για μια αποτελεσματική διαβίβαση σήματος. (Εικ. 4.4)

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταβίβαση σήματος από το LPS. Σε αυτήν την διαδικασία έχουν ρόλο διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες όπως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και διάφορες ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), φαίνεται ότι ενεργοποιούνται κατά την επαγωγή της παραγωγής κυτοκινών από τα μονοκύτταρα. Η αναστολή της PKA οδηγεί στην ελάττωση της παραγωγής IL-6, ενώ η αναστολή της PKC οδηγεί σε ελάττωση του TNF-α. Το LPS επίσης, έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί τις ERK1/ERK2 και p38 MAPK (mitogen activated protein kinase), οι οποίες ρυθμίζουν την παραγωγή των κυτοκινών τόσο στο επίπεδο μεταγραφής, όσο και στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

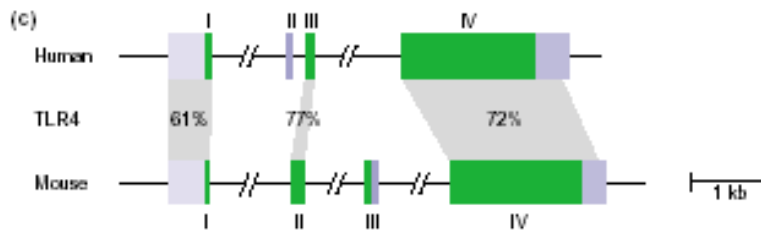


**Εικ. 4.4.** Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού διαβίβασης σήματος του TLR4

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, τα κύτταρα που εκφράζουν τον TLR4, τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ποντίκια, είναι κυρίως τα κύτταρα της μυελώδους σειράς (μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά). Ο υποκινητής του γονιδίου του TLR4 έχει υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ ανθρώπων και ποντικών (Εικ. 4.5) Έτσι και στους δύο, υπάρχουν πολλές αλληλουχίες πλούσιες σε πουρίνες, οι οποίες αναγνωρίζονται από τον ειδικό μυελώδη μεταγραφικό παράγοντα PU.1, ενώ δεν υπάρχει πλαίσιο TATA (116).

Ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας PU.1, ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Ets. Εκφράζεται στα αιματοποιητικά κύτταρα και είναι απαραίτητος για την για την ωρίμανση και την ανάπτυξη των μυελοειδών κυττάρων και την διαφοροποίηση των μακροφάγων. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός, ότι ποντίκια ανέκανα να παράγουν PU.1, έχουν παντελή έλλειψη μακροφάγων. Ο PU.1 είναι επίσης σημαντικός για την διαφοροποίηση και ωρίμανση των οστεοκλαστών. Είναι παρών στη μικρογλία, όπου τα επίπεδά του αυξάνονται σημαντικά κατά την διάρκεια ισχαιμικού

τραυματισμού. Συνεπώς ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1, είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση και ανάπτυξη των μακροφάγων. Έχει αναφερθεί, ότι συμμετέχει στην ανοσορύθμιση αφού επάγει την έκφραση του υποδοχέα  $\mu$  των οπιοειδών στα μακροφάγα.



**Εικ. 4.5 Σχηματική αναπαράσταση του υποκινητή του TLR4 σε ποντίκι και άνθρωπο.** Στο σχήμα οι σκιασμένες περιοχές υποδηλώνουν τις ομόλογες περιοχές μεταξύ των δύο ειδών υποκινητών. Όπως διακρίνεται η ομολογία είναι πολύ υψηλή.

Σε ανθρώπινους ιστούς ο TLR4, εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και τον σπλήνα, ενώ στα ποντίκια το mRNA του TLR4 εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες, την καρδιά, τον σπλήνα, τους μύες, το ήπαρ και τα νεφρά, γεγονός που υποδεικνύει ότι η έκφραση στους ιστούς δεν είναι ίδια σε ποντίκια και σε ανθρώπους, παρόλο την ομολογία του υποκινητή τους. Επιπρόσθετα τα γονίδια του TLR4 τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ποντίκια, απαιτούν διαφορετικά εξόνια που υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα (117).

Πολύ σημαντικό είναι επίσης το γεγονός, ότι με ενεργοποίηση από LPS υπάρχει διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης του TLR4 σε ανθρώπους και ποντίκια (118). Έτσι όταν ανθρώπινα μακροφάγα/μονοκύτταρα, ενεργοποιηθούν με LPS, αυξάνεται η έκφραση του TLR4. Ενώ αντίθετα, το επίπεδο έκφρασης του TLR4 μειώνεται, όταν μακροφάγα από ποντίκια ενεργοποιηθούν από LPS (119,120). Μια πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια μετα-μεταγραφική αστάθεια του mRNA του TLR4 από ποντίκια (121). Αλλαγές στη σταθερότητα του mRNA δεν έχουν ωστόσο παρατηρηθεί σε γονίδια άλλων TLRs.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## **2.1 Βιολογικά Υλικά**

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα βιολογικά υλικά: (α) λιποπολυσακχαρίδη κυτταρικού τοιχώματος E.Coli, (β) η κυτταρική σειρά μυελώματος ποντικού Raw 264.7 και (γ) η ανθρώπινη σειρά μονοκυττάρων THP-1

### **2.1.1 Λιποπολυσακχαρίδη**

Χρησιμοποιήθηκε ένα είδος λιποπολυσακχαρίδης η οποία αγοράστηκε από τη Sigma: λιποπολυσακχαρίδη κυτταρικού τοιχώματος E.coli.

### **2.1.2 Κυτταρική σειρά μονόκυττάρων/μακροφάγων ποντικού (Raw 264.7)**

Η κυτταρική σειρά Raw 264.7 είναι μια μονοκυτταρική/μακροφαγική σειρά που προέρχεται από έναν όγκο που αναπτύχθηκε σε άρρενες ποντικούς από τον ιό λευχαιμίας Abelson (122). Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την ATCC (Αρ. Καταλόγου TIB-71). Τα κύτταρα Raw 264.7 παράγουν λυσοζύμη και έχουν υποδοχείς για το συμπλήρωμα. Δεν διαθέτουν ανοσοσφαιρίνη επιφανείας (sIg-), Ia (Ia-) και Thy-1.2 (Thy-1.2-). Τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ενδοκυτταρώνουν ουδέτερα ερυθρά και να φαγοκυτταρώνουν σφαιρίδια latex και zymosan. Τέλος μπορούν να καταστρέφουν με αντιγονοεξαρτώμενο τρόπο ερυθρά πρόβατου και καρκινικά κύτταρα (122).

### **2.1.3 Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1**

Η κυτταρική σειρά THP-1 είναι μια μονοκυτταρική σειρά που προέρχεται από όγκο που αναπτύχθηκε σε άρρενες οργανισμούς από τον ιό της λευχαιμίας (123). Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την ATCC (Αρ. Καταλόγου TIB-202). Τα κύτταρα THP-1 είναι φαγοκυτταρικά (και για σφαιρίδια latex και για ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα). Δεν διαθέτουν κυτταροπλασματική ούτε ανοσοσφαιρίνη επιφάνειας. Η διαφοροποίηση τους μπορεί να επιτευχθεί με τον εστέρα της φορβόλης: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA).



## **2.2 Μέθοδοι**

### **2.2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών**

#### **2.2.2 Κυτταρική σειρά μυελώματος ποντικού RAW 264.7**

##### **Υλικά**

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Flow Labs, Scotland)

Ορός εμβρύου βοός: FCS(GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO-BRL Co,MD ,USA)

L-γλουταμίνη: L-glutamine (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus,Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή: Neubauer και Malassez

#### **2.2.3 Κυτταρική σειρά ανθρώπινων μονοκυττάρων THP-1**

##### **Υλικά**

RPMI (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Ορός εμβρύου βοός: FCS (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Πενικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin (GIBCO-BRL Co,MD ,USA)

L-γλουταμίνη: L-glutamine (GIBCO-BRL Co,MD, USA)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός: (Olympus,Japan)

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή: Neubauer και Malassez

## **Μέθοδος**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, 95% αέρα και υγρασία 100%. Το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας περιείχε DMEM (κύτταρα RAW) ή RPMI (κύτταρα THP-1), 10% ορό εμβρύου βοός, 4 μM L-γλουταμίνη και 1% αντιβιοτικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 100 IU/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Το υλικό των καλλιιεργειών ανανεωνόταν ανά 48 ώρες. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνταν όταν έφταναν 80% πυκνότητα. Για τα μεν RAW Επειδή αναπτύσσουν ισχυρούς δεσμούς με το πλαστικό με αποτέλεσμα να κολλάνε καλά, τα κύτταρα απομονώνονται από το πλαστικό με ξύσιμο. Ενώ αντίθετα επειδή τα THP-1 στην πληθώρα τους επιπλέουν στην φλάσκα, τα κύτταρα διαχωρίζονται με φυγοκέντρωση. Ακολούθως μικρή ποσότητα του ανωτέρω διαλύματος ελαμβάνετο για προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων ανά ml θρεπτικού υλικού. Ο προσδιορισμός πραγματοποιούνταν με την μέθοδο αιματοκοτταρομετρίας (με πλάκα Neubauer ή Malassez) και με τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x. Τα ληφθέντα κύτταρα τοποθετούνταν σε κατάλληλη συγκέντρωση στα αντίστοιχα πλαστικά καλλιιεργειών σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Το θρεπτικό υλικό αντικαθίστατο με θρεπτικό υλικό πειραμάτων.

### **2.3 Απομόνωση mRNA**

#### **Υλικά**

Trizol: θειοκυανική γουανιδίνη (Tri reagent<sup>TM</sup>, Sigma, USA)

Χλωροφόρμιο (Sigma, USA)

Ισοπροπανόλη (Merck, Γερμανία)

75% αιθανόλη

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC)

## Μέθοδος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του mRNA αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου των Chomczynski and Sacchi (124). Προστέθηκε 1 ml Trizol/10<sup>6</sup> κύτταρα και ακολούθησε ανάδευση ώστε να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων. Τα δείγματα να παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min για να επιτευχθεί πλήρης αποσύζευξη των νουκλεοπρωτεϊνών. Ακολούθως προστέθηκε 0.2ml χλωροφορμίου ανά ml Trizol, το μείγμα αναδεύτηκε έντονα για 15 sec και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2-15 min. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000 g για 15 min στους 4 °C. Με την φυγοκέντρηση το δείγμα διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: μια ερυθρή φάση στην οποία περιέχεται η πρωτεΐνη, μία διάμεση φάση στην οποία περιέχεται το DNA και μία υδατική φάση στην οποία περιέχεται το RNA. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και αναμείχθηκε με 0.5 ml ισοπροπανόλης ανά ml Trizol. Το μείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min και ακολούθως φυγοκεντρήθηκε σε 12.000 g για 10 min στους 4 °C. Με τη διαδικασία αυτή το RNA κατακρημνίζεται σχηματίζοντας ένα ίζημα στον πυθμένα του σωληναρίου. Ακολούθως αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη 1 ml αιθανόλης ανά ml Trizol. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 7.500 g για 5 min στους 4 °C και το RNA διαλύθηκε σε νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα. Η ποιότητα του ελέγχθηκε φωτομετρικά (260/280 nm).

### **2.3.1 Μέθοδος εκλεκτικής επέκτασης του DNA με ανάστροφο γονιδιακό ανασυνδυασμό (RT-PCR)**

Η αντίδραση PCR έχει σαν αποτέλεσμα την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Στην RT-PCR το RNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την σύνθεση του DNA-στόχου, προέρχεται από την αντίστροφη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA). Έτσι η μέθοδος χωρίζεται σε δύο μέρη: α) στην

μετατροπή του mRNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και β) στην σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένης περιοχής του DNA.

### **2.3.2 Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

#### **Υλικά**

Δείγμα ολικού RNA (1 - 5 µg)

Τυχαία εξαμερή: random hexamers (Life Technologies, USA)

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC-H<sub>2</sub>O)

Ρυθμιστικό διάλυμα για cDNA: 5X PCR buffer (Life Technologies, USA)

Μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTP mix 10 mM (Life Technologies, USA)

Διθειοθρεϊτόλη: DTT, 0.1 M (Sigma, USA)

Διάλυμα αναστολέων RNασών: RNaseOUT, 40 U/µL (Life Technologies, USA)

Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης: Thermoscript RT (Life Technologies, USA)

#### **Μέθοδος**

Η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA προς συμπληρωματικό DNA πραγματοποιείται με το THERMOSCRIPT RT-PCR System (Gibco,BRL). Προς τούτο 1 µg ολικού RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για τη σύνθεση του cDNA. Αρχικά προετοιμάζεται σε ένα σωληνάριο τύπου erppendorf απαλλαγμένο από DNάσες (Dnase-free), ένα μείγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει: 1 µg ολικού RNA, εκκινητή (primer) όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή και DEPC-H<sub>2</sub>O σε ποσότητα τέτοια ώστε ο τελικός όγκος του μείγματος να είναι 10 µl. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή με την επώαση του μείγματος για 5 sec στους 65°C σε θερμικό κυκλοποιητή και στη συνέχεια με ψύξη του στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σχηματισμού του cDNA. Κατόπιν αφού αναδευθεί το

ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφής για 5 sec σε κυκλικό αναδευτήρα, προετοιμάζεται το κύριο μείγμα της αντίδρασης σε τελικό όγκο 10 μl και το οποίο περιλαμβάνει: 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος για cDNA (5x), 1 μl διθειοθρεϊτόλης DTT, 1 μl RNασών (RNase OUT, 40 U/μl.), 1 μl DEPC-H<sub>2</sub>O, 2 μl. μείγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοζιτών (dNTP mix, 10 mM), 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης (THERMOSCRIPT RT, 5 u/μl). Το παραπάνω μείγμα προστίθεται στο αρχικό και στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση του δείγματος για 60 min στους 50 °C, οπότε υβριδοποιείται ο εκκινητής και δρα η αντίστροφη μεταγραφάση. Η αντίδραση τερματίζεται με επώαση του δείγματος για 5 min στους 85°C όπου αποδιατάσσονται τα υβρίδια και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είτε φυλάσσεται στους -20°C.

### ***2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)***

#### **Υλικά**

Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA: 10X PCR buffer (Life Technologies, USA)

25mM MgCl<sub>2</sub> (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Συμπληρωματικό DNA

Πρόσθιος εκκινητής: sense oligonucleotides

Ανάστροφος εκκινητής: antisense oligonucleotides

Ένζυμο πολυμεράσης: Taq DNA polymerase, 5 u/μl (GIBCO-BRL, Co, MD, USA)

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC)

θερμικός κυκλοποιητής (Thermal cycler): DNA engine (MJ Research)

Για κάθε δείγμα απαιτούνται οι εξής αναλογίες:

15,08 μl DEPC-treated water

2 μl 10X PCR BUFFER

0,6 μl MgCl<sub>2</sub>

0,4 μl dNTP mix

0,4 μl sense primer

0,4 μl antisense primer  
0,12 μl Platinum Taq Polymerase  
1 μl cDNA (από την RT-αντίδραση)

## **Μέθοδος**

Ο πολλαπλασιασμός ενός συγκεκριμένου τμήματος του τμήματος του cDNA πραγματοποιείται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η αντίδραση PCR εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του με σκοπό την *in vitro* ενίσχυση της επιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Η DNA-πολυμεράση χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια μπορούν να παραχθούν από δίκλιωνα μόρια DNA όταν αυτά θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, οπότε και αποχωρίζονται. Η DNA-πολυμεράση απαιτεί επίσης την παρουσία ενός μικρού τμήματος δίκλωνου DNA για την έναρξη της σύνθεσης. Έτσι το σημείο έναρξης της σύνθεσης μπορεί να καθοριστεί με τη χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδικού μορίου, του εκκινητή, που συνδέεται με τη μήτρα σε αυτό ακριβώς το σημείο. Και οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για τη σύνθεση DNA. Για κάθε αντίδραση PCR επιλέγονται εκκινητές παρακείμενοι της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί. Κάθε επανάληψη της σύνθεσης νέου κλώνου αποτελεί έναν κύκλο ενίσχυσης, ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος αποτελεί εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο ενίσχυσης. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται ξανά για να αποχωριστούν παλιοί και νέοι κλώνοι του DNA και επαναλαμβάνεται ο κύκλος υβριδοποίησης των εκκινητών, σύνθεσης DNA και αποχωρισμού των κλώνων. Το cDNA επωάζεται παρουσία των εκκινητών για το γονίδιο που θέλουμε να ενισχύσουμε, μίγματος dNTPs, διαλύματος MgCl<sub>2</sub>, διαλύματος PCR και πολυμεράσης. Η επώαση γίνεται σε συσκευή PCR στους 57°C για 37 ή 35 κύκλους.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά ήταν:

**Για την ακτίνη ποντικού:** sense, 5'-TCA GAA GAA CTC CTA TGT GG-3' και antisense, 5'-TCT CTT TGA TGT CAC GCA CG-3' δίνει προϊόν 499bp

**Για τον mTLR4:** sense, 5'- ACC AAT GCA TGG ATC AGA AA -3' και antisense, 5'- GTC TCC ACA GCC ACC AGA TT -3' δίνει προϊόν 295bp

**Για την β2-μικροσφαιρίνη:** sense, 5'- GTG CTC GCG CTA CTC TCT CT -3' και antisense, 5'- TCA ATG TCGGAT GGA TGA AA -3'

**Για τον human TLR4 :** sense, 5'- GTG CTC GCG CTA CTC TCT CT -3' και antisense, 5'- CAC AGC CAC CAG CTT CTG TA -3'

## ΣΥΝΘΗΚΕΣ

### mTLR4

94 C<sup>0</sup> για 5 min  
94 C<sup>0</sup> για 40 sec  
53 C<sup>0</sup> για 40 sec  
72 C<sup>0</sup> για 1 min  
72 C<sup>0</sup> για 10 min

### Actin

94 C<sup>0</sup> για 5 min  
94 C<sup>0</sup> για 0,40 sec  
57C<sup>0</sup> για 0,40 sec  
72C<sup>0</sup> για 1 min  
72C<sup>0</sup> για 10 min

### hTLR4

94 C<sup>0</sup> για 2.30 min  
94 C<sup>0</sup> για 30 sec  
54 C<sup>0</sup> για 30 sec  
72 C<sup>0</sup> για 30 sec  
72 C<sup>0</sup> για 7 min

### b2M

94 C<sup>0</sup> για 2.30 min  
94 C<sup>0</sup> για 30 sec  
58 C<sup>0</sup> για 30 sec  
72 C<sup>0</sup> για 30 sec  
72C<sup>0</sup> για 7 min

### **2.3.4 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη**

#### **Υλικά**

Αγαρόζη (Sigma, USA)

Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma, USA)

TAE: Tris 10 mM, EDTA 10 mM, οξικό Ca 5 mM, NaCl 10 mM

Διάλυμα φόρτωσης

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

#### **Μέθοδος**

##### **Προετοιμασία της πηκτικής αγαρόζης**

Διαλύθηκαν 2.5 g αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος TAE με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι 50-60 °C ακολούθως προστέθηκαν σ' αυτό 5 ml βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/ml. Το μείγμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει.

##### **Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση**

Σε κάθε δείγμα προστίθεται 4 μl Loading buffer. Πρίν την τοποθέτηση των δειγμάτων η πηκτική τοποθετήθηκε για 5 min σε πεδίο 5 V/cm, ακολούθησε η τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγάδια και η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε 3V/cm σε 1x διαλύματος TAE. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των γονιδίων είναι δυνατός με τη χρήση δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα δείγματα. Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται από το DNA το οποίο γίνεται ορατό με συσκευή υπεριώδους φωτός.



## 2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR)

### Συσκευή

Σύστημα ανίχνευσης αλληλουχίας: ABI PRISM 7000 (AB\_Applied Biosystems, ΗΠΑ)

### Υλικά

Ρυθμιστικό διάλυμα σύνθεσης cDNA: 10X PCR buffer (Life Technologies, USA)

25mM MgCl<sub>2</sub> (GIBCO-BRL Co, MD, USA)

Συμπληρωματικό DNA

Πρόσθιος εκκινητής: sense oligonucleotides

Ανάστροφος εκκινητής: antisense oligonucleotides

Ένζυμο πολυμεράσης: Taq DNA polymerase, 5 u/μl (GIBCO-BRL, Co, MD, USA)

Νερό κατεργασμένο με διαιθυλπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC)

Χρωστική φθορισμού: SYBR Green

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η καλύτερη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση του mRNA, είναι η εκλεκτική επέκταση του DNA με ανάστροφο γονιδιακό ανασυνδυασμό (RT-PCR). Παρόλα αυτά, ακόμα και αυτή η μέθοδος παρουσιάζει πολυπλοκότητα αφού δεν πραγματοποιείται σε ένα στάδιο και για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA απαιτείται η χρήση μεθόδων ηλεκτροφόρησης. Μια νέα μέθοδος πολύ πιο απλή και αξιόπιστη είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού σε πραγματικό χρόνο (real time PCR), με τη χρήση χρωστικών που φθορίζουν, και αυτό γιατί όλα τα επιμέρους στάδια του πολυμερισμού και της ποσοτικοποίησης, διεξάγονται στον θερμικό κυκλοποιητή, ενώ τα αποτελέσματα ανιχνεύονται και μπορούν να ανλυθούν ανά πάσα στιγμή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Για την ανίχνευση του DNA διπλής έλικας (dsDNA) που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR Green 1. Η SYBR Green δεσμεύεται μη ειδικά πάνω στο dsDNA, με αποτέλεσμα να εκπέμπει ακτινοβολία, ενώ αντίθετα η μη δεσμευμένη χρωστική δεν εκπέμπει. Κατά τη διάρκεια λοιπόν της επέκτασης του DNA, όλο και περισσότερη χρωστική προσδένεται με αποτέλεσμα την αύξηση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας.

Το ABI PRISM 7000, περιέχει έναν θερμικό κυκλοποιητή 96 θέσεων. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, φως από λάμπα αλογόνου πέφτει πάνω στην πλάκα των δειγμάτων, το φως διαπερνά τα δείγματα και διεγείρει την προσδεδεμένη χρωστική (SYBR-green), με αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας στην περιοχή των 500-660 nm. Η ακτινοβολία αυτή μεταφέρεται με ένα σύστημα φακών και φίλτρων στην ειδική κάμερα, όπου και καταγράφεται. Το software του ABI PRISM 7000 συγκεντρώνει τα σήματα από την ακτινοβολία και τα μετρέπει με αλγόριθμους, παρέχοντάς μας τα τελικά ποσοτικά αποτελέσματα

### **Μέθοδος**

Για κάθε δείγμα απαιτούνται οι εξής αναλογίες:

14,28 μl DEPC-treated water

2 μl 10X PCR BUFFER

0,4 μl MgCl<sub>2</sub>

0,4 μl dNTP mix

0,4 μl sense primer

0,4 μl antisense primer

0,12 μl Platinum Taq Polumerase

1 μl χρωστική SYBR Green

1 μl cDNA (από την RT-αντίδραση)

Τα δείγματα τοποθετούνται στο μηχάνημα του real time οπότε και ακολουθούνται οι εξής επώσεις για 45 κύκλους: 94 C<sup>0</sup> για 45 sec  
53 C<sup>0</sup> για 45 sec  
72 C<sup>0</sup> για 45 sec

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά ήταν:

**Για την β2-μικροσφαιρίνη:** sense, 5'- GTG CTC GCG CTA CTC TCT CT -3' και antisense, 5'- TCA ATG TCGGAT GGA TGA AA -3'

**Για τον human TLR4 :** sense, 5'- GTG CTC GCG CTA CTC TCT CT -3' και antisense, 5'- CAC AGC CAC CAG CTT CTG TA -3'

## 2.5 Μελέτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

### Υλικά

HEPES: υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ

KCl: χλωριούχο κάλιο

Γλυκερόλη

NaCl; χλωριούχο νάτριο

EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

DTT: διθειοθρεϊτόλη

Tris: τρις-υδροξυ μεθυλ αμινομεθάνιο

ZnSO<sub>4</sub>: θειικός ψευδάργυρος

[ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]CTP: σημασμένη με <sup>32</sup>P τριφωσφορική κυτοσίνη

poly dI-dC: πολυδοξυ-ινοσίνη/δεοξυκυτιδίνη

Αλληλουχία PU.1:

Sense: GGC TTT CAC TTC CT

Antisens: AAG GGT GAG AGG AAG TGA AAG

Αντίσωμα PU.1 (SP-1) (T-21) (Santa Cruz Biotechnology, ΗΠΑ)

### Διαλύματα

**Διάλυμα λύσης:** περιέχει 0.6% NP40, 10 mM HEPES, 10 mM KCl και 0.2 mM EDTA

**Διάλυμα απομόνωσης νουκλεοπρωτεϊνών:** περιέχει 20 mM HEPES, 25% γλυκερόλης, 0.4 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5mM DTT, και πλήρεις αναστολείς πρωτεϊνασών

**Διάλυμα σήμανσης:** για την παρασκευή του διαλύματος σήμανσης 4 mM Tris και 80 mM NaCl διαλύονται σε νερό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.5 και προστίθενται 0.5 mM ZnSO<sub>4</sub>, 5% γλυκερόλης, 0.5% DTT, και poly(dI-dC) (0.2 mg/ml).

## **Μέθοδος**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέσα σε θρεπτικό υλικό DMEM που περιέχει ορρό (FCS 10%) για δύο μέρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό του πειράματος (DMEM χωρίς ορρό) για 12 ώρες και αμέσως μετά τα κύτταρα εκτέθηκαν στις προς μελέτη ουσίες για 45 λεπτά.

### **2.5.1 Απομόνωση πυρηνικών εκχυλισμάτων**

Στο τέλος των πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500x g. Ακολούθως τα κύτταρα λύθηκαν μέσα σε 100 μl διαλύματος λύσης. Οι πυρήνες απομονώθηκαν με φυγοκέντρωση στις 4000x g και στο ίζημα προστέθηκαν 40 μl διαλύματος απομόνωσης νουκλεοπρωτεϊνών. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 45 λεπτά με ενδιάμεση έντονη ανάδευση. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν με φυγοκέντρωση στις 14000x g για 30 λεπτά. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford.

### **2.5.2 Μελέτες σύνδεσης νουκλεοπρωτεϊνών (DNA-Protein Binding Studies)**

Ολιγονουκλεοτίδια διπλής έλικας που αντιστοιχούν στην θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 σημάνθηκαν με [ $\gamma$ - $^{32}$ P]CTP. Ίση ποσότητα πυρηνικών εκχυλισμάτων (7 μg πρωτεΐνης) επώαστηκαν σε διάλυμα σύνδεσης τελικού όγκου 20 μl το οποίο περιείχε και 2 μl ραδιοσημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου PU.1, σε θερμοκρασία 20°C για 15 λεπτά. Για τον ανταγωνισμό της σήμανσης χρησιμοποιήθηκε 100 φορές μεγαλύτερη ποσότητα μη σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων PU.1, επίσης σε ένα δείγμα προστέθηκε αντίσωμα PU.1, τα οποία επώαστηκαν με το πυρηνικό εκχύλισμα για 10 λεπτά πριν την τοποθέτηση του σημασμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Στη συνέχεια το δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη πολυακρυλαμίδης 6% όπου διαχωρίστηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια στα οποία είχε προσδεθεί ο μεταγραφικός παράγοντας (συμπλέγματα DNA-πρωτεΐνης) από τα ολιγονουκλεοτίδια που παρέμειναν ελεύθερα. Η γέλη τοποθετήθηκε σε χαρτί whatmann, αφυδατώθηκε υπό κενό και εκτέθηκε σε αυτοραδιογραφία.

## 2.6 Μέθοδος μέτρησης ολικών πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα (Bradford)

### Υλικά

Μικροπλάκες 96-οπών (Costar, ΗΠΑ)

BSA (Sigma, ΗΠΑ)

Coomassie Brilliant Blue (Merck, Γερμανία)

Φωτόμετρο ELISA (Anthos, Reader 2001)

### Διαλύματα

**Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός:** Η αλβουμίνη διαλύεται σε H<sub>2</sub>O σε συγκέντρωση 0,1 mg/ml.

### Μέθοδος

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνών να συνδέονται με χρωστικές όπως η Coomassie Brilliant Blue. Η Coomassie Brilliant Blue συνδέεται με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των υπολειμμάτων των αμινοξέων της πολυπεπτικής αλυσίδας. Η ελεύθερη μορφή της χρωστικής έχει κόκκινο χρώμα, που μετά την σύνδεση της με την πρωτεΐνη, μετατρέπεται σε μπλε. Η ένταση του χρώματος μετριέται φωτομετρικά στα 595 nm. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Τα δείγματα προετοιμάζονται όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.4. Από το πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης προετοιμάζονται 6 διαφορετικά διαλύματα συγκεντρώσεων: 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 μg/ml. Αρχικά προστίθονται 100 μl χρωστικής σε κάθε πηγάδι και στη συνέχεια 1 μl από κάθε δείγμα και πρότυπο δείγμα, αναδεύονται και μετρούνται στο φωτόμετρο. Από τις απορροφήσεις των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, απ' όπου υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων.

## **2.7 Συλλογή δείγματος και Παρασκευή κυτταρικού εκχυλίσματος για μέτρηση πρωτεϊνών με ανοσολογικό προσδιορισμό**

### **Υλικά**

SDS (Serva, Γερμανία)

Tris (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)

Γλυκερόλη, HCl, Na<sub>2</sub>F, PMSF (Sigma, ΗΠΑ)

Διθειοτρεϊτόλη: DTT (Sigma, ΗΠΑ)

### **Διαλύματα**

**Διάλυμα λύσης:** 62.5 mM Tris διαλύονται σε H<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH στο 6,8 και προστίθενται 2% SDS και 10% γλυκερόλης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C. Πριν την χρήση προστίθενται 10μg/ml PMSF, 0.5mM DTT και 50mM Na<sub>2</sub>F.

### **Μέθοδος**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέσα σε θρεπτικό υλικό DMEM που περιέχει ορρό (FCS 10%) για δύο μέρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό του πειράματος (DMEM χωρίς ορρό) για 12 ώρες και αμέσως μετά τα κύτταρα εκτέθηκαν στις προς μελέτη ουσίες για 1 ώρα. Στο τέλος των πειραμάτων τα κύτταρα μαζεύονται από τις φλάσκες και φυγοκεντρούνται. Τα κύτταρα διαλύονται σε 100 μl διαλύματος λύσης, η λύση ολοκληρώνεται με κατεργασία των δειγμάτων σε υπερήχους για 5 δευτερόλεπτα σε πάγο. Για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12.000 στροφές για 15 λεπτά. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C.

## 2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε συνθήκες αποδιάταξης

### Υλικά

Ακρυλαμίδιο (Serva, Γερμανία)  
Bis acrylamide (Promega, ΗΠΑ)  
SDS (Serva, Γερμανία)  
Γλυκερόλη, Βουτανόλη (Mallinckrodt, ΗΠΑ)  
Tris (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)  
β-μερκαπτοαιθανόλη (sigma, ΗΠΑ)  
TEMED (Serva, Γερμανία)  
Γλυκίνη (Gibco, ΗΠΑ)  
Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Biorad, ΗΠΑ)  
Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Hoefler, ΗΠΑ)

### Διαλύματα

**Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%:** Ακρυλαμίδιο, δισ-ακρυλαμίδιο

**Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού:** 18,6 gr Tris, H<sub>2</sub>O, pH 8.8

**Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης:** 12,1 gr Tris, H<sub>2</sub>O, pH 6.8

**Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης:** Tris, H<sub>2</sub>O, pH 6.8, SDS 10%, β-μερκαπτοαιθανόλη, γλυκερόλη, μπλε βρωμοφαινόλης

**Πήκτωμα διαχωρισμού 12%:** ακρυλαμίδη, ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού, APS, TEMED, SDS

**Πήκτωμα επιστοίβαξης:** ακρυλαμίδη, ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης APS, TEMED, SDS

**Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:** Tris, H<sub>2</sub>O, pH 6.8, γλυκίνη, SDS

## **Μέθοδος**

### **2.8.1 Προετοιμασία πηκτής πολυακρυλαμίδιου 30%**

Παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού, τοποθετείται στη συσκευή και αφήνεται να πήξει. Έπειτα παρασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβαξης και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού. Αφήνεται να πήξει και στη συνέχεια προετοιμάζονται τα δείγματα.

### **2.8.2 Προετοιμασία δειγμάτων**

Ποσότητα δείγματος, που αντιστοιχεί περίπου σε 10mg πρωτεΐνης και παρασκευάστηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως, αναμιγνύεται με ίση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και θερμαίνεται στους 100°C για 2 λεπτά. Η παρουσία του ανιονικού απορρυπαντικού SDS στο ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης, σε συνδυασμό με τη θέρμανση, βοηθάει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπίδια δεσμεύουν SDS και φορτίζονται αρνητικά έτσι ώστε, με την εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος, οι πρωτεΐνες να κινηθούν όλες προς το θετικό πόλο. Έπειτα από τη θέρμανση τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 3 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται. Ακολουθεί ηλεκτοφόρηση.

### **2.8.3 Ανοσοαποτύπωση (Western Blotting)**

#### **Υλικά**

Μεθανόλη, Tween-20 (Merck, Γερμανία)

NaCl (Sigma, ΗΠΑ)

Tris (Bio-Rad Labs, ΗΠΑ)

Χαρτί Whatmann

Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (LKB, Bromma, ΗΠΑ)

Πρώτα αντισώματα: Αναπτυγμένα σε κουνέλι πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια στις φωσφορυλιωμένες μορφές των πρωτεϊνών p-PKC (pan), p-CREB (Cell Signaling, ΗΠΑ)



Δεύτερα αντισώματα: Πολυκλωνικά αντισώματα κατά των IgG κουνελιού (Immunotech, Γαλλία), συνδεδεμένα με υπεροξειδάση του ραπανιού (HRP).

Σύστημα ανάπτυξης χημειοφωταύγειας για ανοσοαποτύπωση (NEN, ΗΠΑ)

Φιλμ εμφάνισης: Kodak

Συσκευή εμφάνισης φιλμ Agfa

### **Διαλύματα**

**Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών:** διάλυμα ηλεκτροφόρησης με μεθανόλη

**TBS-T:** NaCl, Tris, H<sub>2</sub>O pH 7.6, Tween-20

**Διάλυμα γάλακτος:** Σκόνη γάλακτος, TBS-T

### **Μέθοδος**

#### **Διαδικασία μεταφοράς**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από τις πηκτές πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε συσκευή με εφαρμογή ρεύματος 0,8A για 1,5 ώρα.

#### **2.8.4 Ανοσοαποτύπωση**

Για την ανοσοαποτύπωση, η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε διάλυμα γάλακτος με συνεχόμενη ανακίνηση, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισώματων. Έπειτα οι μεμβράνες επωάζονται με 1<sup>ο</sup> αντίσωμα κατά της πρωτεΐνης που μελετάμε, για ένα βράδυ, οπότε δημιουργείται σταθερό σύμπλοκο μεταξύ της πρωτεΐνης και του 1<sup>ου</sup> αντισώματος. Έπειτα το σύμπλοκο συνδέεται με ένα 2<sup>ο</sup> αντίσωμα, που είναι επιπλέον συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP). Το ένζυμο καταλύει την αντίδραση οξείδωσης της λουμινόλης με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός. Η εκπομπή φωτός αποτυπώνεται σε ακτινογραφικό φιλμ.

## 2.9 Προετοιμασία πλασμιδίου

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PGL3-mTLR4E, και για την διεξαγωγή των πειραμάτων διαμόλυνσης ήταν απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός του. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά το πλασμίδιο μεταφέρθηκε μέσα σε βακτήρια, τα οποία και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό LB Broth που περιείχε αμπικιλίνη, (το πλασμίδιο ήταν ανθεκτικό στην αμπικιλίνη, οπότε μόνο τα βακτήρια που περιείχαν το πλασμίδιο καταφέρνουν να επιβιώσουν. Στη συνέχεια ακολουθεί λύση των βακτηρίων, απομόνωση και καθαρισμός του βακτηρίου με τη διαδικασία mini ή midi prep, αναλόγως της ποσότητας των βακτηρίων που έχουν καλλιεργηθεί. Τέλος ταυτοποιείται η ύπαρξη του υποκινητή του γονιδίου mTLR4E μέσα στο πλασμίδιο που απομονώθηκε με πέψη με ειδικά περιοριστικά ένζυμα, και ανάλυση του προϊόντος της πέψης σε πηκτή αγαρόζης 1%.

### 2.9.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων (*Transformation*)- Καλλιέργεια βακτηρίων

#### Υλικά

Βακτήρια competent E. Coli

Stock πλασμιδίου PGL3-mTLR4E: ευγενική χορηγία καθηγητή M. Rehli

Tryptone (pancreatic digest of casein): Sigma Aldrich, ΗΠΑ

Yeast extract (Sigma Aldrich, ΗΠΑ)

Agar (Sigma Aldrich, ΗΠΑ)

NaCl (Sigma Aldrich, ΗΠΑ)

Αμπικιλίνη

Τριβλία petri

### **Διαλύματα**

**LB Broth** : 10gr Tryptone, 5gr yeast extract, 10gr NaCl και H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1lt

**LB Broth-Agar**: 10gr Tryptone, 5gr yeast extract, 10gr NaCl, 12gr agar και H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1lt

### **Μέθοδος**

Τα βακτήρια ξεπαγώνονται στον πάγο και ακολουθεί άμεση ανάμιξη 200μλ βακτηρίων με 0,5μλ πλασμιδίου. Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί shock των βακτηρίων με θερμότητα 42°C για 1λεπτό, ώστε να ανοίξουν τρύπες στην βακτηριακή μεμβράνη για να μπορέσει να εισέλθει το πλασμίδιο, και επαναφορά στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 900μλ διαλύματος LB, και το διάλυμα επωάζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37°C. Τέλος 300μλ δείγματος απλώνονται σε τριβλίο που περιέχει LB-αγαρ με αμπικιλίνη και αφήνεται 16 ώρες στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν αποικίες από βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο. Την επόμενη μέρα μια μοναδική βακτηριακή αποικία επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C, σε καλλιέργεια 3ml LB με αμπικιλίνη.

### **Mini prep (Απόδοση μέχρι 20μg DNA)**

#### **Υλικά**

70% Αιθανόλη

100% Αιθανόλη

### **Διαλύματα**

**Διάλυμα εναιώρησης κυττάρων (P1):** 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA

**Διάλυμα λύσης κυττάρων (P2):** 200mM NaOH, 1% SDS

**Διάλυμα ουδετεροποίησης (P3):** 3.1M οξικού καλίου (pH 5.5)

**Διάλυμα TE:** 10mM NaCl, 100mM Tris HCl (pH 8.5)

### **Μέθοδος**

Μεταφέρεται 1,5ml από την καλλιέργεια των 3ml και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται με 200μl P1, ακολουθεί προσθήκη 20μl P2 με ανάμιξη και προσθήκη 200μl P3 με ανάδευση και έπειτα επώαση για 5 λεπτά σε πάγο. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου. Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό δοχείο, όπου και προστίθεται ποσότητα αιθανόλης 100% δύο φορές του όγκου του. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί 10λεπτη φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα πλένεται με 500μl αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε κενό και επαναδιαλύεται με θέρμανση για 5 λεπτά σε 30μl T.E.

### **2.9.2 Πέψη πλασμιδίου**

#### **Υλικά**

Ένζυμο NcoI (New England Biolabs)

Ένζυμο NheI (New England Biolabs)

BSA (100μg/ml)

Διάλυμα 2 (New England Biolabs)

#### **Μέθοδος**

Ποσότητα 5μg πλασμιδίου PGL3 πέπτεται με τα περιοριστικά ένζυμα 1μl NcoI και 1μl NheI. Στο διάλυμα αυτό προστίθενται 2μl διαλύματος 2, 2μl BSA και 9μl H<sub>2</sub>O. Η αντίδραση αφήνεται να επωαστεί στους 37°C για 1,5 ώρα. Στη συνέχεια το προϊόν της πέψης αναλύεται σε πηκτή αгарόζης 1%. Αν διαπιστωθεί ότι όντως περιέχει την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει ακολουθεί η διαδικασία του midi prep, ώστε να

απομονώσουμε το πλασμίδιο μας σε μεγαλύτερη ποσότητα και να είναι ακόμα πιο καθαρό για να μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί για τις διαμολύνσεις.

### **2.9.3 *Midi Prep***

#### **Υλικά**

Αμπικιλίνη

Θρεπτικό LB Broth

Ισοπροπανόλη

70% αιθανόλη

Η διαδικασία του midi prep γίνεται με το ειδικό kit της Gibco BRL, το οποίο δίνει υψηλές ποσότητες ανάκτησης καθαρού DNA, εξαιτίας των διαλυμάτων που περιλαμβάνει και της ειδικής ιονοανταλλακτικής κολώνας με ρητίνη που περιέχει. Η κολώνα αυτή κατακρατεί τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του σκελετού του DNA, εξαιτίας της αλληλεπίδρασης τους με τις θετικές ομάδες της ρητίνης. Μετά από προσθήκη στο δείγμα αλκαλικών διαλυμάτων και SDS, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του πλασμιδιακού από το γενομικό DNA. Το δείγμα που περιέχει το πλασμιδιακό DNA φορτώνεται στην κολώνα και κάτω από τις συνθήκες του πειράματος το DNA κατακρατείται στην κολώνα, ενώ άλλες ουσίες, όπως το RNA, οι πρωτεΐνες και άλλες ακαθαρσίες, ξεπλένονται από αυτήν, γεγονός που αποδίδει πολύ καθαρό πλασμιδιακό DNA, έτοιμο για τις διαμολύνσεις.

### **Διαλύματα (όλα περιέχονται στο kit για midi prep της Gibco BRL, ΗΠΑ)**

**Διάλυμα εναιώρησης κυττάρων (E1):** 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA

**RNase A:** (20mg σε διάλυμα εναιώρησης)

**Διάλυμα λύσης κυττάρων (E2):** 200mM NaOH, 1% SDS

**Διάλυμα ουδετεροποίησης (E3):** 3.1M οξικού καλίου (pH 5.5)

**Διάλυμα εξισορρόπησης (E4):** 600mM NaCl, 100mM οξικό νάτριο (pH 5.0), 0.15% Triton

**Διάλυμα Πλύσης (E5):** 800mM NaCl, 100mM οξικού νατρίου (pH 5.0)

**Διάλυμα εξαγωγής (E6):** 1.25M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8.5)

**Διάλυμα TE:** 10mM NaCl, 100mM Tris HCl (pH 8.5)

### **Μέθοδος**

Από την καλλιέργεια των 3ml παίρνονται 50μλ και προστίθενται σε 100μλ θρεπτικού LB-Broth, που περιλαμβάνει 100μλ αμπικιλίνης. Η καλλιέργεια επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C σε shaker. Την επόμενη μέρα, ακολουθείται η διαδικασία του midi prep, σύμφωνα με το kit: Αρχικά 10ml E4 προστίθενται στην κολώνα ώστε να ισορροπηθεί, αφήνοντας όλο το διάλυμα να τρέξει με την βαρύτητα χωρίς επιβάρυνση. Τα βακτήρια φυγοκεντρώνονται στις 4000 στροφές για 15 λεπτά. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 4ml E1 (έχει προστεθεί και RNase A), ακολουθεί προσθήκη 4ml E2 με απαλή ανακίνηση, ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το μίγμα ουδετεροποιείται με προσθήκη 4ml E3 και ανάμιξη, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 4000 στροφές. Το υπερκείμενο φορτώνεται στην κολώνα, ενώ το έκλουσμα απορρίπτεται. Ακολουθεί πλύσιμο της κολώνας 2 φορές με 10ml E5 και το έκλουσμα απορρίπτεται. Στη συνέχεια γίνεται η έκλυση του πλασμιδιακού DNA από την κολώνα, με προσθήκη 5ml E6. Με την προσθήκη 3,5ml ισοπροπανόλης στο έκλουσμα και φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 30 λεπτά στους 4°C, επιτυγχάνεται η κατακρήμνιση του DNA. Όλο το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει με τον αέρα για 10 λεπτά. Τέλος το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μλ TE, ενώ τυχόν αδιάλυτα υπολείμματα απομακρύνονται με μια φυγοκέντρηση.

## 2.10 Διαμόλυνση κυττάρων (Transfections)

### Υλικά

Κυτταρική σειρά: RAW 264.7

Πλασμίδιο: PGL3-mTLR4E, ευγενική χορηγία του καθηγητή M. Rehli

Θρεπτικό υλικό: DMEM 10% FCS

Διάλυμα electroporation: Eppendorf Hypoosmolar Electroporation Buffer

Κυψελίδες: Eppendorf, 4mm πλάτος, 800μl όγκος

Όργανο για electroporation: Eppendorf

### Μέθοδος

Ποσότητα κυττάρων διαλύεται σε υπο-οσμωτικό διάλυμα Electroporation, με τελική συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  κυτταρα/ml. Προστίθεται ποσότητα πλασμιδίου 25μg/ml και το μίγμα αναμιγνύεται. Στη συνέχεια 800μl διαλύματος μεταφέρονται στις ειδικές κυψελίδες και ακολουθεί electroporation στα 570V με 4 παλμούς. Τα κύτταρα αφήνονται να ηρεμήσουν μέσα στις κυψελίδες για 5 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρονται σε πιάτα για καλλιέργειες με 5ml θρεπτικού υλικού DMEM, αφήνονται να ηρεμήσουν για 4 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα εκτίθενται στις προ μελέτη ουσίες για 16 ώρες.

## 2.11 Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης

Η λουσιφεράση πυγολαμπίδας είναι μια πρωτεΐνη 62 KDa, και είναι ενεργή σαν μονομερές. Είναι ένα από τα πιο δημοφιλή μόρια αναφοράς στην μοριακή βιολογία και βιοχημεία και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της δραστηριότητας των προαγωγέων. Είναι δηλαδή ένα αξιόπιστο αναφορικό γονίδιο που περιέχεται στους περισσότερους ξενιστές έκφρασης (vectors). Η κύρια χρήση της λουσιφεράσης είναι ο χαρακτηρισμός της γονιδιακής ρύθμισης –κυρίως ο μεταγραφικός έλεγχος- ο οποίος επιτυγχάνεται με τη

συσχέτιση των μεταβολών της δραστηριότητας της λουσιφεράσης με την ρύθμιση του προαγωγέα. Πιο αναλυτικά: κάτω από ιδανικές συνθήκες το μέγιστο φως που εκπέμπεται από μια αντίδραση είναι ανάλογο με την ποσότητα του λειτουργικού ενζύμου λουσιφεράσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση συσχέτιση της ποσότητας του εκπεμπόμενου φωτός από το δείγμα, με το ποσοστό μεταγραφής του γονιδίου που μελετάται κάθε φορά. Ουσιαστικά, η λουσιφεράση καταλύει την οξειδωτική καρβοξυλίωση της λουσιφερίνης, μια αντίδραση που εκπέμπει φως στα 562nm (125).

Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης στο εργαστήριο έγινε με την χρήση του ειδικού kit της BD Biosciences. Με την λύση των διαμολυσμένων κυττάρων (με το πλασμίδιο PGL3-mTLR4E), ελευθερώνεται η λουσιφεράση. Στη συνέχεια στα δείγματα αυτά προστίθεται το υπόστρωμα A, που είναι ένα ειδικό διάλυμα με ATP,  $Mg^{+2}$  και συνένζυμο A (CoA) και αμέσως μετά το υπόστρωμα B το οποίο περιέχει την λουσιφερίνη. Όταν προστίθεται η λουσιφερίνη σε κάποιο δείγμα που περιέχει λουσιφεράση, υπάρχει άμεση εκπομπή φωτός που φτάνει στο μέγιστο και μετά μειώνεται. Αυτή η γρήγορη μείωση προκαλείται από το προϊόν αυτής της αντίδρασης, την οξυλουσιφερίνη, η οποία αναστέλλει την δραστηριότητα της λουσιφεράσης. Για να υπάρχει λοιπόν συνεχής εκπομπή φωτός χρησιμοποιείται το CoA, το οποίο απομακρύνει την οξυλουσιφερίνη (126)

### **Υλικά**

Kit μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης (BD biosciences clontech, ΗΠΑ)

PBS (phosphate buffered saline) pH 7.4 χωρίς  $Mg^{+2}$  και  $Ca^{+2}$

Φυγόκεντρος

Λουμινόμετρο

### **Μέθοδος**

Απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα, στα οποία έγινε διαμόλυνση την προηγούμενη μέρα. Ακολουθεί πλύσιμο των κυττάρων με PBS για 2 φορές και έπειτα προσθήκη 200μλ διαλύματος για λύση των κυττάρων (περιλαμβάνεται στο kit) με ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν τα κύτταρα αποκολλώνται



με ξύσιμο και φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό στις 14000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα. Στη συνέχεια μεταφέρονται 100μλ υπερκειμένου σε ειδικό δοχείο, όπου και προστίθενται κατευθείαν 100μλ υποστρώματος A και 100μλ υποστρώματος B (περιέχονται στο kit). Τα δείγματα τοποθετούνται στην ειδική θέση του φθοριόμετρου και μετράται η εκπομπή του φωτός που αντιστοιχεί στην ενεργότητα της λουσιφεράσης.

## **2.12 Κυτταρομετρία ροής (FACS)**

### **Υλικά:**

Κυτταρική σειρά THP-1

Αντίσωμα hTLR4, προσδεμένο σε χρωστική PE (BD-pharmigen)

Αντίσωμα IgG1, προσδεμένο σε χρωστική PE (BD-pharmigen)

HAG (BD-pharmigen)

### **Διαλύματα**

**Διάλυμα πλύσεων:** PBS, FBS, Azide

**Διάλυμα επαναδιάλυσης κυττάρων:** PFA 2%

### **Μεθοδος**

Απαιτούνται 700000 ανθρώπινα μονοκύτταρα THP-1 για κάθε επίδραση που μελετάται. Τα κύτταρα αφήνονται να ηρεμήσουν για 2 ώρες και στη συνέχεια γίνονται οι διάφορες επιδράσεις των προ μελέτη ουσιών για 16 ώρες. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα μαζεύονται και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 1800 στροφές. Το ίζημα ξεπλένεται με PBS+FBS+Azide και ακολουθεί επαναδιάλυση του σε 40μλ HAG και 10λεπτη επώαση στο ψυγείο. Στη συνέχεια προστίθενται 20μλ TLR4-PE και σε ένα δείγμα IgG1-PE σαν control, ακολουθεί 20λεπτη επώαση στο ψυγείο. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα PBS και φυγοκέντρωση. Τέλος το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μλ PFA 2% και τα δείγματα μετρώνται στον κυτταρομετρητή ροής.

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **3.1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CRH ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ TLR4**

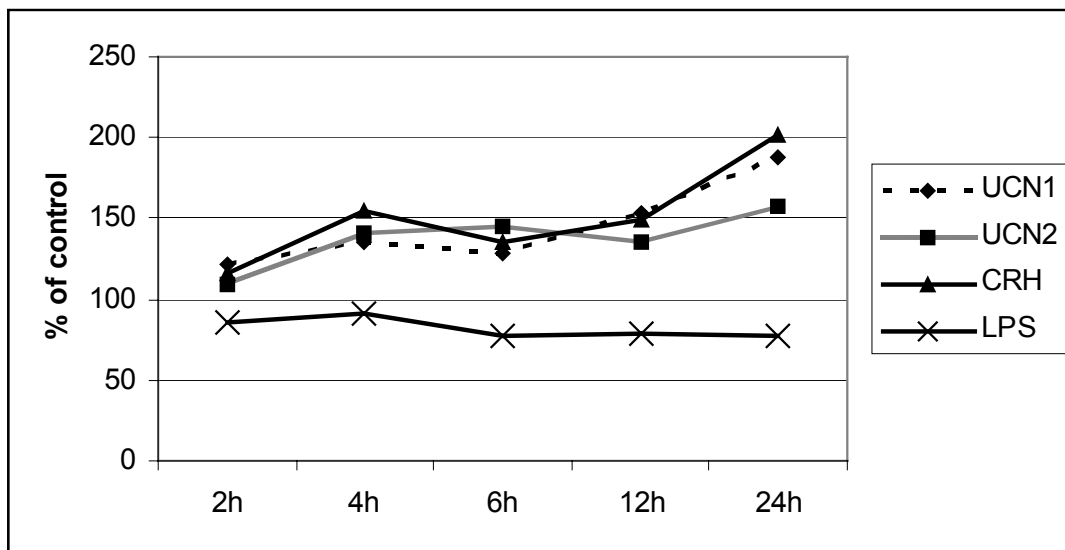
Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), έχειδειχθεί ότι κατέχει προφλεγμονώδεις ιδιότητες, όταν εκκρίνεται σε περιφερικούς ιστούς. Μελέτες που έχουν γίνει κατά το παρελθόν στο εργαστήριο μας δείχνουν ότι τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH αυξάνουν την LPS-επαγόμενη έκφραση κυτοκινών, οδηγώντας συνεπώς στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Η ρύθμιση της ενεργοποίησης των μακροφάγων μπορεί να γίνει άμεσα, ενεργοποιώντας μεταγραφικά μονοπάτια που μετέχουν στη μεταγραφή κυτταροκινών, ή έμμεσα επάγοντας την έκφραση του υποδοχέα TLR4, που προκαλεί υπερευαισθησία των μακροφάγων στο LPS. Το LPS μεσολαβεί τις προφλεγμονώδεις δράσεις του μεταδίδοντας το σήμα του μέσω του υποδοχέα TLR4. Κατά τη φλεγμονή τα επίπεδα της έκφρασης του TLR4 είναι πολύ αυξημένα. Σκοπός λοιπόν της συγκεκριμένης εργασίας ήταν ο προσδιορισμός του ρόλου της CRH και των σχετιζόμενων με αυτή νευροπεπτιδίων, UCN1 και UCN2, στην έκφραση του υποδοχέα TLR4 σε μακροφάγα κύτταρα.

#### ***3.1.1 Η CRH και τα συγγενή με αυτήν πεπτίδια UCN1 και UCN2, επάγουν την έκφραση του mRNA του υποδοχέα TLR4, στην κυτταρική σειρά RAW264.7***

Για να μελετήσουμε το αποτέλεσμα της επίδρασης της CRH και των συγγενών νευροπεπτιδίων, UCN1 και UCN2 στην έκφραση του TLR4 στα μακροφάγα, και δεδομένου ότι ο TLR4 ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο, μετρήσαμε το επίπεδο mRNA του TLR4 πριν και μετά την επίδραση των νευροπεπτιδίων με RT PCR. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήσαμε κύτταρα Raw 264.7 (κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού) σε θρεπτικό υλικό που περιείχε ορρό. Οι συγκεντρώσεις των νευροπεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εκείνες στις οποίες έχειδειχθεί ότι έχουν την μεγαλύτερη

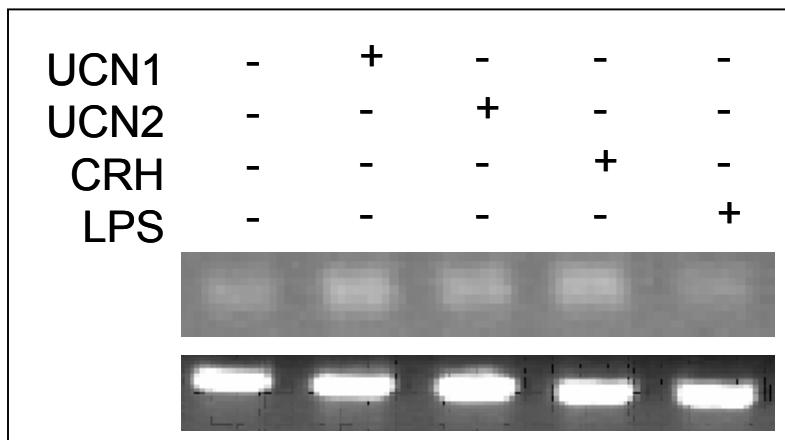
δράση. Άλλωστε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί στη μελέτη της αύξησης της έκκρισης προφλεγμονώδων κυτταροκινών, έχουν δείξει ότι σε αυτή την συγκέντρωση παρατηρείται η μέγιστη αύξηση (127). Απομονώθηκε το RNA των κυττάρων και η έκφραση του TLR4 μετρήθηκε με ημι-ποσοτική RT-PCR.

Η χρονική επίδραση που επιλέχθηκε ήταν 18 ώρες. Η επιλογή της χρονικής ώρας έγινε με βάση πειράματα με επιδράσεις των νευροπεπτιδίων σε διάφορες χρονικές στιγμές, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1 που ακολουθεί, ως γνωστόν το LPS αρχίζει να επιδρά στην έκφραση του TLR4 από τις 2 ώρες. Οι επιδράσεις ξεκίνησαν από τις 2 ώρες και μελετήθηκαν ακόμα στις 4, 6, 12 και 24 ώρες. Όπως φαίνεται και για τα τρία νευροπεπτίδια παρατηρείται σταδιακή αύξηση της επίδρασης τους σε σχέση με το control, η οποία κορυφώνεται στις 12 με 24 ώρες. Η χρονική στιγμή που τελικά επελέγη ήταν ανάμεσα στις 12 με 24 ώρες και επιλέξαμε λοιπόν τις 18 ώρες.



**Διάγραμμα 1. Επιδράσεις νευροπεπτιδίων σε διάφορες χρονικές στιγμές ώστε να επιλεγεί η καταλληλότερη.** Όπως διακρίνουμε η μεγαλύτερη επίδραση πραγματοποιήθηκε μετά τις 12 και έως τις 24 ώρες.

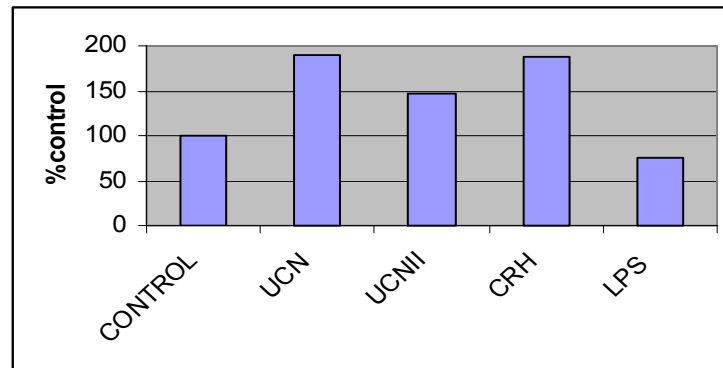
Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τα νευροπεπτίδια CRH, UCN1 και UCN2 σε συγκέντρωση  $10^{-9}$ M για 18 ώρες και με LPS σε συγκέντρωση 10μg/ml. Η αντίδραση της PCR τερματίστηκε στους 35 κύκλους, όπου η ενίσχυση βρισκόταν στην εκθετική φάση, όπως αυτό καθορίστηκε από την καμπύλη ενίσχυσης για κάθε ζεύγος προαγωγέων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 2, και τα τρία νευροπεπτίδια επάγουν την έκφραση του TLR4, ενώ αντίθετα το LPS μειώνει τα επίπεδα του TLR4. Τα αποτελέσματα που δείχνονται είναι αντιπροσωπευτικά πολλών παρόμοιων πειραμάτων.



**Εικόνα 2.** Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2, επάγουν την έκφραση του TLR4 στα κύτταρα Raw264.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον TLR4. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε επίδραση με UCN, UCNII, CRH και LPS. Όπως φαίνεται τα νευροπεπτίδια επάγουν την έκφραση του TLR4, ενώ αντίθετα το LPS την μειώνει.

Ακολούθως έγινε φωτομετρική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με το πρόγραμμα TINA SCAN και αναγωγή των τιμών με βάση την έκφραση της ακτίνης σε κάθε δείγμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3, μετά από επίδραση των κυττάρων με UCN αυξήθηκε ο TLR4 σε 190,02, σχεδόν διπλάσια αύξηση. Με επίδραση με UCNII

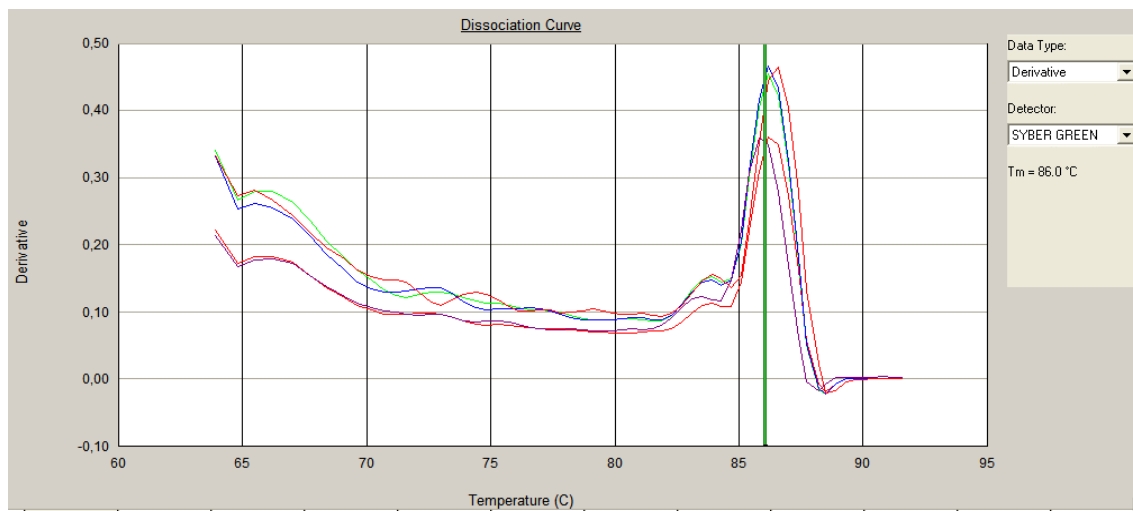
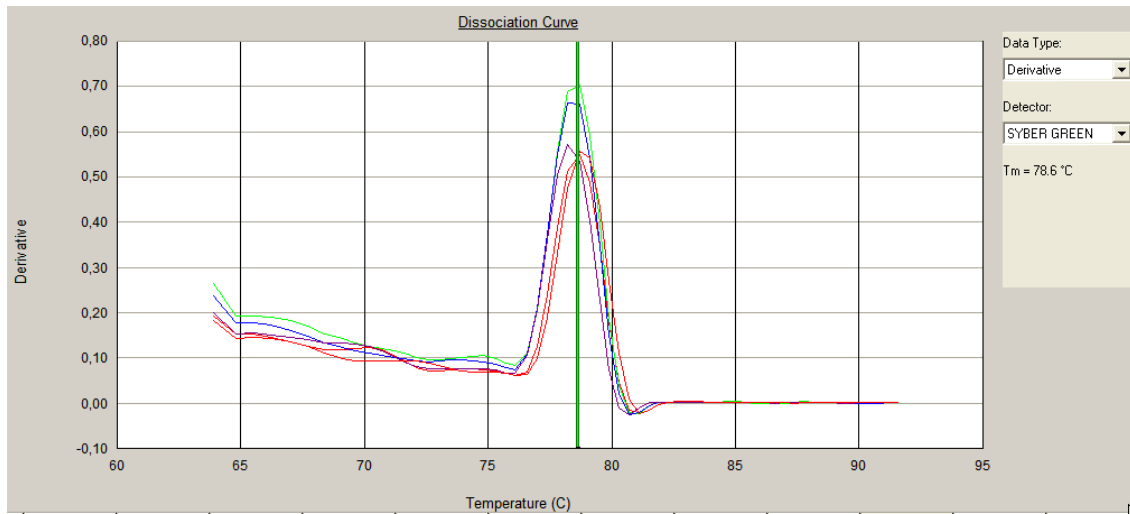
παρατηρείται σημαντική αύξηση του TLR4 σε 146,6 σε σχέση με το control. Επίσης πολύ σημαντική αύξηση σε 187,09% σε σχέση με το control παρατηρείται και με την επίδραση του CRH. Αντίθετα το επίπεδο του TLR4 μειώνεται σε 75,4 % σε σχέση με το control. **Συμπερασματικά λοιπόν σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του επιπέδου του TLR4 με την επίδραση των νευροπεπτιδίων, ενώ το LPS μειώνει αισθητά τα επίπεδά του υποδοχέα.**



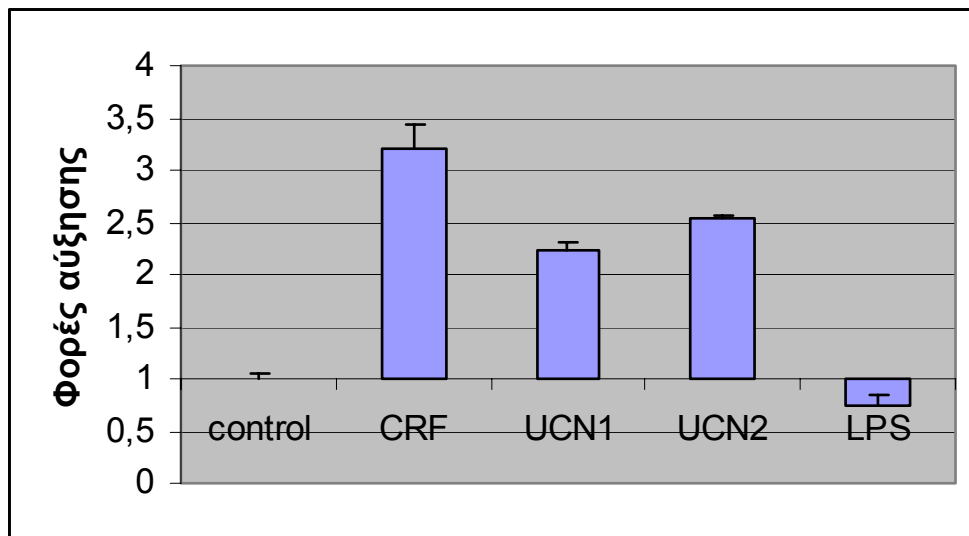
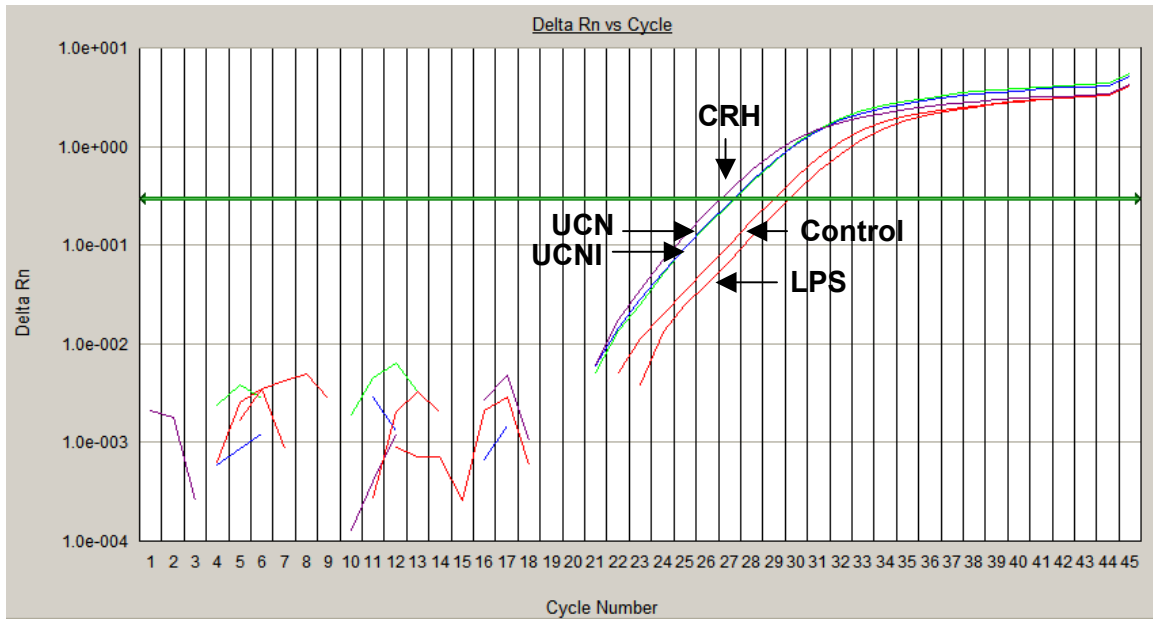
**Σχήμα 3.** Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII επάγουν την έκφραση του TLR4 στα κύτταρα Raw264.7. Φωτομετρική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR για τον TLR4 και αναγωγή των τιμών με βάση την τιμή της ακτίνης σε κάθε δείγμα. Τα νευροπεπτίδια επάγουν σημαντικά την έκφραση του TLR4, ενώ το LPS την μειώνει.

Για να επιβεβαιώσουμε την παρατήρηση αυτή, επαναλάβαμε τα πειράματα, μετρώντας τα επίπεδα του mRNA του TLR4 με τη μέθοδο της ποσοτικής Real-time PCR, χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 45 κύκλους. Δεν υπήρχαν παραπροϊόντα στην αντίδραση, γεγονός που πιστοποιήθηκε με την καμπύλη αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης (Εικόνα 4), καθώς και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αгарόζης. Η ικανότητα ενίσχυσης των προϊόντων του TLR4 ήταν ίδια με αυτή των προϊόντων της ακτίνης, γεγονός που μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε τον τύπο:

$$\text{αύξηση προϊόντος} = 2^{(ACt\text{δείγμα} - ACt\text{control})}$$



**Εικόνα 4. Καμπύλη αποδιάταξης για τον TLR4 (πάνω) και την ακτίνη (κάτω). Παρατηρείται μια κορυφή μόνο στην καμπύλη, γεγονός που αποκλείει την ύπαρξη παραπροϊόντων.**



**Εικόνα 5.** Τα νευροπεπτίδια CRH και UCNII επάγουν την έκφραση του TLR4, ενώ το LPS την μειώνει. Διάγραμμα από real-time PCR και αντίστοιχος φωτομετρικός προσδιορισμός της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην έκφραση του TLR4

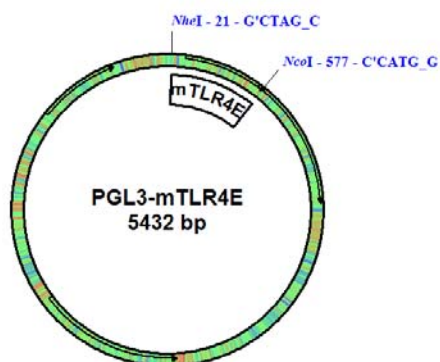
Όπως διακρίνουμε στην εικόνα 5 τα νευροπεπτίδια επάγουν την έκφραση του TLR4 ενώ το LPS την μειώνει αισθητά. Πιο συγκεκριμένα με επίδραση UCN σημειώνεται αύξηση  $2,23 \pm 0,082$  φορές σε σχέση με το control. Επίδραση με CRH



αυξάνει  $3,22 \pm 0,22$ . Με επίδραση UCNII έχουμε αύξηση στο  $2,54 \pm 0,025$  σε σχέση με το control, ενώ με επίδραση LPS έχουμε μείωση στο  $0,75 \pm 0,1$ .

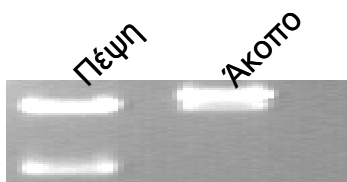
### ***3.1.2 Η Επαγωγή της έκφρασης του TLR4 από τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII γίνεται στο επίπεδο του προαγωγέα.***

Είναι γνωστό ότι ορισμένες φορές η πολυ-αδενυλική ουρά του mRNA σταθεροποιείται και έτσι δεν είναι δυνατή η αποδιάταξη, με τελικό αποτέλεσμα την αλλαγή σταθερότητας του mRNA. Για να διαπιστώσουμε λοιπόν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του TLR4 που βλέπαμε με την RT-PCR ήταν πραγματικές και κυρίως για να διερευνήσουμε το αν η επίδραση των νευροπεπτιδίων στην έκφραση του TLR4 συνέβαινε στο μεταγραφικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση (transfection) κυττάρων Raw264.7 με ειδικό πλασμίδιο που περιείχε τον ελάχιστο προαγωγέα του TLR4 ποντικού (mTLR4E 550bp) συνδεδεμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης (Εικόνα 6) και επίδραση των κυττάρων με CRH, UCN και UCN2  $10^{-9}$ M για 18 ώρες. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και απομόνωση των πρωτεϊνών. Η ενεργότητα λουσιφεράσης μετρήθηκε στο κυτταρικό εκχύλισμα.



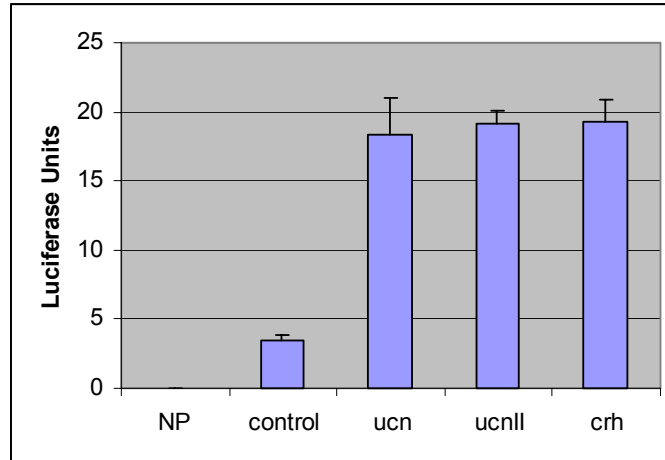
**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι διαμολύνσεις. Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για τις διαμολύνσεις των RAW264.7, ήταν το pGL3-mTLR4E που περιέχει το γονίδιο λουσιφεράσης και τον ελάχιστο προαγωγέα mTLR4E. Το μέγεθος του πλασμιδίου είναι 5432bp, ενώ του προαγωγέα 550bp.

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ευγενική χορηγία του καθηγητή Michael Rehli. Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του προαγωγέα που μας ενδιέφερε μέσα στο πλασμίδιο αυτό, πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τα ένζυμα NheI και NcoI (κόβουν στις 21 και 577 βάσεις) (Εικόνα 6), γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα την εξαγωγή του προαγωγέα από το πλασμίδιο. Το προϊόν της πέψης φαίνεται στην εικόνα 7. Η κάτω ζώνη είναι ο ζητούμενος προαγωγέας, ενώ η πάνω είναι το υπόλοιπο κομμάτι του πλασμιδίου.



**Εικόνα 7.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της διπλής πέψης του πλασμιδίου. Αριστερά φαίνεται το κομμένο πλασμίδιο, ενώ δεξιά το άκοπο.

Τα αποτελέσματα της ενεργότητας λουσιφεράσης παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Όπως παρατηρείται τα αποτελέσματα δείχνουν ότι και τα τρία νευροπεπτίδια προκαλούν δραματική αύξηση του προαγωγέα του TLR4, γεγονός που αποδεικνύει ότι η επίδραση τους γίνεται σε μεταγραφικό επίπεδο.



**Πίνακας 8. Τα νευροπεπτίδια UCN, UCN2, CRH επάγουν θεαματικά την έκφραση του προαγωγέα του TLR4.** Πίνακας που δείχνει την ενεργότητα σε μονάδες λουσιφεράσης για κάθε επίδραση χωριστά. Όπου NP (No plasmid), πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που δεν είχαν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο

Κάθε μπάρα στο γράφημα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο από τρεις επιμέρους διαμολύνσεις που έγιναν παράλληλα. Ο προσδιορισμός του σφάλματος (μέση απόκλιση), ήταν απαραίτητος για την αξιολόγηση και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων

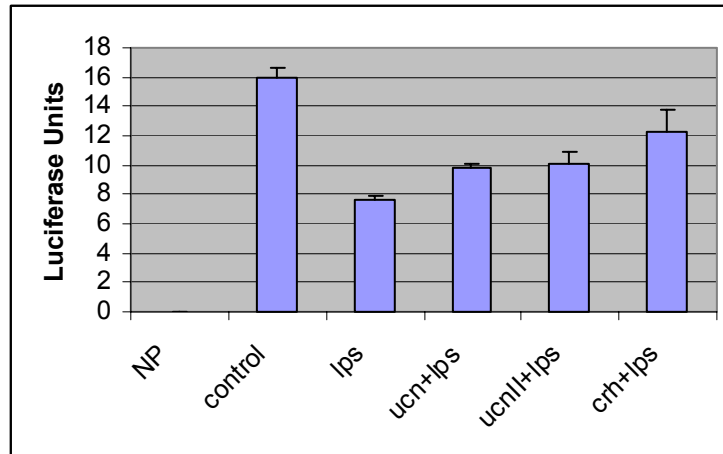
Πιο συγκεκριμένα όταν τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί επώαστηκαν με UCN  $10^{-9}$ M για 18 ώρες, η ενεργότητα της λουσιφεράσης αυξήθηκε σημαντικά  $18,35 \pm 2,6$  μονάδες σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε συνθήκες απουσίας επίδρασης (control) που ήταν  $3,43 \pm 0,45$  μονάδες. Όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με UCN2  $10^{-9}$ M για 18 ώρες, η ενεργότητα της λουσιφεράσης αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά

19,185 ± 0,875 σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε συνθήκες απουσίας επίδρασης (control). Τέλος όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με UCN2 10<sup>-9</sup>M για 18 ώρες, η ενεργότητα της λουσιφεράσης αυξήθηκε εξίσου πολύ 19,345 ± 1,515 σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε συνθήκες απουσίας επίδρασης (control). **Συμπερασματικά λοιπόν τα νευροπεπτίδια CRH, UCN, UCN2 αυξάνουν θεαματικά την έκφραση του TLR4 σε μεταγραφικό επίπεδο.**

### ***3.1.3 Η LPS-επαγόμενη μείωση της έκφρασης του TLR4 αναστέλλεται από την παρουσία CRH ή UCN ή UCN2***

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το LPS έχει μια αρνητική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του TLR4 ποντικού, για αυτό και εμείς θέλαμε να διαπιστώσουμε αν τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2 έχουν κάποιο αντίκτυπο στην επίδραση του LPS στην έκφραση του TLR4.

Για το σκοπό αυτό κύτταρα RAW264.7 διαμολύνθηκαν με τον ελάχιστο προαγωγέα mTLR4E και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με LPS 10μg/ml παρουσία ή απουσία των CRH, UCN και UCN2 (10<sup>-9</sup>M) για 18 ώρες όπως περιγράφηκε και στην προηγούμενη παράγραφο. Τα αποτελέσματα της ενεργότητας λουσιφεράσης φαίνονται στον πίνακα 9 που ακολουθεί. Κάθε μπάρα στο γράφημα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο από τρεις επιμέρους διαμολύνσεις που έγιναν παράλληλα. Ο προσδιορισμός του σφάλματος (error bars), ήταν απαραίτητος για την αξιολόγηση και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

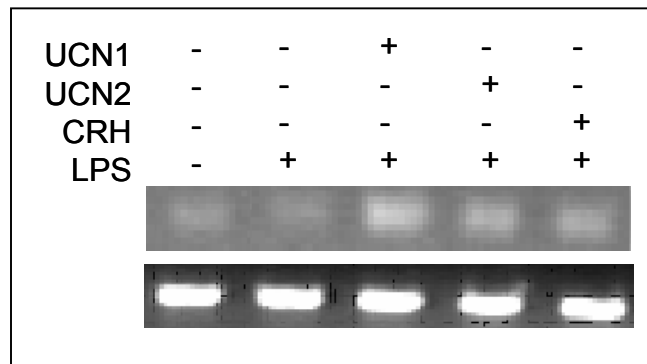


**Πίνακας 9. Τα νευροπεπτίδια UCN, UCN2, CRH αναστέλουν μερικώς την LPS-επαγόμενη μείωση της έκφρασης του TLR4.** Πίνακας που δείχνει την ενεργότητα σε μονάδες λουσιφεράσης για κάθε επίδραση χωριστά. Όπου NP (No plasmid), πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που δεν είχαν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο

Συνολικά παρατηρούμε ότι με επίδραση των νευροπεπτιδίων υπάρχει μερική αναστολή του αρνητικού αποτελέσματος του LPS. Πιο αναλυτικά θα λέγαμε ότι με επίδραση LPS παρατηρείται σημαντική μείωση της ενεργότητας λουσιφεράσης  $7,61 \pm 0,29$  μονάδες σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε συνθήκες απουσίας επίδρασης (control) που ήταν  $3,43 \pm 0,45$  μονάδες. Όταν επιδρούμε LPS παρουσία UCN παρατηρείται μερική αύξηση των μονάδων λουσιφεράσης  $9,785 \pm 0,285$  σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με LPS μόνο. Επίδραση LPS παρουσία UCN2 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των μονάδων λουσιφεράσης  $10,12 \pm 0,82$  σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με LPS μόνο. Τέλος με επίδραση των κυττάρων με LPS παρουσία CRH παρατηρείται και πάλι αύξηση των μονάδων λουσιφεράσης  $12,26 \pm 1,46$ . **Συμπερασματικά λοιπόν όταν επιδρούμε νευροπεπτίδια παρουσία LPS παρατηρείται αναστολή της δράσης του LPS, δηλαδή αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TLR4 σε σχέση με τα κύτταρα που επωάζονται μόνο με LPS.**

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με ημιποσοτική RT-PCR. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήσαμε κύτταρα Raw 264.7 σε θρεπτικό υλικό που περιείχε ορρό. Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με LPS 10μg/ml παρουσία ή απουσία των νευροπεπτιδίων CRH, UCN1 και UCN2 σε συγκέντρωση  $10^{-9}$ M για 18 ώρες. Απομονώθηκε το RNA και η έκφραση του TLR4 μετρήθηκε με ημι-ποσοτική RT-PCR.

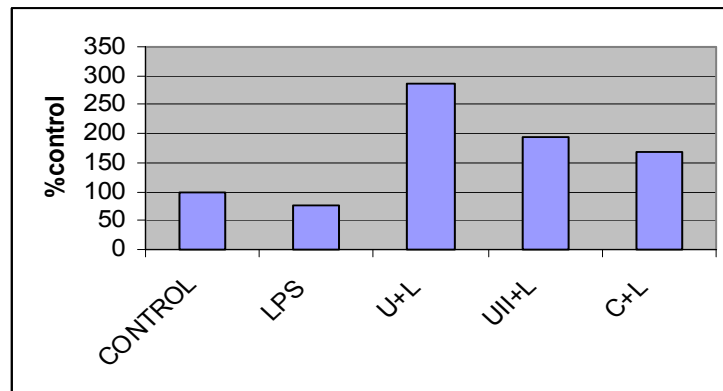
Η αντίδραση της PCR τερματίστηκε στους 35 κύκλους, όπου η ενίσχυση βρισκόταν στην εκθετική φάση, όπως αυτό καθορίστηκε από την καμπύλη ενίσχυσης για κάθε ζεύγος προαγωγέων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10 το LPS μειώνει τα επίπεδα του TLR4, ενώ με την παρουσία των νευροπεπτιδίων η επίδραση αυτή αναστέλλεται.



**Εικόνα 10. Τα νευροπεπτιδία CRH, UCN και UCN2 αναστέλουν την LPS-επαγόμενη μείωση του TLR4.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον TLR4. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε επίδραση με LPS παρουσία ή απουσία των UCN, UCN2, CRH. Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TLR4 παρουσία LPS σε συνδυασμό με τα νευροπεπτιδία σε αντιδιαστολή με την επίδραση του LPS από μόνο του.

Ακολούθως έγινε φωτομετρική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με το πρόγραμμα TINA SCAN και αναγωγή των τιμών με βάση την έκφραση της ακτίνης σε κάθε δείγμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 11, μετά από επίδραση των κυττάρων με LPS μειώθηκε ο TLR4 σε 75,4% σε σχέση με το control, με επίδραση LPS παρουσία UCN

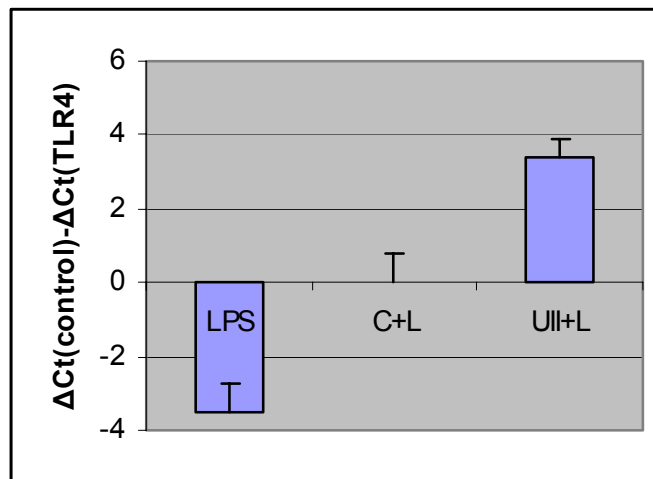
παρατηρήθηκε θεαματική αύξηση του TLR4 286,32% σε σχέση με τα επίπεδα του LPS. Με επίδραση LPS παρουσία UCNII παρατηρείται σημαντική αύξηση του TLR4 σε 193,02% σε σχέση με το LPS. Επίσης πολύ σημαντική αύξηση 168,63% σε σχέση με το LPS, παρατηρείται και με την επίδραση του CRH σε συνδυασμό με το LPS. Συμπερασματικά λοιπόν σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας παρουσιάζεται σημαντική αύξηση του επιπέδου του TLR4 με την επίδραση των νευροπεπτιδίων σε συνδυασμό με το LPS, ενώ αντίθετα όταν επιδρούμε σκέτο LPS παρατηρείται μείωση.



**Σχήμα 11.** Επίδραση των νευροπεπτιδίων παρουσία LPS προκαλεί αναστολή της δράσης του LPS, δηλαδή αύξηση των επιπέδων έκφρασης του TLR4 σε σχέση με τα κύτταρα που επωάζονται μόνο με LPS. Φωτομετρική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR για τον TLR4 και αναγωγή των τιμών με βάση την τιμή της ακτίνης σε κάθε δείγμα. Τα νευροπεπτιδία επάγουν σημαντικά την έκφραση του TLR4 όταν συνδυάζονται με LPS, ενώ το LPS την μειώνει.

Για να επιβεβαιώσουμε την παρατήρηση αυτή, επαναλάβαμε τα πειράματα, μετρώντας τα επίπεδα του mRNA του TLR4 με τη μέθοδο της ποσοτικής Real-time PCR, χρησιμοποιώντας την χρωστική SYBR Green. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε

στους 45 κύκλους. Δεν υπήρχαν παραπροϊόντα στην αντίδραση, γεγονός που πιστοποιήθηκε με την καμπύλη αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης, καθώς και με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης. Η ικανότητα ενίσχυσης των προϊόντων του TLR4 ήταν ίδια με αυτή των προϊόντων της ακτίνης, γεγονός που μας επέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε τον τύπο  $\text{αύξηση προϊόντος} = 2^{(\Delta C_{\text{dείγμα}} - \Delta C_{\text{control}})}$ .



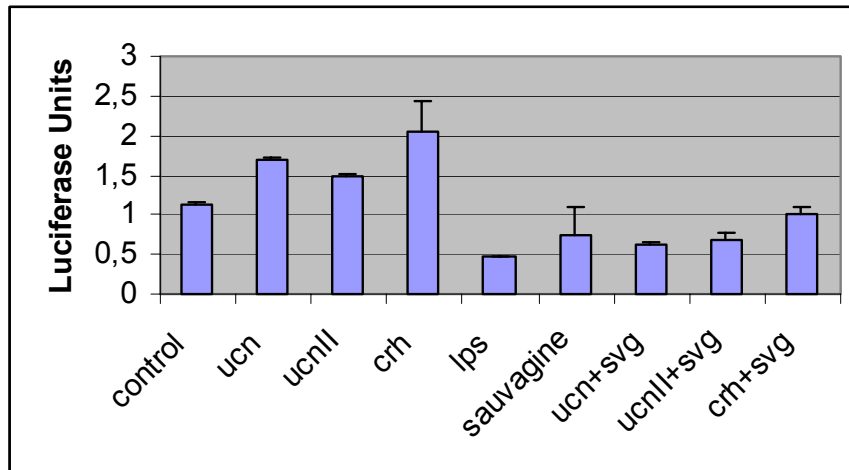
**Εικόνα 12.** Τα νευροπεπτίδια CRH και UCNII σε συνδυασμό με το LPS αναστέλλουν την δράση του LPS στην έκφραση του TLR4. Διάγραμμα από real-time PCR και αντίστοιχος φωτομετρικός προσδιορισμός της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην έκφραση του TLR4

Όπως διακρίνουμε και στην εικόνα 12, τα νευροπεπτίδια όταν συνδυάζονται με το LPS αναστέλλουν την αρνητική επίδραση του LPS στην έκφραση του TLR4. Πιο συγκεκριμένα το CRH σε συνδυασμό με το LPS αναστέλλει στο  $-0,02 \pm 0,78$ . Με LPS σε συνδυασμό με UCNII προκαλείται αναστολή στο  $3,425 \pm 0,46$ . Ενώ με σκέτη επίδραση LPS έχουμε μείωση στο  $-3,51 \pm 0,75$ .



### 3.1.4 Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2, επάγουν την έκφραση του υποδοχέα TLR4 μέσω του υποδοχέα CRHR2.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή τα νευροπεπτίδια CRH και UCN1 μεταδίδουν το σήμα τους μέσω και των δύο υποδοχέων CRHR2 και CRHR1, ενώ αντίθετα η UCN2 σηματοδοτεί αποκλειστικά μέσω του υποδοχέα CRHR2. Έτσι λοιπόν θέλαμε να διερευνήσουμε τι θα συνέβαινε στην έκφραση του TLR4 αν μπλοκάρουμε τον υποδοχέα στον οποίο προσδένονται και τα τρία νευροπεπτίδια. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα RAW264.7 διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pGL3-mTLR4E και στη συνέχεια επώαστηκαν για 18 ώρες με UCN, UCN2 και CRH ( $10^{-9}$ M) παρουσία ή απουσία του αναστολέα του υποδοχέα CRHR2, anti-sauvagine30 ( $10^{-6}$ M) χορηγείται στα κύτταρα 1 ώρα πριν τα νευροπεπτίδια). Το κυτταρικό εκχύλισμα μετρήθηκε για ενεργότητα λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 13.



**Πίνακας 13.** Η anti-sauvagine30 αναστέλλει την δράση των νευροπεπτιδίων UCN, UCNI και CRH. Πίνακας που δείχνει την ενεργότητα σε μονάδες λουσιφεράσης για κάθε επίδραση χωριστά. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του πίνακα τα νευροπεπτίδια αυξάνουν την έκφραση του TLR4, ενώ το LPS την μειώνει όπως είχαμε διαπιστώσει και σε προηγούμενη ενότητα. Αντίθετα επίδραση των νευροπεπτιδίων παρουσία anti-sauvagine30 προκαλεί αναστολή της δράσης τους, δηλαδή μείωση των

επιπέδων έκφρασης του TLR4 σε σχέση με τα κύτταρα που επωάζονται μόνο με νευροπεπίδια.

Όπως γίνεται αντιληπτό η επίδραση των κυττάρων με anti-sauvagine30 οδηγεί στο μπλοκάρισμα της επαγόμενης από UCN, UCN2 και CRH ενεργοποίησης του προαγωγέα TLR4. Πιο συγκεκριμένα παρουσία UCN τα επίπεδα αυξάνονται σε  $1,691 \pm 0,041$  μονάδες σε σχέση με το control που ήταν  $1,13 \pm 0,018$ , ενώ αντίθετα παρουσία anti-sauvagine η δράση της UCN μειώνεται σημαντικά σε  $0,613 \pm 0,035$  σε σχέση με το control. Επίδραση με UCN2 παρατηρούμε αύξηση σε  $1,49 \pm 0,011$ , η οποία αναστέλλεται παρουσία anti-sauvagine σε  $0,6745 \pm 0,112$ . Παρουσία CRH έχουμε αύξηση  $2,045 \pm 0,382$ , η οποία αναστέλλεται από την anti-sauvagine σε  $1,007 \pm 0,079$ . Το LPS μειώνει τα επίπεδα σε  $0,464$ . Ενώ τέλος η anti-sauvagine από μόνη της μειώνει σε  $0,757 \pm 0,332$ .

**Συμπερασματικά λοιπόν θα λέγαμε ότι και τα τρία νευροπεπίδια χρησιμοποιούν τον υποδοχέα CRHR2 για να προάγουν ενδοκυττάρια σήματα που οδηγούν στην μεταγραφή από τον προαγωγέα TLR4.**

### 3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ CRH ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ PU.1

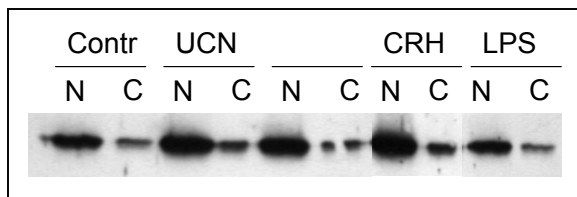
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ρύθμιση του υποδοχέα TLR4 πραγματοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο. Η έκφραση του TLR4 καθορίζεται από έναν προαγωγέα (Εικόνα 14), ο οποίος περιλαμβάνει αρκετά σημεία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 τοποθετημένα στον ελάχιστο προαγωγέα. Η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 είναι απαραίτητη για την έκφραση του TLR4. Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται ο προαγωγέας ποντικού σε σύγκριση με τον ανθρώπινο, όπως αναφέρθηκε έχουν πολλά ομόλογα τμήματα, ενώ και οι δύο διαθέτουν αρκετά σημεία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα PU.1

hTLR4	-231	AAAATTGGAAAATCACCGTCATCCTAGAGAGTTACAAGGGCTATTTTAATAGAA--CCTGATTGTTTTCTAAATTCACC
mTlr4	-235	TAAGTGAAGCAGTAAGCATCCTCTGTGAAAATAAAGAAGGAATGAGGATGTTGCTCCACGCCAGTTCCTCGCCTTCACC
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> <span>AP-1</span> <span>ets/PU</span> </div>
hTLR4	-153	AAGCCCAGGCAGAGGTCAGATGACTAATTGGGATAAAAAGCCAACTAGCTTCCTCTTGCTGTTCTTTAGCCACT-GGTCT
mTlr4	-155	AAGCC----CAGAGGTCAGATGACTTCCTGGGATGAAAGCC----AGCTTCCTCTTGCTGTTCT----CCAGTCGGTCA
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> <span>ets/PU</span> <span>PU.1</span> </div>
hTLR4	* -74	GCAGGCG-----TTTCTCTCTTAAGTTCCTCTCCTGTGACAAAAGAGATAACTATTAGAGAAA--
mTlr4	* -87	GCAAAAGCCTTCTTCCTGTTCTAGTCTTCAGTCTTCTAACTTCC-CTCCTGGACGGGGCAGATCGATTCTAGAACAATA
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> <span>oct</span> <span>IRF / PU.1</span> </div>
hTLR4	-14	-CAAAAGTCCAGAATGCTAAGGTTGCCCTTTCACCTTCCTTCACCCCTTTAGCCAGAACTGCTTTGAAATACACCAATTG
mTlr4	-8	CCAAAAGT-GAGAATGCTAAGGTTGGCACTCTCACTTCCTCTT-----TGAATATAGTACTTG
hTLR4	+66	CTGTGGGGCGGCTCGAGGAAGAGAAGACACCAGTGCCTCAGAACTGCTCGGTGAGACGGTGATAGCCAGCCACGCATTC
mTlr4	+50	CAGAGGGGCCACCCACTGGGAGGGAAGAGGCAGGTGTCCAGGGACTCTGGCT-----GCCACCAGTT-
hTLR4	+148	ACA-----GGGCACTGCTGCTCAGAAAGCAGTGAAGGATGATGCCAGGATGATGCTGCTGCTCG
mTlr4	+114	ACAGATCGTCATGTTCTCTCATGGCCCTCCACTGGTGTG---CAGAAA-----ATGCCAGGATGATGCTCCTCGG
hTLR4	+205	CCGCCTGGCTGGGACTCTGATCCAGCCATGGCCCTTCCTCTCCTGGGTGAGACCAGAAAGCTGGGAGCCCTGCGTGGAG   Intron 1
mTlr4	+180	CCTCCTGGCTAGGACTCTGATCATGGCACTGTTCTTC---TCCTGCCTGACACCAGGAAGCTTGAATCCCTGCATAGAG

Εικόνα 14. Αλληλουχία του προαγωγέα TLR4 στο γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού. Τα πιθανά σημεία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 είναι υπογραμμισμένα, τα σημεία που αρχίζει η μεταγραφή είναι σημειωμένα με αστερίσκο.

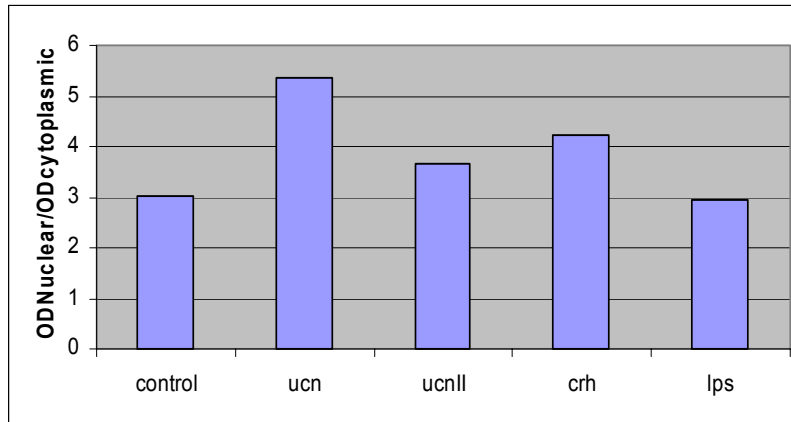
### 3.2.1 Τα νευροπεπτίδια προκαλούν την μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 στον πυρήνα.

Από τη στιγμή που τα πειράματα μας απέδειξαν ότι τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2 έχουν θετική επίδραση στην δραστικότητα του προαγωγέα του TLR4, θέλαμε να διερευνήσουμε περαιτέρω αν τα νευροπεπτίδια αυτά είχαν κάποιο αντίκτυπο στην μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1, από τη στιγμή που όπως αναφέρθηκε ο ελάχιστος προαγωγέας περιέχει τουλάχιστον τρεις θέσεις πρόσδεσής του PU.1. Για το σκοπό αυτό επιδράσαμε σε κύτταρα Raw264.7 τα νευροπεπτίδια CRH, UCN, UCNII ( $10^{-9}$  M και LPS (10 $\mu$ g/ml) για 45 λεπτά (αφού τα είχαμε αφήσει χωρίς ορρό για 18 ώρες) και μετρήθηκε η μετατόπιση του PU.1 στον πυρήνα, χρησιμοποιώντας την τεχνική western blot (Εικόνα 15) σε κυτταρικά και πυρηνικά εκχυλίσματα. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα, τα επίπεδα του πυρηνικού PU.1 αυξήθηκαν με επίδραση των νευροπεπτιδίων CRH, UCN και UCNII, γεγονός που δείχνει ότι έχουν θετική επίδραση στην μετακίνηση του PU.1 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.



**Εικόνα 15. Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII προκαλούν μετακίνηση του PU.1 στον πυρήνα.** Ανάλυση western blot, για πυρηνικά και κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε επίδραση με UCN, UCN2, CRH και LPS. Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση των επιπέδων του PU.1 στον πυρήνα μετά από επίδραση των νευροπεπτιδίων παρουσία LPS παρατηρείται μικρή μείωση.

Ακολούθησε φωτομετρική ανάλυση με το πρόγραμμα TINA SCAN και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 16.

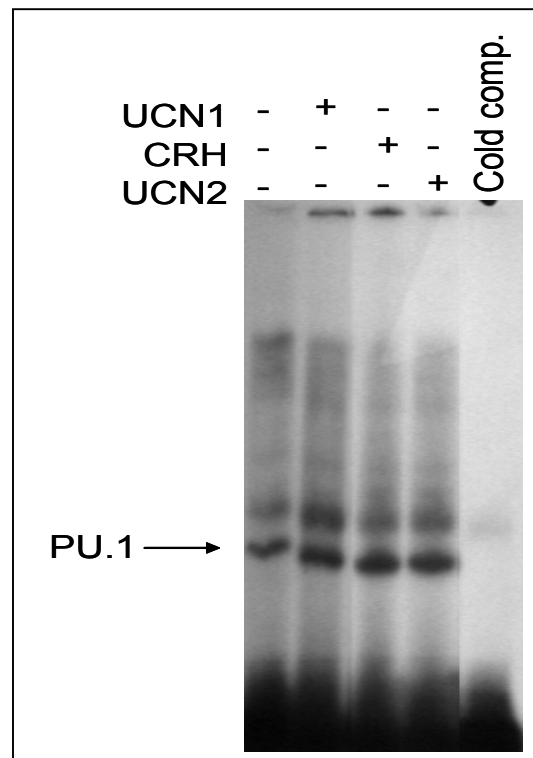


**Πίνακας 16. Τα νευροπεπτίδια προκαλούν την μετακίνηση του PU.1 στον πυρήνα.** Φωτομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων του western blot. Εδώ παρουσιάζεται ο λόγος των πυρηνικού PU.1 ως προς το κυτταροπλασματικό. Με επίδραση των νευροπεπτιδίων παρατηρείται αύξηση του λόγου αυτού.

Πιο συγκεκριμένα βλέπουμε στον πίνακα 16 ότι με επίδραση UCN παρατηρείται αύξηση του λόγου σε 5,34 σε σχέση με το control του οποίου ο λόγος μετακίνησης στον πυρήνα ήταν 3,03. Με επίδραση UCN2 αύξηση σε 3,7 σε σχέση με το control, με επίδραση CRH αύξηση σε 4,2, ενώ με επίδραση LPS παρατηρείται αμελητέα μείωση του λόγου. **Συμπερασματικά λοιπόν τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν ότι με επίδραση των νευροπεπτιδίων παρατηρείται μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 από το κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, όπου και θα προσδεθεί πάνω στον προαγωγέα ενισχύοντας έτσι την μεταγραφή του TLR4.**

### 3.2.2 Τα νευροπεπτίδια UCN, UCN2, CRH ενεργοποιούν την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1 στο DNA, σε κύτταρα RAW264.7

Στα πλαίσια της μελέτης της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην ενεργοποίηση του PU.1, μετρήθηκε επίσης και η ικανότητα πρόσδεσης του PU.1 πάνω στον ελάχιστο προαγωγέα TLR4. Για το σκοπό αυτό κύτταρα Raw έμειναν σε συνθήκες απουσίας ορού για 18 ώρες, στη συνέχεια διεγέρθηκαν για 45 λεπτά με τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII (σε συγκέντρωση  $10^{-9}$ M) παρουσία ή απουσία LPS (10μg/ml). Τα πυρηνικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και η ικανότητα πρόσδεσης του PU.1 μελετήθηκε με την τεχνική EMSA. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 17 που ακολουθεί.

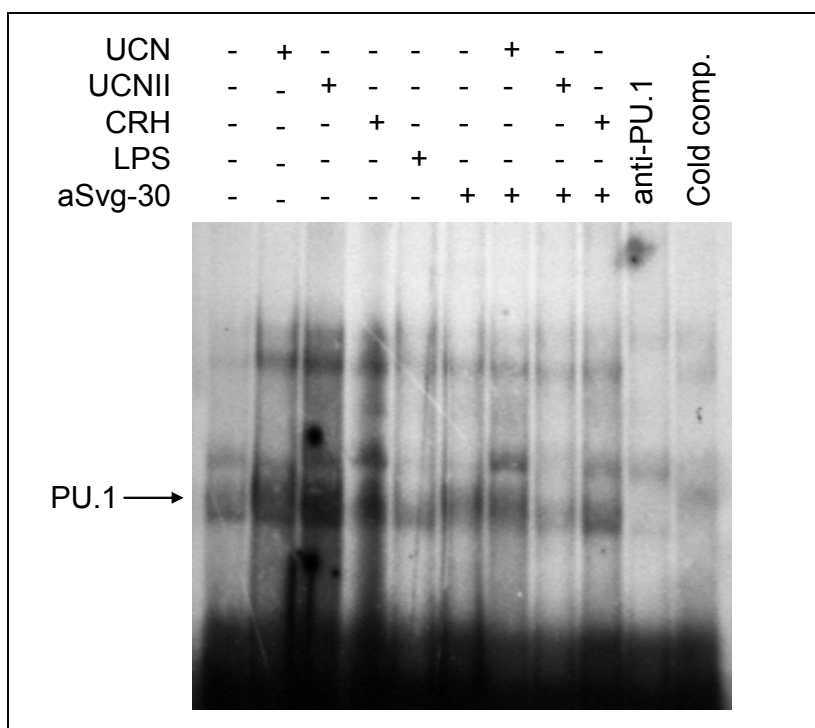


**Εικόνα 17.** Τα νευροπεπτίδια προκαλούν εμφανή αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης του PU.1. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που μελετήθηκαν με την τεχνική EMSA. Και τα τρία νευροπεπτίδια ενεργοποιούν τον PU.1.

Όπως λοιπόν διακρίνουμε στην εικόνα 17 και τα τρία νευροπεπτίδια ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα PU.1. Πιο συγκεκριμένα με επίδραση UCN παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων PU.1, που ακολουθείται από το CRH και έπειτα με μικρή διαφορά από την UCNII. Παρουσία «κρύου» ανταγωνιστή παρατηρείται εξαφάνιση της ζώνης, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι όντως αυτή η ζώνη είναι ειδική για τον PU.1.

### ***3.2.3 Η ενεργοποίηση του PU.1 από τα νευροπεπτίδια μεσολαβείται από τον υποδοχέα CRHR2.***

Όπως διαπιστώσαμε και στην παράγραφο 1.4 τα νευροπεπτίδια χρησιμοποιούν τον υποδοχέα CRHR2 για να επάγουν την ενεργοποίηση της έκφρασης του TLR4. Για να πιστοποιήσουμε ότι κάτι αντίστοιχο ίσχυε και για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1, κύτταρα Raw264.7 επώαστηκαν για 45 λεπτά με τα νευροπεπτίδια UCN, CRH, UCNII ( $10^{-9}$ M) παρουσία ή απουσία του αναστολέα του CRHR2, anti-sauvagine30 και με LPS (10μg/ml), σε συνθήκες απουσίας ορρού. Πυρηνικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και η ικανότητα πρόσδεσης του PU.1 εξετάστηκε με EMSA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 18 που ακολουθεί.



**Εικόνα 18.** Η ενεργοποίηση του PU.1 από τα τρία νευροπεπτιδία γίνεται μέσω του υποδοχέα CRHR2. Παρουσία των νευροπεπτιδίων αυξάνεται αισθητά η ενεργοποίηση του PU.1, παρουσία LPS προκαλείται μείωση, ενώ με επίδραση νευροπεπτιδίων παρουσία anti-sauvagine30 προκαλείται αναστολή της δράσης των νευροπεπτιδίων.

Συγκεκριμένα από την εικόνα 18 βγαίνουν τα εξής συμπεράσματα: Πρώτον, παρουσία και των τριών νευροπεπτιδίων προκαλείται αισθητή αύξηση της ενεργοποίησης του PU.1 σε σχέση με το control. Πιο συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη αύξηση φαίνεται να προκαλεί η UCNII, με την UCN να ακολουθεί και έπειτα η CRH. Δεύτερον, παρουσία LPS παρατηρείται μείωση της ενεργοποίησης του PU.1. Τρίτον παρουσία του ανταγωνιστή του υποδοχέα CRHR2, anti-sauvagine30, δεν παρατηρείται κάποια ιδιαίτερη επίδραση. Τέλος το σημαντικότερο είναι ότι με επίδραση των νευροπεπτιδίων παρουσία του ανταγωνιστή anti-sauvagine30 παρατηρείται μπλοκάρισμα της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην ενεργοποίηση του PU.1. Όπως φαίνεται από την



εικόνα η ζώνη είναι ειδική αφού παρουσία του «κρύου» ανταγωνιστή εξαφανίζεται μόνο αυτή, ενώ παρουσία αντισώματος κατά του PU.1 παρατηρείται supershift.

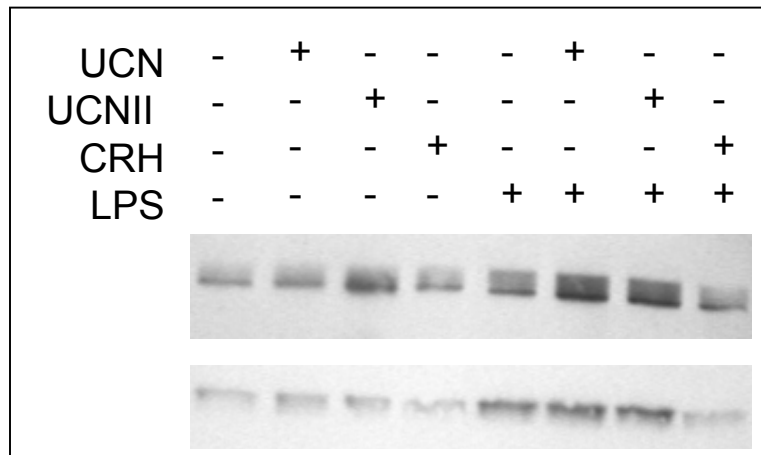
**Συμπερασματικά λοιπόν από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι, η ενεργοποίηση του PU.1 και από τα τρία νευροπεπτίδια διαμεσολαβείται από τον υποδοχέα CRHR2.**

### **3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ UCN, UCNII ΚΑΙ CRH ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΣΗΜΑΤΩΝ**

Η μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στον μοριακό μηχανισμό έγινε άμεσα, μετρώντας την μεταβολή στην ενεργοποίηση ή την έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών, που αποτελούν μόρια-κλειδιά σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον άμεσο προσδιορισμό της ενεργοποίησης ή της έκφρασης ορισμένων πρωτεϊνών ήταν η ανοσοαποτύπωση (Western blotting). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυρίως κινάσες. Για αυτές μετρήθηκε η αύξηση ή η μείωση του ποσοστού της ενεργοποιημένης μορφής της κινάσης, που είναι η φωσφορυλιωμένη της μορφή, και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη συνολική (total) ποσότητα της κινάσης (φωσφορυλιωμένης και μη) μέσα στο κύτταρο, ή με ακτίνη.

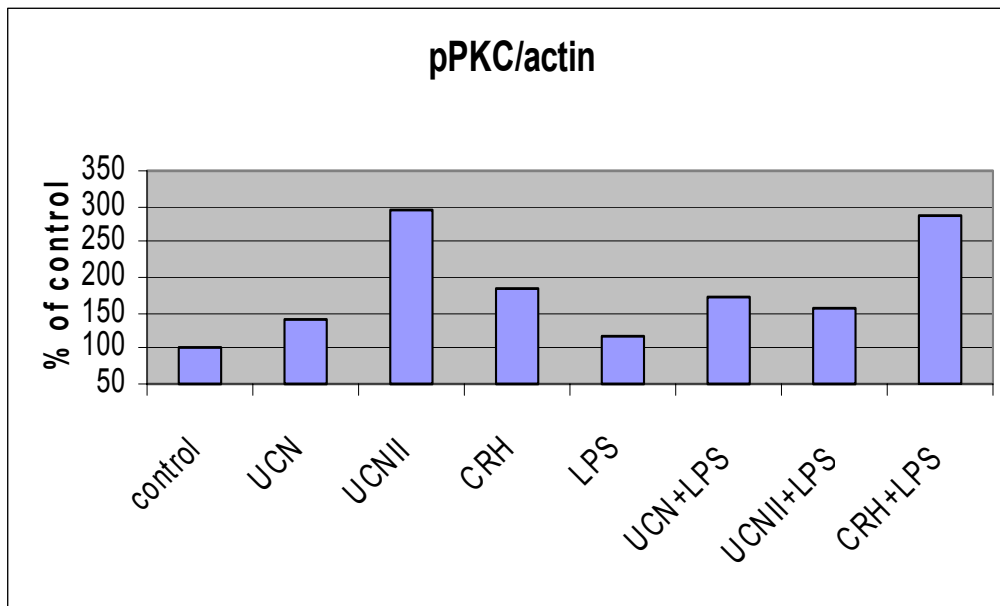
### 3.3.1 Μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην ενεργοποίηση της PKC.

Για τη μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην ενεργοποίηση της κινάσης PKC, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Raw264.7 τα οποία έμειναν σε συνθήκες απουσίας ορού για 20 ώρες, διαδικασία απαραίτητη όταν μετρούνται κινάσες καθώς οι αυξητικοί παράγοντες που υπάρχουν μέσα στον ορό συχνά ενεργοποιούν ένα σημαντικό αριθμό κινασών, και επομένως δεν θα είμαστε σε θέση να καθορίσουμε αν το αποτέλεσμα που μετράμε οφείλεται στην διέγερση από τα νευροπεπτίδια με τα οποία επώαστηκαν τα κύτταρα ή από τον ορό. Στη συνέχεια ακολούθησε η επίδραση των νευροπεπτιδίων UCN, UCNII, CRH ( $10^{-9}$ M) παρουσία ή απουσία LPS ( $10\mu\text{g/ml}$ ) για 1 ώρα, και στη συνέχεια συλλέγονται τα κυτταρικά εκχυλίσματα, από τα οποία θα γίνει ο προσδιορισμός των ενεργοποιημένων κινασών. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα phospho-PKC φαίνεται στην εικόνα 19 που ακολουθεί.



**Εικόνα 19.** Ενεργοποίηση της κινάσης PKC από τα νευροπεπτίδια παρουσία ή απουσία LPS. Ανοσοαποτύπωση με Western blot στην πάνω σειρά εμφανίζεται η ζώνη της PKC και από κάτω η ακτίνη για την κανονικοποίηση των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής αναλύθηκαν με φωτομέτρηση με το πρόγραμμα TINA SCAN, και κανονικοποιήθηκαν με ακτίνη. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 20 που ακολουθεί.



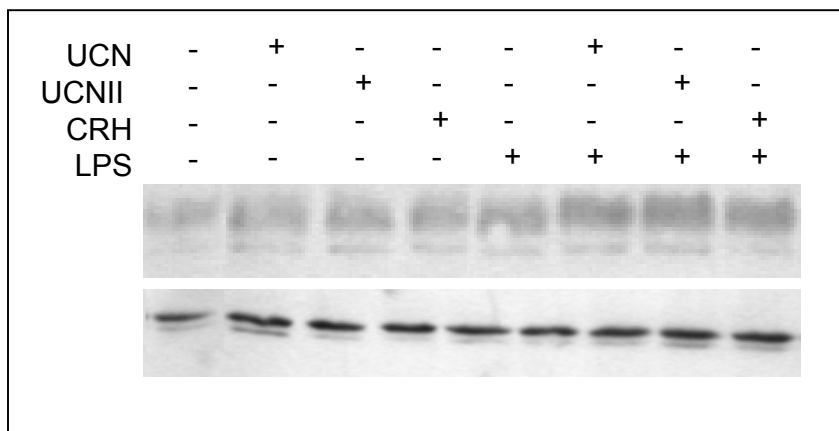
**Πίνακας 20.** Ενεργοποίηση της PKC κινάσης από τα νευροπεπτίδια παρουσία ή απουσία LPS. Φωτομετρική ανάλυση της ανοσοαποτύπωσης με Western blot.

Από την φωτομετρική ανάλυση παρατηρούμε ότι με επίδραση με UCN προκαλείται ενεργοποίηση της PKC σε 140,15%, με επίδραση με UCNII μεγάλη αύξηση σε 295,6%, σε σχέση με τα επίπεδα του control, με CRH αύξηση σε 185,86%, με LPS μικρή αύξηση σε 115,4%. Όταν επιδρούμε νευροπεπτίδια παρουσία LPS και πάλι παρατηρείται αύξηση σε σχέση με τα επίπεδα του control. Πιο συγκεκριμένα με επίδραση UCN παρουσία LPS έχουμε αύξηση σε 173,7%, παρουσία LPS και UCNII αύξηση σε 157,72%. Τέλος με επίδραση CRH και LPS αύξηση σε 287,52%.

**Συμπερασματικά λοιπόν θα λέγαμε ότι με επίδραση νευροπεπτιδίων παρουσία ή απουσία LPS παρατηρείται ενεργοποίηση της κινάσης PKC.**

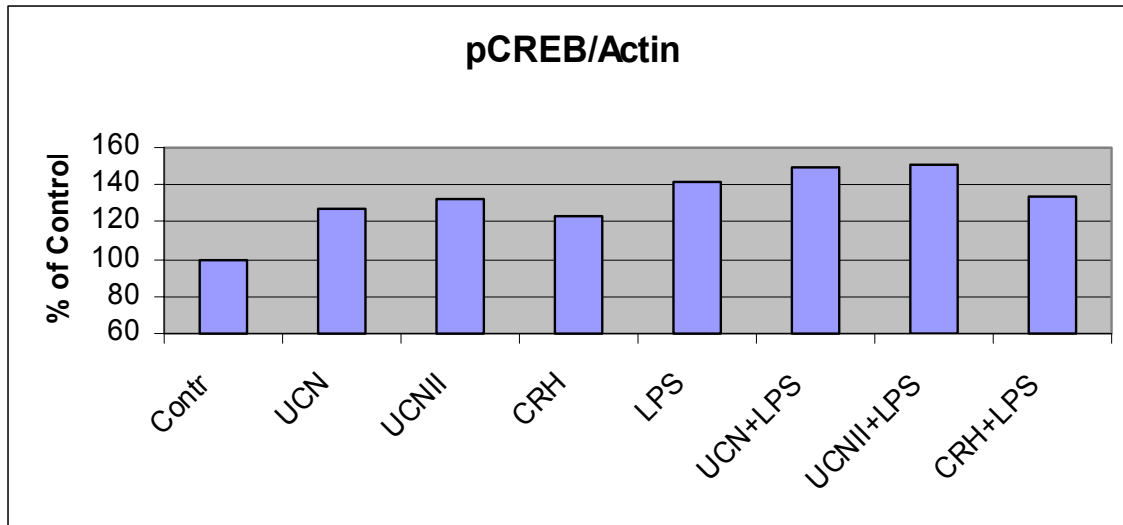
### 3.3.2 Μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB.

Για τη μελέτη της επίδρασης των νευροπεπτιδίων στην φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Raw264.7 τα οποία έμειναν σε συνθήκες απουσίας ορού για 20 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε η επίδραση των νευροπεπτιδίων UCN, UCNII, CRH ( $10^{-9}$ M) παρουσία ή απουσία LPS (10μg/ml) για 1 ώρα, και στη συνέχεια συλλέγονται τα κυτταρικά εκχυλίσματα, από τα οποία θα γίνει ο προσδιορισμός των ενεργοποιημένων κινασών. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα phospho-CREB που αναγνωρίζει την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης φαίνεται στην εικόνα 21 που ακολουθεί.



**Εικόνα 21.** Η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB επάγεται από τα νευροπεπτίδια UCN, UCNII, CRH, παρουσία ή απουσία LPS. Ανοσοαποτύπωση με Western blot στην πάνω σειρά εμφανίζεται η ζώνη της pCREB και από κάτω η ακτίνη για την κανονικοποίηση των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτής αναλύθηκαν με φωτομέτρηση με το πρόγραμμα TINA SCAN, και κανονικοποιήθηκαν με ακτίνη. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στον πίνακα 22 που ακολουθεί.



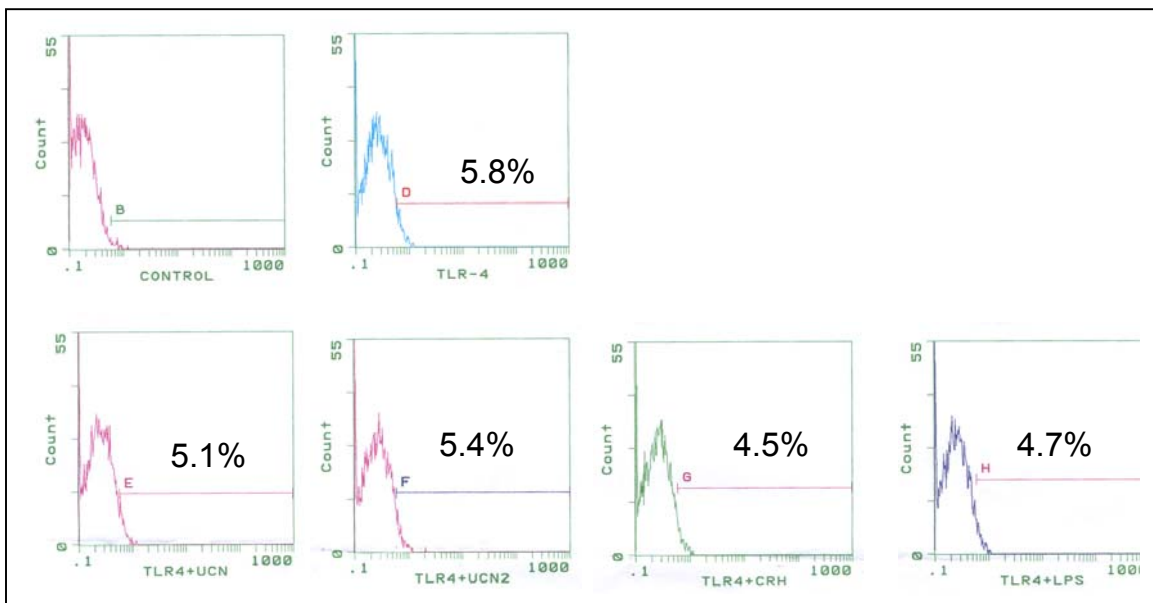
**Πίνακας 22.** Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN, UCNII παρουσία ή απουσία LPS, επάγουν την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB. Παρουσία των νευροπεπτιδίων προκαλείται αύξηση της φωσφορυλίωσης, ενώ ακόμα μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται με επίδραση LPS παρουσία ή απουσία νευροπεπτιδίων.

Όπως είναι φανερό από τη φωτομετρική ανάλυση, παρουσία νευροπεπτιδίων προκαλείται αύξηση της φωσφορυλίωσης του παράγοντα CREB, ενώ παρουσία LPS και νευροπεπτιδίων προκαλείται περαιτέρω αύξηση. Πιο συγκεκριμένα παρουσία UCN έχουμε αύξηση της φωσφορυλίωσης σε 126,5%, παρουσία UCNII αύξηση σε 132,06%, παρουσία CRH αύξηση σε 122,8%. Μεγαλύτερη αύξηση προκαλείται όταν το LPS συνδυαστεί με τα νευροπεπτίδια. Συγκεκριμένα παρουσία μόνο LPS είχαμε αύξηση σε 141,62%. Παρουσία LPS και UCN αύξηση σε 148,95%. Παρουσία LPS και UCNII αύξηση σε 150,92%. Τέλος με επίδραση LPS και CRH παρατηρείται αύξηση σε 133,5 % σε σχέση με το control.

### 3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΟΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ TLR4 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ THP-1.

Αφού διερευνήσαμε την επίδραση των νευροπεπτιδίων στην έκφραση του υποδοχέα TLR4 στην κυτταρική σειρά Raw264.7 από ποντίκια, θέλαμε να δούμε περαιτέρω ποια θα ήταν η επίδραση τους σε ανθρώπινα μονοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η ανθρώπινη μονοκυτταρική σειρά THP-1. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι με επίδραση LPS σε κύτταρα THP-1 δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση στην έκφραση του TLR4, έτσι θέλαμε να δούμε ποια θα ήταν η επίδραση των νευροπεπτιδίων στα επίπεδα έκφρασης του TLR4.

Για τη διερεύνηση αυτή επιδράσαμε σε κύτταρα THP-1 τα νευροπεπτίδια UCN, UCNII και CRH ( $10^{-9}$ M), καθώς και LPS (10μg/ml), για 18 ώρες. Τα κύτταρα βάφτηκαν με το ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τον ανθρώπινο TLR4 (hTLR-4) και μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 23 που ακολουθεί.

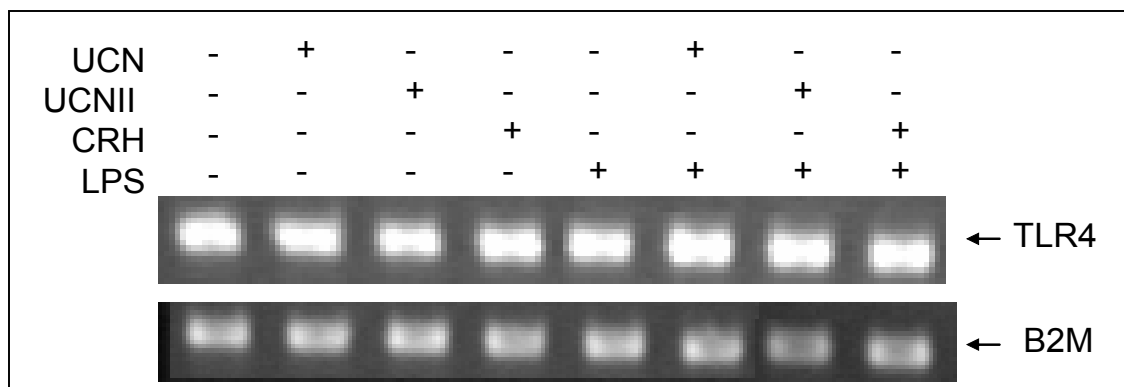


**Εικόνα 23.** Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής σε κύτταρα THP-1. Δεν παρατηρείται καμία ιδιαίτερη επίδραση των νευροπεπτιδίων στην έκφραση του TLR4.

Όπως διαπιστώνει κανείς από την κυτταρομετρία ροής σε κύτταρα THP-1 που έχουμε επιδράσει τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII καθώς και LPS, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην έκφραση του TLR4.

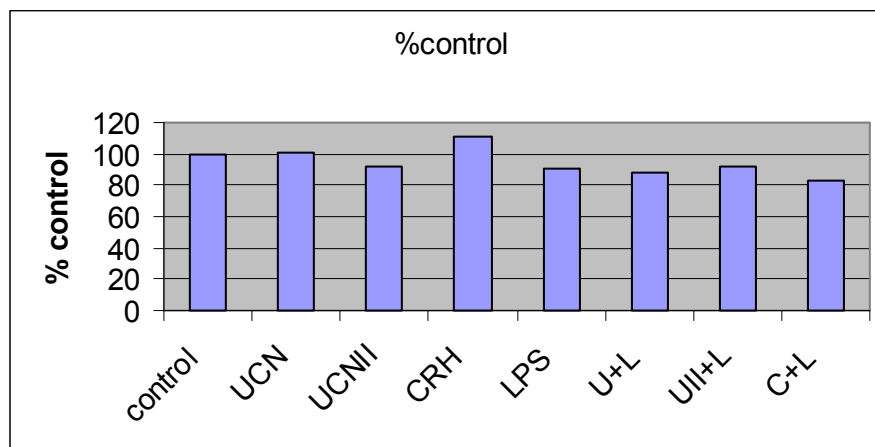
Για να πιστοποιήσουμε ότι όντως δεν παρατηρείται καμία επίδραση στην έκφραση του TLR4 όταν επιδρούμε νευροπεπτίδια σε ανθρώπινα μονοκύτταρα THP-1, πραγματοποιήσαμε επίσης ημι-ποσοτική RT-PCR με ειδικούς εκκινητές για τον hTLR4.

Τα κύτταρα διεγέρθηκαν με τα νευροπεπτίδια CRH, UCN1 και UCN2 σε συγκέντρωση  $10^{-9}$ M για 18 ώρες και με LPS σε συγκέντρωση 10μg/ml. Η αντίδραση της PCR τερματίστηκε στους 35 κύκλους, όπου η ενίσχυση βρισκόταν στην εκθετική φάση, όπως αυτό καθορίστηκε από την καμπύλη ενίσχυσης για κάθε ζεύγος προαγωγέων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 24, κανένα από τα τρία νευροπεπτίδια δεν επάγει ιδιαίτερα την έκφραση του TLR4, το ίδιο ισχύει και για το LPS που άλλωστε ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα που δείχνονται είναι αντιπροσωπευτικά πολλών παρόμοιων πειραμάτων.



**Εικόνα 24.** Τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCN2 δεν επάγουν την έκφραση του TLR4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της RT-PCR για τον TLR4.

Ακολούθως έγινε φωτομετρική ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR με το πρόγραμμα TINA SCAN και αναγωγή των τιμών με βάση την έκφραση της β2-μικροσφαιρίνης σε κάθε δείγμα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 25, μετά από επίδραση των κυττάρων με UCN άλλαξε ελάχιστα ο TLR4 σε 101,19%. Με επίδραση με UCNII παρατηρείται μικρή μείωση του TLR4 σε 91,7% σε σχέση με το control. Επίσης πολύ μικρή αύξηση σε 110,5% σε σχέση με το control παρατηρείται και με την επίδραση του CRH. Αντίθετα το επίπεδο του TLR4 μειώνεται σε 90,2% σε σχέση με το control. Επίδραση UCN παρουσία LPS μειώνει ελάχιστα σε 87,91%, επίδραση με UCNII παρουσία LPS ελάχιστη μείωση σε 91,81% και τέλος με επίδραση CRH παρουσία και πάλι LPS μείωση σε 82,55%. **Συμπερασματικά λοιπόν σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας παρουσιάζεται αμελητέα αλλαγή στα επίπεδα του TLR4 με την επίδραση των νευροπεπτιδίων, ενώ το LPS μειώνει αμελητέα τα επίπεδά του υποδοχέα.**



**Σχήμα 25.** Τα νευροπεπτιδία της οικογένειας CRH δεν προκαλούν ιδιαίτερη επίδραση στην έκφραση του TLR4 σε κύτταρα THP-1. Φωτομετρικός προσδιορισμός της επίδρασης των νευροπεπτιδίων της οικογένειας του TLR4 για την επίδραση στην έκφραση του mRNA του TLR4



## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Το περιφερικό CRH ανιχνεύεται στα σημεία της φλεγμονής, όπου φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό προφλεγμονώδη ρόλο, συμμετέχοντας στην επικοινωνία μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και του ανοσολογικού. Έτσι ανοσοαντιδρών CRH έχει ταυτοποιηθεί σε φλεγμαίνοντες ιστούς πειραματόζωων, αλλά και ανθρώπων. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις για την προ-φλεγμονώδη δράση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH, συγκεκριμένα: έχει παρατηρηθεί ότι η αναστολή του υποδοχέα του CRH έχει σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση της πειραματικά επαγόμενης φλεγμονής, σε ποντίκια. Το CRH επαυξάνει σημαντικά την επαγόμενη από το LPS έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ειδικότερα αυξάνει την έκκριση των κυτοκινών IL-1B, IL-6 και TNF-α (127). Χορήγηση UCN1 σε ανθρώπινα περιφερικά μονοκύτταρα, επάγει την έκκριση της IL-6. Το CRH φαίνεται να ενέχεται άμεσα στην ενεργοποίηση των ιστιό-κυττάρων, επάγοντας την έκκριση ισταμίνης.

Ελάχιστα είναι γνωστά για το μηχανισμό μέσω του οποίου τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH μεσολαβούν την προ-φλεγμονώδη δράση τους. Στα ιστιοκύτταρα τόσο η CRH όσο και η UCN1 επάγουν όπως αναφέρθηκε, την έκκριση ισταμίνης, με τη CRH να δρα μέσω CRHR1 υποδοχέα και την UCN1 να δρα μέσω CRHR2. Έτσι λοιπόν αν και οι υποδοχείς CRHR1 και CRHR2 έχουν αντίθετη δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην περιφέρεια και οι δύο υποδοχείς έχουν την ίδια δράση.

Έχει προταθεί η παρουσία ενός περιφερικού άξονα CRH-ιστιοκυττάρων-ισταμίνης, μέσω του οποίου το CRH με την ενεργοποίηση των υποδοχέων H1 της ισταμίνης προκαλεί τις οξείες εκδηλώσεις της φλεγμονής (αγγειοδιαστολή, αύξηση αγγειακής διαπερατότητας και οίδημα) (128). Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι το CRH μέσω του ίδιου άξονα, αλλά διαμέσου της ενεργοποίησης των υποδοχέων H2 της ισταμίνης, επιδρά με έμμεσο τρόπο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (δενδριτικά, μακροφάγα) και καθορίζει την στροφή της ανοσολογικής απάντησης προς την κυτταρικού ή χυμικού τύπου ανοσία. (128).

Τα μακροφάγα είναι κύτταρα που ενέχονται σε όλα τα στάδια της ανοσολογικής απάντησης. Συνιστούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, φαγοκυτταρώνοντας τα διάφορα παθογόνα πολύ πριν συμβεί η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, στα πλαίσια της ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Είναι κύτταρα φονείς, δρώντας μέσω του μηχανισμού της αντιγόνο-εξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας (ADCC). Διαδραματίζουν

κύριο ρόλο στην παρουσίαση του αντιγόνου στα T-λεμφοκύτταρα και τέλος, μέσω της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών αποτελούν ρυθμιστές της ανοσολογικής απάντησης, στρέφοντας την προς την κυτταρικού τύπου ανοσία (Th1 response).

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων συμβαίνει μέσω διαφόρων αντιγονικών ερεθισμάτων. Η λιποπολυσακχαρίδη (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηριδίων, αποτελεί ισχυρό παράγοντα ενεργοποίησης τους. Το LPS συνδέεται στην διαλυτή πρωτεΐνη τη συνδέουσα του LPS (LPS-binding protein, LBP) και το σύμπλεγμα προσδέεται στο CD14, ένα υποδοχέα της μονοκυτταρικής/μακροφαγικής σειράς. Ακολουθώς το CD14 παρουσιάζει το σύμπλεγμα LPS-LBP σε έναν υποδοχέα υψηλής συγγένειας για το LPS, τον υποδοχέα TLR4, που είναι μέλος της οικογένειας των Toll υποδοχέων. Η αναγνώριση του LPS, από τον TLR4, ενεργοποιεί διάφορες ενδοκυττάρειες οδούς σηματοδότησης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών (129,130).

Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να ερευνήσουμε τον πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH, προκαλούν την ενεργοποίηση των μακροφάγων. Από τη στιγμή που είναι γνωστό ότι το CRH δεν έχει από μόνο του άμεση επίδραση στην έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών από τα μακροφάγα, αλλά απαιτεί την παρουσία LPS, μια πιθανή εξήγηση θα ήταν ότι δρα έμμεσα, επηρεάζοντας την έκφραση του υποδοχέα του LPS. Επιπρόσθετα, η αυξητική επίδραση του CRH δεν ήταν μόνο σε μια κυτοκίνη, γεγονός που θα υποδήλωνε την εσωτερική επικοινωνία σηματοδοτικών μονοπατιών, αλλά σε περισσότερες, γεγονός που υποδεικνύει το αποτέλεσμα ήταν πιο πιθανό να συμβεί στο επίπεδο μετάδοσης σήματος του LPS.

Έχει δειχθεί ότι η απάντηση του ξενιστή στο LPS, η παραγωγή κυτοκινών δηλαδή, σχετίζεται με τον βαθμό έκφρασης του υποδοχέα TLR4 (131). Έτσι, η ενίσχυση της δράσης του LPS από το CRH όσον αφορά την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών θα μπορούσε να ασκείται στο επίπεδο του υποδοχέα μέσω της ενίσχυσης της έκφρασης του TLR4. Εναλλακτικά τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH, είναι δυνατόν να επάγουν την ενδοκυττάρια διαβίβαση σήματος που λαμβάνει χώρα μετά τη διέγερση του TLR4. Η επαγωγή αυτή δύναται να πραγματοποιείται στο μεταγραφικό ή στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Πράγματι τα πειράματα που κάναμε σε μακροφάγα κύτταρα Raw264.7, έδειξαν ότι με επίδραση νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του TLR4. Και τα τρία νευροπεπτίδια CRH, UCN1 και UCN2 αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα γεγονός που επιβεβαιώθηκε με διαφορετικές μεθοδολογίες, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας-

Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του TLR4, όπως αναφέραμε, ρυθμίζονται τόσο στο μεταγραφικό επίπεδο, όσο και στο μετα-μεταγραφικό με αλλαγή της σταθερότητας του mRNA. Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν ότι η επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH λαμβάνει χώρα στο μεταγραφικό και μόνο επίπεδο. Γεγονός που πιστοποιείται αφού η επίδραση κυττάρων Raw264.7 με CRH προκάλεσε την ενεργοποίηση του ελάχιστου προαγωγέα TLR4. Ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν στα κύτταρα αυτά επιδράσαμε τα νευροπεπτίδια UCN1 και UCN2.

Όπως αναφέραμε, ο υποδοχέας CRHR1 προσδένει ειδικά μόνο την UCN1 και την CRH, αντίθετα ο υποδοχέας CRHR2 προσδένει και τα τρία νευροπεπτίδια αλλά ισχυρότερα την UCN2. Από τη στιγμή που η UCN2, είναι ένας ειδικός προσδέτης του υποδοχέα CRHR2, ήταν πολύ πιθανό το αποτέλεσμα των glucocorticoids να μεσολαβείται από τον CRHR2. Επίδραση των κυττάρων με anti-sauvagine30, έναν ειδικό ανταγωνιστή του CRHR2, ανέστειλε την ενεργοποίηση του προαγωγέα του TLR4, τόσο από την UCN2, όσο και από τις UCN1 και CRH, γεγονός που δείχνει ότι και τα τρία αυτά νευροπεπτίδια δρουν μέσω του ίδιου υποδοχέα, CRHR2.

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το LPS μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του TLR4 (132). Ωστόσο όπως διαπιστώσαμε με τα πειράματά μας, ταυτόχρονη χορήγηση οποιουδήποτε από τα τρία νευροπεπτίδια UCN, UCNII ή CRH με LPS, αναστέλλει την αρνητική επίδραση του LPS σε κύτταρα Raw264.7. Το αποτέλεσμα αυτό τεκμηρίωσε περαιτέρω την προηγούμενη υπόθεσή μας, ότι δηλαδή η αυξητική επίδραση του CRH στην LPS-επαγόμενη έκφραση κυτοκινών, λαμβάνει χώρα στο επίπεδο μεταγραφής του TLR4.

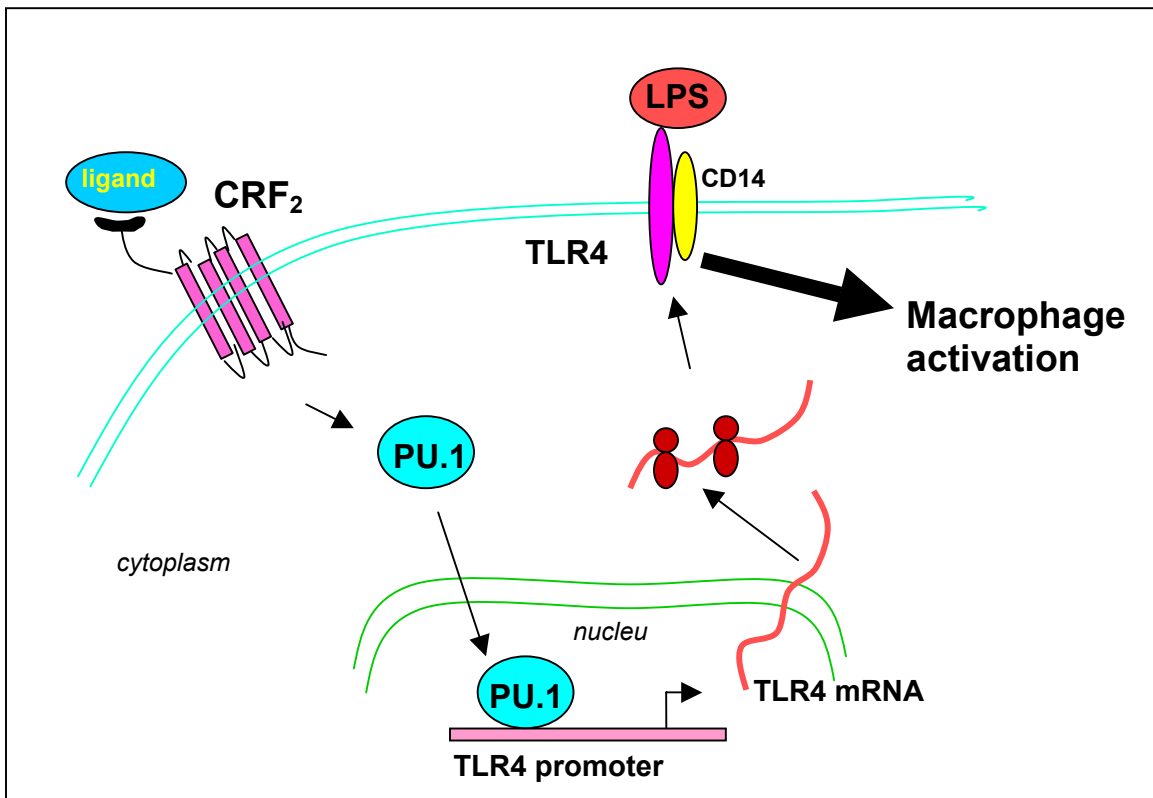
Τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα TLR4 παρουσιάζονται ενισχυμένα σε διάφορες καταστάσεις φλεγμονής, ιδιαίτερα στον τόπο της φλεγμονής. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα TLR4 έχουν ανιχνευθεί σε αρθρικό θύλακο ρευματοειδούς αρθρίτιδας, και σε φλεγμονώδεις παθήσεις στον πνεύμονα (133). Σε αντίστοιχες θέσεις φλεγμονής

έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα CRH, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγηθεί από τα αποτελέσματά μας όπου συνδέονται άμεσα τα δύο αυτά γεγονότα.

Τα πειράματά μας έδειξαν, ότι ο προαγωγέας του TLR4, ρυθμίζεται στο μεταγραφικό επίπεδο, κυρίως μέσα από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1. Όπως αναφέραμε και στην εισαγωγή ο ελάχιστος προαγωγέας περιέχει τρεις θέσεις πρόσδεσης για τον μεταγραφικό παράγοντα PU.1. Ο ειδικός μεταγραφικός παράγοντας PU.1, ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Ets. Εκφράζεται στα αιματοποιητικά κύτταρα και είναι απαραίτητος για την για την ωρίμανση και την ανάπτυξη των μυελοειδών κυττάρων και την διαφοροποίηση των μακροφάγων. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός, ότι ποντίκια ανάκανα να παράγουν PU.1, έχουν παντελή έλλειψη μακροφάγων. Ο PU.1 είναι επίσης σημαντικός για την διαφοροποίηση και ωρίμανση των osteoclast κυττάρων. Είναι παρών στα μικρογλία, όπου πολλαπλασιάζεται ισχυρά κατά την διάρκεια ισχαιμικού τραυματισμού. Συνεπώς ο μεταγραφικός παράγοντας PU.1, είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση και ανάπτυξη των μακροφάγων. Έχει αναφερθεί, ότι συμμετέχει στην ανοσορύθμιση αφού επάγει την έκφραση του υποδοχέα μ- των οπιοειδών στα μακροφάγα. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι, το ερέθισμα που δίνουν τα νευροπεπτίδια CRH, UCN, UCNII, όταν προσδέονται στον υποδοχέα CRHR2, για την μετάδοση σήματος, επάγει την μετατόπιση του PU.1 στον πυρήνα και την ικανότητα πρόσδεσής του στον προαγωγέα του TLR4.

Για να μελετήσουμε την επίδραση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων οδών διαβίβασης σήματος και μεταγραφικών παραγόντων που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, εξετάσαμε την επίδραση των νευροπεπτιδίων αυτών στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης PKC. Πιο συγκεκριμένα, είδαμε ότι τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH, μέσω των υποδοχέων τους, προκαλούν αύξηση στο ενδοκυττάριο cAMP και επομένως ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB. Πράγματι δείξαμε ότι τα νευροπεπτίδια σε κύτταρα Raw264.7, επάγουν την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB. Είδαμε επίσης ότι τα νευροπεπτίδια προκαλούν την ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης PKC.

Συμπερασματικά θα λέγαμε, ότι τα πειράματά μας στην κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού, Raw264.7, έδειξαν ότι τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII, σηματοδοτούν μέσω του υποδοχέα CRHR2, προκαλώντας ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1, ο οποίος τελικά προσδένεται στον υποκινητή του TLR4 και επάγει την μεταγραφή του. Το σήμα του CRHR2 αναστέλλει μερικώς το αρνητικό αποτέλεσμα του LPS στην έκφραση του υποδοχέα TLR4, γεγονός που μας παρέχει έναν πιθανό μηχανισμό για την προ-φλεγμονώδη δράση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στα μακροφάγα. Ο μηχανισμός που προτείνουμε παρουσιάζεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα



Αφού λοιπόν, δείξαμε ότι τα νευροπεπτίδια της οικογένειας CRH, επιδρούν στην ενεργοποίηση των μακροφάγων ποντικού μέσω τη έκφρασης του υποδοχέα TLR4, θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση των νευροπεπτιδίων αυτών στην έκφραση του TLR4 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό επελέγη η κυτταρική σειρά THP-1. Από τη βιβλιογραφία ήταν γνωστό ότι το LPS έχει ελάχιστη επίδραση στην μείωση των επιπέδων έκφρασης του TLR4 σε μονοκύτταρα THP-1, και έτσι θέλαμε να δούμε τι επίδραση θα είχαν τα μακροφάγα. Τα πειράματα μας, έδειξαν ότι και τα τρία νευροπεπτίδια έχουν ελάχιστη επίδραση στην έκφραση του υποδοχέα TLR4, γεγονός που επιβεβαιώθηκε με δύο διαφορετικές τεχνικές. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η κυτταρική σειρά THP-1 προέρχεται από μύελωμα και δεν διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά των μακροφάγων στο βαθμό που τα διαθέτουν τα κύτταρα Raw264.7. Για παράδειγμα τα THP-1 δεν εκκρίνουν IL-1 κατά τη διέγερσή τους και έχουν μειωμένες ικανότητες φαγοκυτταρώσεως. Τα πειράματα αυτά θα πρέπει να συνεχισθούν χρησιμοποιώντας πρωτογενή ανθρώπινα μακροφάγα και μονοκύτταρα από δότες.

## **5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



Σωρεία δεδομένων υποστηρίζουν την ύπαρξη επικοινωνίας ανάμεσα στο ανοσολογικό και το διάχυτο νευροενδοκρινικό σύστημα. Τα δύο συστήματα διαθέτουν κοινούς υποδοχείς και χρησιμοποιούν κοινά διαμεσολαβητικά μόρια με τη μορφή ορμονών και κυτοκινών, για τη μεταξύ τους επικοινωνία και αλληλορύθμιση. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, έχουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση της απάντησης του ξενιστή σε λοιμώδη ή φλεγμονώδη εν γένει ερεθίσματα.

Βιοενεργά νευροπεπτίδια και οι υποδοχείς τους, είναι παρόντα τόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όσο και στους περιφερικούς ιστούς. Η οικογένεια νευροπεπτιδίων CRH σχετίζεται με την απόκριση στο στρες. Στους ανθρώπους τα νευροπεπτίδια CRH είναι παρόντα στο Κ.Ν.Σ. και συντονίζουν την απόκριση του ανθρωπίνου σώματος στο στρες. Στους περιφερικούς ιστούς εκκρίνονται από τις απολήξεις των συμπαθητικών νευρώνων ή από διάφορους κυτταρικούς τύπους. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκφράζουν πεπτίδια CRH και τους υποδοχείς τους. Κύτταρα όγκων συχνά εκκρίνουν βιοενεργά νευροπεπτίδια, μερικά από τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη των όγκων και την δυνατότητα μετάστασης. Πολλά είδη καρκίνων εκφράζουν νευροπεπτίδια CRH. Πολλά στοιχεία προτείνουν την συμμετοχή των νευροπεπτιδίων στο ανοσοποιητικό. Το τοπικά εκφραζόμενο CRH έχει προφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ το μπλοκάρισμα του υποδοχέα CRHR2 προκαλεί σημαντική εξασθένιση της φλεγμονής.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του μηχανισμού δράσης των νευροπεπτιδίων του στρες στη ρύθμιση της ανοσοαπάντησης και της φλεγμονής στο επίπεδο των μακροφάγων. Η παρούσα έρευνα θα συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης του νευροενδοκρινικού συστήματος με το ανοσοποιητικό και θα αναλύσει τους μηχανισμούς δράσης των ορμονών του στρες μέσα από τους οποίους θα μπορέσουμε να εξηγήσουμε τον ρόλο των νευροπεπτιδίων στις τοπικές φλεγμονές, αποκομίζοντας στοιχεία για την αλληλεπίδραση του άξονα του στρες με το ανοσοποιητικό και καθορίζοντας πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους για την θεραπεία των επαγόμενων από το στρες φλεγμονών.

Το σύστημα των μονοκυττάρων/μακροφάγων έχει κεντρικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα συμμετέχοντας σε όλα τα στάδια της ανοσολογικής απάντησης. Με βάση τις παρατηρήσεις μας μπορούμε να προτείνουμε ότι το CRH είναι δυνατόν να συμμετέχει στην ανοσορύθμιση, επηρεάζοντας την έκκριση των προφλεγμονωδών

κυτοκινών από τα μακροφάγα. Πειράματα έγιναν για να διερευνηθεί περαιτέρω ο μοριακός μηχανισμός της δράσης των πεπτιδίων αυτών στην ενεργοποίηση των μακροφάγων. Δείξαμε ότι η ενεργοποίηση αυτή ασκείται στο επίπεδο μεταγραφής του TLR4. Διαπιστώσαμε ότι τα νευροπεπτίδια αυξάνουν το επίπεδο έκφρασης του mRNA του TLR4 και προτείναμε τον εξής μηχανισμό: τα νευροπεπτίδια CRH, UCN και UCNII, σηματοδοτούν μέσω του υποδοχέα CRHR2, προκαλώντας ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα PU.1, ο οποίος τελικά προσδένεται στον προαγωγέα του TLR4 και επάγει την μεταγραφή του. Το σήμα του CRHR2 αναστέλλει μερικώς το αρνητικό αποτέλεσμα του LPS στην έκφραση του υποδοχέα TLR4, γεγονός που μας παρέχει έναν πιθανό μηχανισμό για την προ-φλεγμονώδη δράση των νευροπεπτιδίων της οικογένειας CRH στα μακροφάγα.

Η ενεργοποίηση του PU.1 από το σήμα του CRHR2, μπορεί να μας οδηγήσει στην διεκρίνιση του ρόλου των νευροπεπτιδίων CRH στην διαφοροποίηση και ωρίμανση των μυελοειδών κυττάρων. Ανοσοδραστικό CRH και UCN1 είναι παρόντα στο μυελό των οστών και ο ρόλος τους δεν έχει διεκρινιστεί ακόμα. Είναι λοιπόν πιθανόν, ότι μπορεί να συμμετέχουν στην έκφραση του TLR4 και στον καθορισμό της διαφοροποίησης των κυττάρων.

Συνολικά, η συγκεκριμένη εργασία, παρέχει ένα μοντέλο για τη μελέτη του ρόλου των νευροπεπτιδίων στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, αποδεικνύοντας έτσι μια νέα κατηγορία ανοσορυθμιστών, ανεξάρτητων μεν αλλά στενά συνδεδεμένων με τις κυτοκίνες και χημειοκίνες. Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτών των μορίων δύναται να εξηγήσει την παρουσία τους σε περιοχές φλεγμονής και να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους φλεγμονοδών παθήσεων.

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Janeway – Travers. Κλινική Ανοσοβιολογία, ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, δεύτερη έκδοση
2. Janeway CA, Walport M, SHomichk M. (2001) Immunobiology, fifth edn
3. Volt WA, G. B., Hammarskjold ML, Kadner RJ (1996). Essentials of medical microbiology, fifth edn
4. Romagnani S., (1991) Human TH1 and TH2 subsets : doubt no more. Immunol Today 12, 256-257
5. Nussenzweig, M.C., Shaw, A.C., Sinn, E., Danner D.B., Holmes K.L., Morse H.C. and Leder P. (1987) Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. Science 236, 816-819
6. De Franco AL (1987). Molecular aspects of B-lymphocyte activation. Annu Rev Cell Biol 3, 143-178
7. Banchereau J., and Russet F. (1992). Human B lymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation. Adv Immunol 52, 125-262
8. Nagler A., Lanier L., Cwirla S.,and Phillips JH (1998). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. J Immunol 143, 3183-3191
9. Lanier L, Rutienberg J, and Phillips JH (1998). Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. J Immunol 141, 3478-3485
10. Neefjes J, and Momburg F ( 1993). Cell biology of antigen presentation. Curr Opin Immunol 5, 27-34
11. Blalock JE (1999). Proopiomelanocortin and the immune-neuroendocrine connection. Ann N Y Acad Sci 885, 161-172
12. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, and Besedovsky HO (1987). Corticotropin –releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1 . Science 238, 524-526
13. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, and Vale W (1987). IL-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. Science 238, 522-524
14. Kapcala LP, Chautard T, and Eskay RL (1995). The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress. Ann N Y Acad Sci 771, 419-437

15. Chrousos GP (1995). Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin releasing hormone perspective. *Endocrin Metab Clinics NA* 21, 833-858
16. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, and Vale W (1987). IL-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238, 522-524
17. Turnbull AV, and Rivier CL (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79, 1-71
18. Berkenbosch F, de Goeij DE, Rey A, Tilders F, and Besedovsky HO (1989). Neuroendocrine, sympathetic and metabolic responses induced by IL-1. *Neuroendocrinology* 50, 570-576
19. Naitoh Y, Fukata J, Tominaga T, Nakai Y, Tamai S, Mori K, and Imura H. (1998). IL-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 155, 1459-1463
20. Lyson K, McCann, SM (1991). The effect of IL-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro. *Neuroendocrinology* 54, 262-266
21. Bernardini R, Kamilaris TC, Calogero AE, Johnson EO, Gomez MT, Gold PW and Chrousos GP (1990). Interactions between tumor necrosis factor-alpha, hypothalamic corticotrophin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 126, 2876-2881
22. Rivier C, Chizzonite R, and Vale W (1989a). In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through IL-1. *endocrinology* 125, 2800-2805
23. Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH and Neta R (1993). Synergistic roles of IL-6, IL-1 and TNF in the adrenocorticotropin response to bacterial LPS in vivo. *Endocrinology* 132, 946-952
24. Blalock JE and Smith EM (1980). Human leukocyte interferon: structural and biological relatedness to adrenocorticotrophic hormone and endorphins. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5972-5974
25. Smith EM and Blalock JE (1981). Human leukocyte production of corticotrophin and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7530-7534

26. Sanders VM, Baker RA, Ramer Quinn DS, Kasprovicz DJ, Fuchs BA, and Street NE (1997). Differential expression of the beta 2-adrenergic receptor by TH1 and TH2 clones: implications for cytokine production and B cell help. *J Immunol* 158, 4200-4210
27. Borger P, Kauffman HF, Postma DS and Vallenga E (1996) IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol* 156,1333-1338
28. Harris G. (1948). Neural control of the pituitary gland. *Phys Rev* 28
29. Saffran MSA, (1955). The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vivo. *Can J Biochem Physiol*, 33-40.
30. Guillemin RRB, (1955). Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 57, 599
31. Vale W, Spiess J, Rivier C and Rivier J (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397
32. Charlton BG, Ferrier IN, and Perry RH (1987). Distribution of corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain. *Neuropeptides* 10, 329-334
33. Favrod-Coune CA, Gaillard RC, Langevin H, Jaquier MC, Dolci W, and Muler AF (1986). Anatomical localization of corticotropin-releasing activity in the human brain. *Life Sci* 39, 2475-2481
34. Takahashi K, Mouri T, Yamamoto T, Itoi K, Murakami O, Yoshinaga K, and Sasano N (1989). Corticotropin releasing hormone in the human hypothalamus, Free-floating immunostaining method. *Endocrinol Jpn* 36, 275-280
35. Charlton BG, Ferrier IN, and Perry RH (1987). Distribution of corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain. *Neuropeptides* 10, 329-334
36. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, and Shizume K. (1984b). Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 59, 861-866
37. Kelley M, and Kowall N (1989). Corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons persist throughout the brain in Alzheimer's disease. *Brain Res* 501, 392-396
38. Sasaki A, Tempst P, Liotta AS, Margioris AN, Hood LE, Kent SB, Sato S, Shikawa O, Yoshinaga K, and Krieger DT (1988). Isolation and characterization of a

corticotrophin-releasing hormone-like peptide from human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 67, 768-773

39. Allolio B, Hoffmann J, Linton EA, Winkelmann W, Kusche M, and Schute HM (1990). Diurnal salivary cortisol patterns during pregnancy and after delivery: relationship to plasma corticotrophin-releasing-hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 33, 279-289

40. Mastorakos G, Webster EL, and Chrousos GP (1993a). Corticotropin-releasing hormone and its receptors in the ovary: physiological implications. *Ann N Y Acad Sci* 687, 20-28

41. Makrigiannakis a, Zoumakis E, Margioris AN, Theodoropoulos P, Stournaras C and Gravanis A (1995). The corticotrophin releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 185-189

42. Venihaki M, gravanis A and Margioris AN (1997). Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotrophin releasing hormone. *Endocrinology* 138, 698-704

43. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, and Shizume K (1984b). Distribution and characterization of immunoreactive corticotrophin releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 59, 861-866

44. Nicholson WE, DeCherney GS, Jackson RV, and Orth DN (1987). Pituitary and hypothalamic hormones in normal and neoplastic adrenal medullae: biologically active corticotropin releasing hormone and corticotropin. *Regul Pept* 18, 173-188

45. Ciocca DR, Puy LA, Fasoli LC, Tello O, Aznar JC, Gago FE, Papa SI, and Sonogo R (1990). Corticotropin releasing hormone, luteinizing hormone releasing hormone, growth hormone releasing hormone and somatostatin-like immunoreactivities in biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 15, 175-184

46. Plotsky PM, and Vale W (1984). Hemorrhage-induced secretion of corticotrophin releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* 114, 164-169

47. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Rivier J and Vale W (1993). Expression cloning of a human corticotrophin releasing factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8967-8971

48. Lederis K, Lettler A, McMaster D, Moore G and Schlesinger D (1982). Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science* 218, 162-165
49. Montecucchi PC, Anastasi A, de Castiglione R, and Erspamer V (1980). Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res* 16, 191-199
50. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C and et al. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotrophin-releasing factor. *Nature* 378, 287-292
51. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, and Vale W (1996). Cloning and characterization of human Urocortin. *Endocrinology* 137, 3896
52. Bamberger CM, Wald M, Bamberger A, Ergun S, Beil F, and Schulte HM (1998). Human lymphocytes produce Urocortin but not corticotropin releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 83,708-711
53. Baigent S, Lowry PJ (2000). mRNA expression profiles for corticotropin releasing factor (CRF) Urocortin CRH receptors and CRH-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endo* 25, 43-52
54. Kageyama K, Bradbury MJ, Zhao L, et al (1999) Urocortin messenger ribonucleic acid: tissue distribution in the rat and regulation thymus by LPS and glucocorticoids. *Endocrinology* 140, 5651-5658
55. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W et al (2001). Identification of Urocortin III an additional member of the corticotropin releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7570-7575
56. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, and Lightman SL (1990). Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immunol* 4, 67-73



57. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al (1992). Local secretion of CRH in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 90, 2555-2564
58. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, and Vale W (1996). Cloning and characterization of human Urocortin. *Endocrinology* 137, 3896
59. Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, and Redei E (1993). CRF mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7104-7108
60. Redei E (1992). Immuno-reactive and bioactive CRF in rat thymus. *Neuroendocrinology* 55, 115-118
61. Ottaviani E, Franchini A, and Francheschi C (1998). Presence of immunoreactive CRH and cortisol molecules in invertebrate haemocytes and lower and higher vertebrate thymus. *Histochem J* 30, 61-67
62. Bileviciute H, Ahmed M, Bergstrom et al (1997). Expression of CRF in peripheral nervous system of the rat. *Neuroreport* 8, 3127-3130
63. Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, and Redei E (1993). CRF mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7104-7108
64. Kravchenko IV and Furalev VA (1994). Secretion of immunoreactive CRF and adrenocorticotropin hormone by T- and B- lymphocytes in response to cellular stress factors. *Biochem Biophys Res Comm* 204, 828-834
65. Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergun S, Beil FU, and Shuttle HM (1998). Human lymphocytes produce Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 708-711
66. Baigent SM, and Lowry PJ (2000a). mRNA expression profiles for Corticotropin releasing factor (CRF), Urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 24, 53-63
67. Wynn PC, Aguilera G, Morell J and Catt KJ (1983). Properties and regulation of high affinity pituitary receptors for CRF. *Biochem Biophys Res Commun* 110, 602-608
68. Grigoriadis DE, Zaczek R, Pearsall BM and De Souza EB (1989). Solubilization of high affinity CRF receptors from rat brain: Characterization of an active digitonin solubilized receptor complex. *Endocrinology* 125, 3068-3077

69. Aguilera G, Milan MA, Hauger RL, and Catt KJ (1987). CRF receptors: distribution and regulation in brain, pituitary and peripheral tissues. *Ann N Y Acad Sci* 512, 48-66
70. Mastorakos G, Webster EL, Fredman TC, and Chrousos GP (1993b). Immunoreactive CRH and its binding sites in the rat ovary. *J Clin Invest* 92, 961-968
71. Audhya T, Jain R, and Hollander CS (1991). Receptor mediated immunomodulation by CRF. *Cell Immunol* 134, 77-84
72. Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J and Vale W (1986). CRF receptor mediated stimulation of adenylate cyclase activity in rat brain. *Brain Res* 381, 49-57
73. Battaglia G, Webster EL, and De Souza EB (1987). Characterization of CRF receptor mediated adenylate cyclase activity in the rat central nervous system. *Synapse* 1, 572-581
74. Grigoriadis DE, Lovenberg TW, Chalmers BT, Liaw C, and De Souza EB (1996b). Characterization of CRF receptors subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 780, 60-80
75. Grammatopoulos DK, and Chrousos GP (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13, 436-444
76. Chen C, Dagnino R, De Souza EB, Grigoriadis DE et al (1996). Design and synthesis of a series of non-peptide high affinity human CRF 1 receptor antagonists. *J Med Chem* 39, 4358-4360
77. Ross PC, Kostas CM, and Ramabhadran TV (1994). A variant of the human CRF receptor: cloning , expression and pharmacology. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 1836-1842
78. Lovenberg TW, Liaw CW, grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT et al (1995b). Cloning and characterization of a functionally distinct CRF receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 836-840
79. Kishimoto T, Pearse RV, Lin Cr, and Rosenfeld MG (1995). A sauvagine/CRF receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1108-1112
80. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Rivier J and Vale W (1993). Expression cloning of a human corticotrophin releasing factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8967-8971
81. Lovenberg TW, Liu C, Clevenger W, Chalmers DT and De Souza EB (1995a). CRF2 alpha and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* 136, 4139-4142

82. Grammatopoulos DK, and Chrousos GP (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13, 436-444
83. Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin Cr et al (2000). Deletion of CRHR2 reveals an anxiolytic role for CRH receptor 2. *Nat Genet* 24, 415-419
84. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Rivier J and Vale W (1993). Expression cloning of a human corticotrophin releasing factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8967-8971
85. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, and Vale W (1996). Cloning and characterization of human Urocortin. *Endocrinology* 137, 3896
86. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, rivier C and et al. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I amd to corticotrophin –releasing factor. *Nature* 378, 287-292
87. Chalmers DT, Lovenberg TW and De Souza EB (1995). Localization of a novel CRF receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15, 6340-6350
88. Li C, Vaughan J Sawchenco PE, and Vale W (2002). Urocortin III immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 CRF receptor expression. *J Neurosci* 22, 991-1001
89. Karalis KP, Sano H, Redwine J et al (1991). Autocrine or paracrine inflammatory actions of CRH in vivo. *Science* 254, 421-423
90. Van Tol EAF, Petrusz P, Lund PK, Yamauchi M and Sartor RB (1996). Local production of CRH is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 39, 385-392
91. Poliak S, Mor F, Conlon P et al (1997). Stress and autoimmunity: the neuropeptides CRF and Urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. *J Immunol* 158, 5751-5756
92. Mc Gillis JP, Park A, Rubin-Fletter P et al (1989). Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by CRF. *J Neurosci Res* 23, 346-377

93. Carr DJ, De Costa PR, Jacobson AE et al (1990). Corticotropin releasing hormone augments natural killer cell activity through a naxalone-sensitive pathway. *J Neuroimmunol* 28, 53-61
94. Singh VK (1989). Stimulatory effect of corticotropin releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and IL-2 receptor expression. *J Neuroimmunology* 23, 257-262
95. Alroy I, and Yarden Y (1997). The erbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand receptor interactions. *FEBS Lett* 410, 83-86
96. Riese DJ and Stern DG (1998). Specificity within the EGF family/erbB receptor family signaling network. *Bioassays* 20, 41-48
97. Holmes WE, Sliwkouski MX, Akita RW, et al (1992). Identification of heregulin: a specific activator of p18erbB2. *Science* 256, 1205-1210
98. Ablkofer K, Lai C.(2000). Role of neuregulin in glial cell development. *Glia* 29, 104-111
99. Peles E, Bacus SS, Koski RA, et al (1992). Isolation of the Neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44KDa glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* 69, 205-216
100. Nomura N, Miyajima N, Sazuca T, Tanaca A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K and Tabat S (1994). *DNA Res* 1, 27-35
101. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE and Testa JR (1996). *Genomics* 32, 486-488
102. Medzhitov R, Preston-Hulburt P, and Janeway CA (1997). *Nature* 388, 394-397
103. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA and Bazan JF (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 588-593
104. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, and Akira S (1999). *Gene* 231, 59-65
105. Du X, Poltorak A, Wei Y, and Beutler B (2000). *Eur Cytokine Netw* 11, 362-371
106. Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MKB and Dower SK (2002). Toll like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 32, 984-989

107. Ruslan Medzhtov and Charles Janeway (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Immunology* 8, 452-456
108. Heine H, Rietschel ET and Ulmer AJ (2001). The biology of endotoxin. *Mol Biotechnol* 19, 27-296
109. Galanos C, Luderitz O, Rietschel ET, et al (1985). Synthetic and natural E. Coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 148, 1-5
110. Lien E et al (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105, 497-504
111. Jean Luc Imler and Jules A Hoffmann (2001). Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11, 304-311
112. DeLotto Y, and DeLotto R (1998). Proteolytic processing of the Drosophila Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mech Dev* 72, 141-148
- Shen B and Manley JL (1998). Phosphorylation modulates direct interactions between the Toll Receptor, Pelle kinase and Tube. *Development* 125, 4719-4728
113. Lu Y et al (2001). The antibacterial arm of the Drosophila innate immune response requires an Ikb kinase. *Genes Dev* 15, 104-110
114. Wasserman SA, (2000). Toll signaling: the enigma variations. *Curr Opin Genet Dev* 10, 497-502
115. Tsuneyasu Kaisho and Shizuo Akira (2001). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *BBA –Molecular Cell Research* 1589, 1-13
116. Rehli M, Poltorak A, et al (2000). PU.1 and Interferon Consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* 275, 9773-9781
117. Michael Rehli (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology* 22, 375-378
118. Muzio M, et al (2000). Differential expression and regulation of TLR in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004
119. Matsugushi T, et al (2000). Gene expressions of TLR-2, but not TLR4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol* 165, 5767-5772

120. Poltorak A, et al (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science* 282, 2085-2088
121. Chaudhary PM et al (1998). Cloning and characterization of two Toll/interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91, 4020-4027
122. Raschke WC, Baird S, Ralph P and Nakoiz I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267
123. Michael Rehli (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology* 22, 375-378
124. Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
125. Wasserman SA, (2000). Toll signaling: the enigma variations. *Curr Opin Genet Dev* 10, 497-502
126. Lu Y et al (2001). The antibacterial arm of the *Drosophila* innate immune response requires an Ikb kinase. *Genes Dev* 15, 104-110
127. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A and Margioris A (2002), Corticotropin releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in LPS-induced endotoxin shock in mice. *Infection and immunity* 70, 6068-6074
128. Elenkov IJ and Chrousos G.P. (1999). Stress hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 10, 359-368
129. Vasselon T and Detmers PA (2002). Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun* 70, 1033-1041
130. Cario et al. (2000). LPS activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like responses. *J Immunol* 164, 966-972
131. Kalis C, Kanzler B et al (2003). Toll-like receptor 4 expression levels determine the degree of LPS-susceptibility in mice. *Eur J Immunol* 33, 798-805
132. Rehli M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology* 8, 375-378
133. O'Neill LA. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2003 Aug;3(4):396-403