

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



Διπλωματική εργασία με θέμα:

«Έλεγχος των αποπρωτικών δράσεων συνθετικού αναλόγου του ενδογενούς Νευροστεροειδούς Διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) »

Επόπτης καθηγητής :

κ. Χαραλαμπίδης Ιωάννης

Λέκτορας Φαρμακολογίας

Υπεύθυνη καθηγήτρια :

κ. Σιδηροπούλου Κυριακή

Λέκτορας Βιολογίας

Εκπόνηση εργασίας :

Εμμανουέλα Λεάνδρου

Φοιτήτρια βιολογίας

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που συνέβαλαν ώστε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Καταρχήν, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους κ. Χαραλαμπίδου και κ. Γραβάνη που με καλωσόρισαν στο εργαστήριό τους, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, καθώς και στην κ. Σιδηροπούλου που δέχτηκε να αναλάβει την παρούσα εργασία .

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διδακτορικό φοιτητή Σήφη Πεδιαδιτάκη για την υπομονή του, την βοήθειά του καθόλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, καθώς και για όλες τις γνώσεις που μου μετέφερε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Πασχάλη, την Λένα και την Αλεξάνδρα, τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για την καθημερινή ευχάριστη ατμόσφαιρα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1) ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
2) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
2.1) ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΕΣ.....	5
2.1.1) Trk υποδοχείς.....	5
2.1.2) p75NTR υποδοχέας.....	7
2.2) ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ.....	9
2.2.1) DHEA.....	9
2.2.2) Συνθετικά ανάλογα της DHEA.....	11
2.3) ΑΠΟΠΤΩΣΗ.....	12
2.3.1) Νευροστεροειδή και απόπτωση.....	12
2.3.2) Απόπτωση και κασπάσες.....	13
2.4) ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	14
3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	24
5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

1) ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νευροτροφίνες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που επάγουν την επιβίωση, την ανάπτυξη και την λειτουργία των νευρώνων. Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί τέσσερις νευροτροφίνες, ο NGF (Nerve Growth Factor), ο BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), ο NT-3 (Neurotrophin-3), και ο NT-4 (Neurotrophin-4), οι οποίες αλληλεπιδρούν με δυο διακριτούς υποδοχείς, ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων Trk και τον p75NTR (p75 neurotrophin Receptor) που είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων TNF (tumor necrosis factor). Η αλληλεπίδραση των νευροτροφινών με τον p75NTR θεωρείται ότι οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, ενώ η αλληλεπίδραση με τον Trk υποδοχέα σηματοδοτεί την επιβίωση (Chao, Rajagopal, & Lee, 2006). Το νευροστεροειδές διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) συντίθεται στον εγκέφαλο από νευρώνες και μικρογλοιακά κύτταρα και ρυθμίζει την νευρική επιβίωση και νευρογένεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης (Charalampopoulos, Remboutsika, Margioris, & Gravanis, 2008). Έχει δειχθεί ότι η DHEA ενεργεί ως νευροτροφικός παράγοντας, προστατεύοντας νευρικά κυττάρα από αποπτωτικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkA και p75NTR (Lazaridis et al., 2011). Έχει αποδειχθεί, επίσης, πειραματικά ότι η DHEA προστατεύει τους νευρώνες από ανοξία, ότι αυξάνει παροδικά τα επίπεδα των mRNA του NGF, ότι έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορους τύπους προσβολής του ΚΝΣ και ότι επάγει προστασία έναντι τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης. Τα φυσικά νευροστεροειδή, όπως η DHEA, αν και παρουσιάζουν νευροπροστασία *in vitro* και *in vivo*, τείνουν να μεταβολίζονται σε οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστίνη. Ο μεταβολισμός των φυσικών νευροστεροειδών, έχει επικίνδυνες παρενέργειες, όπως ορμονοεξαρτώμενες νεοπλασίες, περιορίζοντας έτσι την κλινική τους χρήση. Ως εναλλακτική των φυσικών νευροστεροειδών, έχουν συντεθεί συστατικά ανάλογα της DHEA. Στην παρούσα εργασία, ελέγχθηκε το συστατικό TC237 σε σύγκριση με τον NGF και τη DHEA. Το TC237 είναι συνθετικό ανάλογο της DHEA, το οποίο ύστερα από χημική τροποποίηση (στον άνθρακα στην θέση 17 του δακτυλίου) έχει χάσει την ιδιότητα να μεταβολίζεται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Ύστερα από χορήγησή τους σε PC12 κύτταρα παρατηρήθηκε κατά πόσο μεταβάλλεται η απόπτωση μέσω της πρωτεάσης Κασπάσης-3 (cleavage of Caspase-3). Τελικός σκοπός ήταν να ελεγχθεί αν η δράση του συστατικού TC237 είναι παρόμοια με την δράση της DHEA, ώστε δυνητικά να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία προτείνει ότι το TC237 αυξάνει την απόπτωση, αντιθέτως με την DHEA που την μειώνει, γεγονός που αποτρέπει την πιθανή χρήση του για νευροπροστασία, αλλά πιθανόν να παρουσιάζει θεραπευτικές ιδιότητες σε νεοπλασματικές νόσους όπου η επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης είναι το επιδιωκόμενο θεραπευτικό αποτέλεσμα.

2) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1) ΝΕΥΡΟΤΡΟΦΙΝΕΣ

Οι νευροτροφίνες είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που επάγουν την επιβίωση, την ανάπτυξη και την λειτουργία των νευρώνων και ανήκουν σε μια ομάδα αυξητικών παραγόντων, δηλαδή εκκρινόμενων πρωτεϊνών που είναι ικανές να σηματοδοτούν συγκεκριμένα κύτταρα προς επιβίωση, διαφοροποίηση ή αύξηση. Αυξητικοί παράγοντες όπως οι νευροτροφίνες που προάγουν την επιβίωση των κυττάρων είναι γνωστοί ως νευροτροφικοί παράγοντες. Οι νευροτροφικοί παράγοντες εκκρίνονται από στοχευμένους ιστούς και εμποδίζουν συγκεκριμένα νευρικά κύτταρα να μπουν στο μονοπάτι της απόπτωσης.

Οι νευροτροφίνες είναι απαραίτητες για την υγεία και την σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Είναι επίσης υπεύθυνες για λειτουργίες όπως η μάθηση, η μνήμη και η συμπεριφορά. Η επιρροή των νευροτροφινών εξαρτάται από το επίπεδο της διαθεσιμότητάς τους, από την συγγένεια πρόσδεσης σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς και από τους σηματοδοτικούς καταρράκτες που επάγονται ύστερα από την ενεργοποίηση των υποδοχέων (Chao et al., 2006).

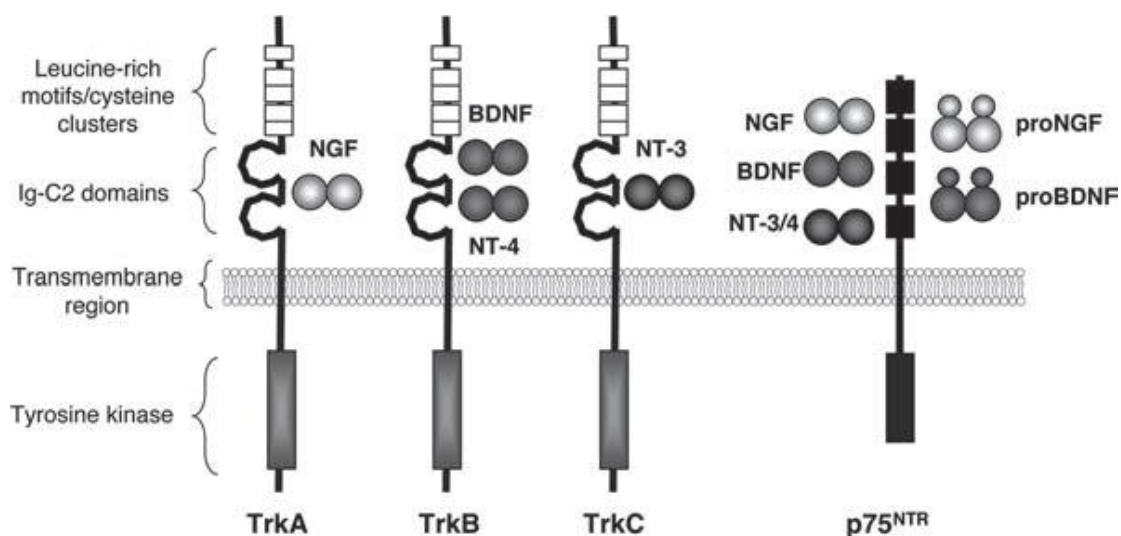
Η ιστορία των νευροτροφινών ξεκίνησε πριν 50 χρόνια περίπου, όπου οι Levi-Montalcini, Cohen, και Hamburger ανακάλυψαν τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) (Levi-montalcini, 1987). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί τέσσερις νευροτροφίνες, ο NGF (Nerve Growth Factor), ο BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), ο NT-3 (Neurotrophin-3), και ο NT-4 (Neurotrophin-4). Και οι τέσσερις νευροτροφίνες έχουν προέλθει από ένα κοινό προγονικό γονίδιο και μοιάζουν στην αλληλουχία και στην δομή τους. Οι ώριμες μορφές των νευροτροφινών αλληλεπιδρούν με δυο διακριτούς υποδοχείς, ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων Trk και τον p75NTR (p75 neurotrophin Receptor) που είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων TNF (tumor necrosis factor). Έχει δειχτεί, επίσης, ότι πρόδρομες μορφές των νευροτροφινών (pro-neurotrophins) δείχνουν επιλεκτικότητα στον p75NTR υποδοχέα έναντι του Trk. Η αλληλεπίδραση αυτή θεωρείται ότι οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, ενώ η αλληλεπίδραση με τον Trk υποδοχέα σηματοδοτεί την επιβίωση (Vilar et al., 2010).

2.1.1) Trk υποδοχείς

Ο πρώτος Trk υποδοχέας ανακαλύφθηκε αρχικά σαν αναδιάταξη μιας μη μυικής τροπομοσίνης και μιας άγνωστης τότε κινάσης τυροσίνης. Αυτή η κινάση τυροσίνης αναφερόταν ως TrkA και αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας του NGF. Η ανακάλυψη των TrkB και TrkC που έγινε βασισόμενη στην ομοιότητά τους με τον TrkA, έγινε αργότερα (Arévalo & Wu, 2006). Συγκεκριμένα για τον TrkA, η έκφρασή του περιορίζεται κυρίως στους χολινεργικούς νευρώνες του βασικού πρόσθιου εγκεφάλου και σε κάποιους νευρώνες στο ραβδωτό σώμα. Οι υποδοχείς TrkB και TrkC

εκφράζονται έντονα στον ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα και τον φλοιό (Joao O. Malva et al., 2007).

Για αρκετό καιρό υπήρχε η αντίληψη ότι οι νευροτροφίνες συνδέονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένους Trk υποδοχείς : ο NGF στον TrkA, ο BDNF και ο NT-4 στον TrkB, και ο NT-3 στον TrkC. Υπάρχει όμως αμφιβολία για την παραπάνω υπόθεση, καθώς ο NT-3 μπορεί να προσδεθεί επίσης και στους TrkA και TrkB υποδοχείς που έχουν μια πρόσθετη μικρή ένθεση στο εξωκυτταρικό τους τμήμα. Οι υποδοχείς Trk είναι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα που αποτελείται από τρία μοτίβα πλούσια σε λευκίνη και περιβάλλονται από δύο σύμπλοκα κυστεΐνης, δύο τμήματα τύπου immunoglobulin-like C2 (Ig-C2), μια μοναδική διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική περιοχή με ένα τμήμα κινάσης (Εικόνα 1) (Arévalo & Wu, 2006).



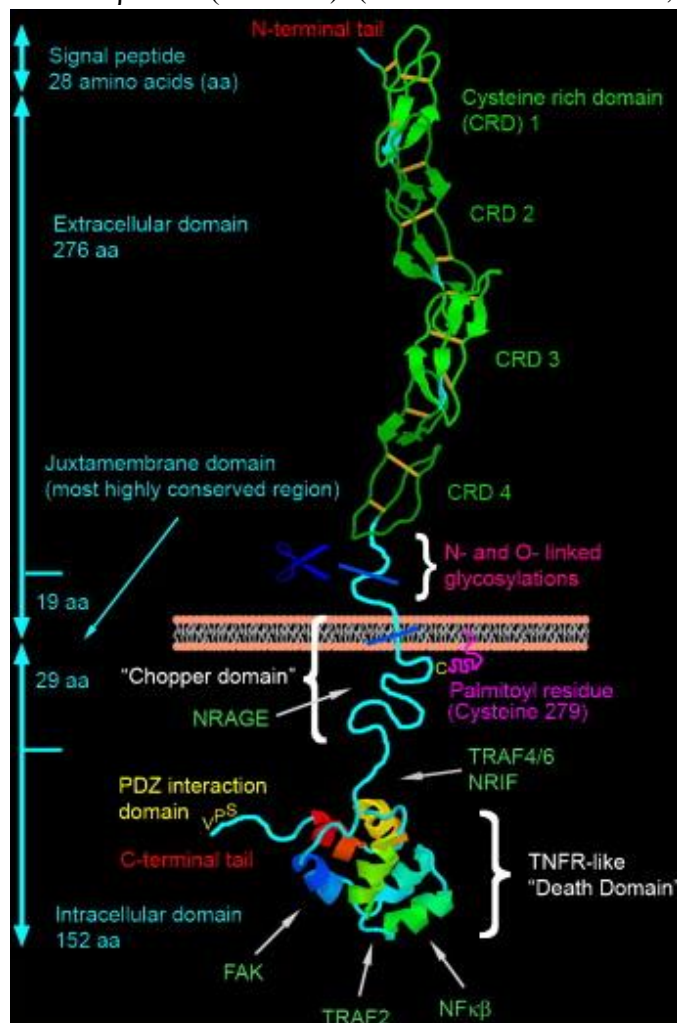
Εικόνα 1: Νευροτροφίνες και οι υποδοχείς τους: Trk και p75 NTR υποδοχείς (Arévalo & Wu, 2006).

Η πρόσδεση των νευροτροφινών επάγει τον σχηματισμό των ολιγομερών των Trk υποδοχέων και την εσωτερίκευση των υποδοχέων. Τα διάφορα συστατικά των υποδοχέων φωσφορυλιώνουν το ένα το άλλο *in trans* σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης που ρυθμίζουν τις καταλυτικές και σηματοδοτικές λειτουργίες του συμπλόκου συνδέτη-υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση στις τυροσίνες 674 και 675 φαίνεται να είναι το αρχικό γεγονός στην ενεργοποίηση των Trk υποδοχέων (Watson, Porcionatto, Bhattacharyya, Stiles, & Segal, 1999). Τέλος, η δράση των υποδοχέων γίνεται μέσω των μονοπατιών ERK, PI3K και PLC- γ και αποτελεί την διαφοροποίηση και την επιβίωση.

2.1.2) *p75NTR* υποδοχέας

Ο παν-νευροτροφικός υποδοχέας, *p75NTR*, έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καθώς μπορεί να μεσολαβήσει για τον νευρικό κυτταρικό θάνατο κατά την ανάπτυξη, αλλά και μετά από τραύμα στον ενήλικα, γεγονός που τον θέτει ως στόχο για την θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Underwood & Coulson, 2008). Ο *p75NTR* εκφράζεται στο αναπτυξιακό κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα κατά την περίοδο της συναπτογένεσης και του αναπτυξιακού κυτταρικού θανάτου (Davies, 1991). Πρωτοαναγνωρίστηκε το 1973 (Herrup & Shooter, 1973) ως ο υποδοχέας του νευρικού αυξητικού παράγοντα, NGF. Τελικά, ανακαλύφθηκε ότι λειτουργεί ως υποδοχέας όλων των νευροτροφινών, καθώς και των προ-νευροτροφινών (Chao & Bothwell, 2002). Πράγματι ο *p75NTR* είναι ικανός να αλληλεπιδρά με διάφορους συν-υποδοχείς, μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

Αντίθετα με τους Trk υποδοχείς ο *p75NTR* δεν έχει καταλυτική ενεργότητα. Η ενδοκυτταρική περιοχή του *p75NTR* περιέχει μια ευέλικτη παραμεμβρανική περιοχή που ακολουθείται από ένα σφαιρικό τμήμα, γνωστό ως death domain (Liepinsh, Pag, Otting, & Ibanez, 1997). Οι νευροτροφίνες προσδέονται στον *p75NTR* μέσω μιας επικράτειας πλούσιας σε κυστεΐνη. Το ενδοκυτταρικό τμήμα του *p75NTR* αλληλεπιδρά με προσδέτες που επάγουν θνησιγόνο σηματοδότηση (death signaling), μπορεί να φωσφορυλιωθεί και η καρβοξυτελική ουρά μπορεί να προσδεθεί σε μια PDZ επικράτεια (εικόνα 2) (Underwood & Coulson, 2008).



Η λειτουργία του p75NTR είναι πολύπλοκη. Ένας από τους λόγους της πολυπλοκότητας είναι ότι η λειτουργία του δεν σηματοδοτείται από κλασσικά μονοπάτια, καθώς δεν έχει ενεργότητα κινάσης, ούτε είναι συζευγμένο με ένα μονοπάτι G πρωτεΐνης. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας σηματοδοτεί δεσμεύοντας ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες δέσμευσης που μεσολαβούν για διάφορες λειτουργίες. Διαφορετικές πρωτεΐνες δέσμευσης μπορούν να προσδεθούν στον υποδοχέα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Ο p75NTR μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους Trk υποδοχείς επάγοντας την επιβίωση των νευρικών κυττάρων και την διαφοροποίησή τους, ως απόκριση στις νευροτροφίνες ενώ μπορεί να αλληλεπιδράσει και με την ενδοκυττάρια πρωτεΐνη sortilin (ως συνυποδοχέα) για να μεσολαβήσει απόπτωση, ως απόκριση στις προνευροτροφίνες. Επομένως, ο p75NTR μπορεί να προάγει κυτταρική επιβίωση ή κυτταρικό θάνατο και να επάγει ή να καταστείλει αξονική αύξηση, ανάλογα με τους υποδοχείς που αλληλεπιδρά κάθε φορά (Cragnolini & Friedman, 2008). Συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι διέγερση κυτταρικής σειράς που έχει επιμολυνθεί με p75NTR είτε με NGF, είτε με pro-NGF οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της κασπάσης-3. Κατά την αποπτωτική του δράση, πρόσδεση του p75NTR έχει συσχετιστεί με ενεργοποίηση σηματοδοτικών παραγόντων, όπως των c-Jun N-terminal kinase (JNK), p53, caspase-3, και TRAF6. Αντίθετα, όταν ο p75NTR επάγει επιβίωση φαίνεται ότι επάγει σηματοδότηση μέσω των κινασών Akt και PI-3K, καθώς και μέσω της RIP2 σε κύτταρα Schwann (Bradshaw et al., 2012). Τέλος, η αποπτωτική σηματοδότηση του p75NTR εμπλέκεται σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες του ανθρώπου. Οι περισσότερο μελετημένες ασθένειες είναι η νόσος Alzheimer και η νόσος του κινητικού νευρώνα (NMD), όπου αυξημένη έκφραση του p75NTR συνδέεται άμεσα με νευροεκφύλιση. Η σύνδεση αυτή φαίνεται επίσης σε ζωικά μοντέλα με NMD, ισχαιμία, τραύμα και επιληψία (Dechant & Barde, 2002), όπου καταστολή της έκφρασης, της ενεργοποίησης ή των μονοπατιών σηματοδότησης του p75NTR αποτρέπει την κυτταρική απώλεια και επάγει βελτιωμένη λειτουργία. Επομένως, η ανάπτυξη θεραπειών που καταστέλλουν ή μειώνουν την αποπτωτική σηματοδότηση του p75NTR σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες μπορούν να βελτιώσουν την πρόγνωση και να αποτελέσουν τελικά, θεραπευτικούς στόχους (Underwood & Coulson, 2008).

2.2) ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Τα νευροστεροειδή συντίθενται στο κεντρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) και παράγονται από νευρώνες και από γλοιακά κύτταρα. Προέρχονται από χοληστερόλη ή άλλα στεροειδή πρόδρομα της περιφέρειας (E.Baulieu, 1998). Τα κύρια στεροειδή που χαρακτηρίζονται ως νευροστεροειδή είναι: η διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και η sulfated DHEA, η πρεγνενολόνη (PREG) και η sulfated PREG, η προγεστερόνη (PROG), η δεοξυκορτικοστερόνη και οι 5 α -reduced μεταβολίτες, η 3 α ,5 α -τετραϋδροπρογεστερόνη ή αλλιώς αλλοπρεγνανολόνη (Allo) και η 3 α ,5 α -TH DOC (Charalampopoulos et al., 2008).

Η αρχική παρατήρηση ότι τα στεροειδή μπορούν να παράγονται στον εγκέφαλο, έγινε το 1980 από τον Baulieu. Η αρχική παρατήρηση βασίστηκε σε πειράματα μέτρησης των επιπέδων της διϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA) και της πρεγνενολόνης (PREG) στο ΚΝΣ. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα των στεροειδών ήταν υψηλότερα στο ΚΝΣ και παρέμεναν υψηλά ακόμα και μετά την αφαίρεση των επινεφριδίων. Επομένως, κατέληξαν ότι ο εγκέφαλος είναι υπεύθυνος για την σύνθεση της DHEA. Αυτού του είδους τα στεροειδή ονομάστηκαν νευροστεροειδή για να διαχωρίζονται από τα στεροειδή που παράγονται από το περιφερικό νευρικό σύστημα (Baulieu, Robel, & Schumacher, 2001). Τα νευροστεροειδή έχουν διάφορες λειτουργίες. Γενικά, η δράση τους δεν γίνεται μέσω των κλασσικών υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, αλλά μέσω ιοντοελεγχόμενων υποδοχέων νευροδιαβιβαστών (ion-gated neurotransmitter receptors) (Mellon & Vaudry, 2001). Μερικές από τις λειτουργίες των νευροστεροειδών περιλαμβάνουν ρύθμιση της λειτουργίας των GABA_A και NMDA υποδοχέων, ρύθμιση της λειτουργίας των σ υποδοχέων, ρύθμιση της μυελίνωσης, νευροπροστασία και αξονική και δενδριτική αύξηση (Compagnone & Mellon, 2000). Τα ένζυμα που συμμετέχουν στην νευροστεροειδογένεση μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: την ομάδα του κυτοχρώματος P450 και την ομάδα των non-P450. Τα νευροστεροειδή συντίθενται από χοληστερόλη, με την βοήθεια των παραπάνω ενζύμων, που δρουν εναρμονισμένα για να κατευθύνουν την σύνθεση ενός ή περισσότερων στεροειδών σε ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Συγκεκριμένα, το πρώτο ρυθμοκαθοριστικό και ορμονικά ρυθμιζόμενο βήμα είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη (Mellon & Vaudry, 2001).

2.2.1) DHEA

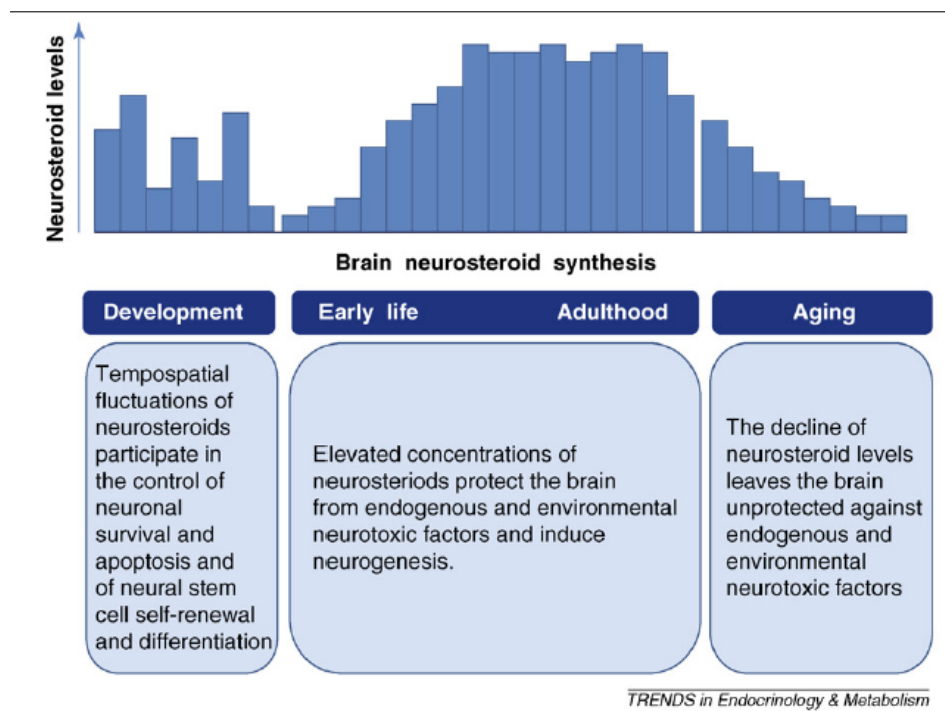
Το νευροστεροειδές διϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA) συντίθεται στον εγκέφαλο από νευρώνες και μικρογλοιακά κύτταρα και ρυθμίζει την νευρική επιβίωση και νευρογένεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης. Έχει δειχθεί ότι η DHEA ενεργεί ως νευροτροφικός παράγοντας, προστατεύοντας νευρικά κύτταρα από αποπτωτικό θάνατο μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων TrkA και p75NTR (Lazaridis et al., 2011).

Πράγματι, τοπική παραγωγή της DHEA έχει σημαντικές επιδράσεις στην νευρική ανάπτυξη, σε έμβρυα τρωκτικών. Μικρές συγκεντρώσεις της DHEA, της τάξης των nM, επάγουν επιμήκυνση των νευρικών αξόνων, των βασικών, δηλαδή δομών που μεταφέρουν μηνύματα από το νευρικό σώμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι επιδράσεις της DHEA εστιάζονται στον νευρικό άξονα και ότι η DHEA έχει μια περιορισμένη επίδραση στην δενδριτική αύξηση. Επίσης, η DHEA φαίνεται ότι επηρεάζει και την νευρογένεση, καθώς αυξάνει τον αριθμό των νεοσχηματιζόμενων

νευρώνων της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου και ανταγωνίζεται την ανασταλτική δράση της κορτικοστερόνης τόσο στην νευρογένεση όσο και στον πρόδρομο νευρικό πολλαπλασιασμό (Charalampopoulos et al., 2008).

Οι DHEA και DHEAS υπάρχουν σε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία κατά την νεαρή ηλικία στον άνθρωπο. Τα ένζυμα που απαιτούνται για την σύνθεση της DHEA εκφράζονται σε νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα. Το πρώτο βήμα για την βιοσύνθεση της DHEA είναι η διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας από το κυτόχρωμα P450_{sc} και η παραγωγή της πρεγνενολόνης, η οποία μεταβολίζεται σε DHEA από δραστηριότητα 17α- υδροξυλάσης / c17 και 20 λυάσης του κυτοχρώματος P450_{c17}. Είναι αξιοσημείωτο ότι το P450_{c17} βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των προσυναπτικών και μετασυναπτικών περιοχών στις CA1-CA3 περιοχές των πυραμοειδών νευρώνων του ιπποκάμπου και στα κοκκοειδή νευρικά κύτταρα της οδοντωτής έλικας, προτείνοντας την γρήγορη νευροτροποποιητική λειτουργία της DHEA στο επίπεδο των συνάψεων (Mellon & Vaudry, 2001). Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι τα παραπάνω νευροστεροειδή προστατεύουν τα χρωμιόφιλα κύτταρα αρουραίου, καθώς και PC12 κύτταρα (τα οποία είναι πολύ καλό μοντέλο για τον έλεγχο κυτταρικής απόπτωσης ή επιβίωσης) υπό συνθήκες έλλειψης ορού. Οι επιδράσεις τους ήταν χρόνο- και δοσο-εξαρτώμενες. Η δράση της DHEA που επάγει επιβίωση φάνηκε να είναι ανεξάρτητη των NMDA, GABA, sigma-1 και των οιστρογονικών υποδοχέων. Απαραίτητος όμως για την δράση τους, ήταν ο ρόλος των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Επίσης, δείχθηκε ότι η DHEA ενεργοποιεί την πρωτεΐνη δέσμευσης cAMP και τον NF-κB, που είναι τελεστές της έκφρασης των Bcl-2 πρωτεϊνών, καθώς και την αντιαποπτωτική κινάση PKCα/β που είναι μεταμεταγραφικός ενεργοποιητής των Bcl-2 (Charalampopoulos et al., 2004, 2008).

Τα επίπεδα της DHEA αλλάζουν πολύ κατά την διάρκεια της ζωής (εικόνα 3). Η διακύμανση των επιπέδων των DHEA και DHEAS, κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, δείχνει ότι έχουν ρυθμιστικό ρόλο στον σχηματισμό του ανεπτυγμένου νευρικού συστήματος. Πράγματι, κατά την νεογνική φάση, η συγκέντρωση της DHEA αρχίζει να αυξάνει και παραμένει σε υψηλά επίπεδα κατά την ενηλικίωση. Έχει προταθεί ότι αυξημένα επίπεδα DHEA προστατεύουν τον εγκέφαλο από ενδογενείς και εξωγενείς νευροτοξικούς παράγοντες, ενώ παράλληλα επάγουν νευρογένεση. Επίσης, η μείωση των επιπέδων της DHEA κατά την γήρανση έχει συσχετιστεί με απώλεια νευρώνων και εμφάνιση νευροεκφυλιστικών διαδικασιών (Charalampopoulos et al., 2008).



Εικόνα 3: Διακυμάνσεις στην νευροστεροειδογένεση κατά την διάρκεια της ζωής (Charalampopoulos et al., 2008)

Ειδικότερα, τα επίπεδα της DHEA κατά την γήρανση και σε ηλικία περίπου 70 χρονών, μπορούν να φτάσουν έως και 10-20% κάτω από την μέγιστη τιμή. Μειωμένα επίπεδα DHEA και DHEAS έχουν βρεθεί σε περιοχές του εγκεφάλου ασθενών που πάσχουν από νόσο Alzheimer (Schumacher et al., 2003). Άλλοι λόγοι μείωσης της DHEA είναι το φυσικό ή συναισθηματικό άγχος, με βασικά παραδείγματα την κατάθλιψη και την χρόνια φλεγμονή. Αυτή η μείωση σχετίζεται με δυσλειτουργία των νευρώνων και νευροεκφύλιση, κυρίως επειδή αυτά τα νευροστεροειδή προστατεύουν το ΚΝΣ από επιβλαβείς παράγοντες (Charalampopoulos et al., 2004).

Για τους παραπάνω λόγους, η θεραπεία ασθενειών μέσω της DHEA έχει ελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα επίπεδα της DHEA μειώνονται κατά τη γήρανση και το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η συμπλήρωση με DHEA μπορεί να βελτιώσει νοητικά προβλήματα αποτρέποντας την απώλεια νευρικών κυττάρων (Charalampopoulos, Lazaridis, & Gravanis, 2011).

2.2.2) Συνθετικά ανάλογα της DHEA.

Πράγματι, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η DHEA προστατεύει τους νευρώνες από ανοξία, ότι αυξάνει παροδικά τα επίπεδα των mRNA του NGF, ότι έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες σε διάφορους τύπους προσβολής του ΚΝΣ και ότι επάγει προστασία έναντι τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης. Όπως προαναφέρθηκε η έλλειψη θεραπείας για νευροεκφυλιστικές ασθένειες έχει διεγείρει το ενδιαφέρον για ανάπτυξη νευροπροστατευτικών μέσων που αποτρέπουν ή θεραπεύουν την σταδιακή απώλεια της λειτουργίας των νευρώνων. Υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη νέων συστατικών για την προστασία των

νευρικών κυττάρων, την επιδιόρθωσή τους και την επαναφορά τους, στοχεύοντας την κυτταρική απόπτωση και επιβίωση ή την νευρογένεση. Τα φυσικά νευροστεροειδή, όπως η DHEA, αν και παρουσιάζουν νευροπροστασία *in vitro* και *in vivo*, τείνουν να μεταβολίζονται στους ανθρώπους σε οιστρογόνα, ανδρογόνα και προγεστίνη. Ο μεταβολισμός αυτός, των φυσικών νευροστεροειδών, έχει επικίνδυνες παρενέργειες, όπως ορμονοεξαρτώμενες νεοπλασίες, περιορίζοντας έτσι την κλινική τους χρήση. Ως εναλλακτική των φυσικών νευροστεροειδών, έχουν συντεθεί συστατικά ανάλογα της DHEA. Η σύνθεση των συστατικών αυτών έγινε ύστερα από τροποποίηση στις θέσεις C3 ή C17 και η νευροπροστατευτική τους δράση ελέγχθηκε σε PC12 κύτταρα. Από το σύνολο των συστατικών που συντέθηκαν τα συστατικά 20, 23 και 27 ήταν ικανά να προστατέψουν τα νευρικά κύτταρα έναντι συνθηκών που επάγουν φυσιολογικά την απόπτωση (Calogeoroulou et al., 2009).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των συνθετικών αναλόγων (εκτός της έλλειψης μεταβολισμού τους σε οιστρογόνα ή ανδρογόνα) είναι και το μικρό τους μέγεθος, που μαζί με την λιπόφιλη δομή τους τα κάνει ιδανικά για φαρμακευτική χρήση στο ΚΝΣ, αφού περνούν εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

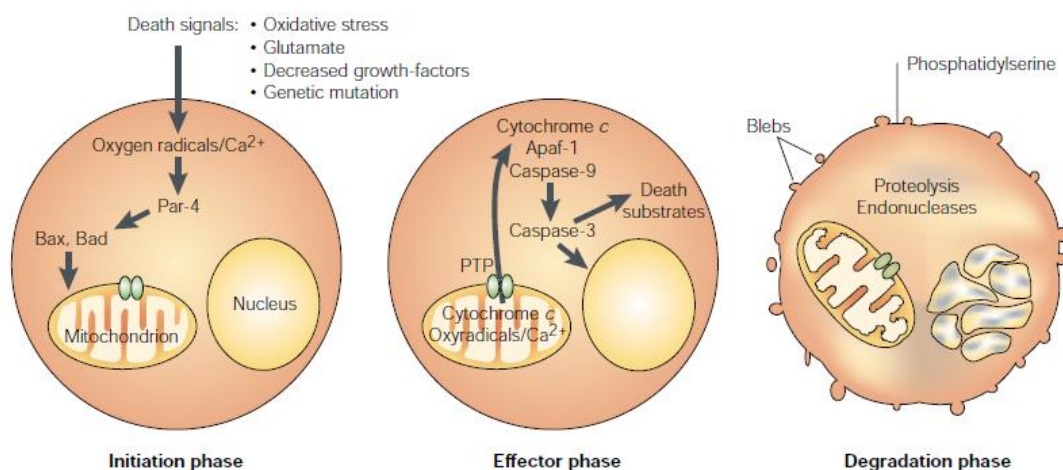
2.3) ΑΠΟΠΤΩΣΗ

2.3.1) Νευροστεροειδή και απόπτωση

Παρόλο που πολλά νευροστεροειδή επηρεάζουν την νευριτική αύξηση και την μυελίνωση, πρόσφατες ενδείξεις προτείνουν ότι μια από τις σημαντικότερες επιδράσεις των νευροστεροειδών είναι η αντιαποπτωτική τους δράση. Η απόπτωση είναι το τελευταίο στάδιο πολλών νευρολογικών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των νόσων Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον και Huntington καθώς και εγκεφαλικών επεισοδίων και της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Mattson, 2000). Πράγματι, η απόπτωση των νευρικών κυττάρων στον ιππόκαμπο θεωρείται ο κύριος υπεύθυνος στην συμπτωματολογία της νόσου Αλτσχάιμερ. Παρομοίως, η απόπτωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου υποδηλώνει την νόσο του Πάρκινσον, η απόπτωση των νευρικών κυττάρων στο νεοραβδωτό σώμα που επηρεάζει την κίνηση χαρακτηρίζει την νόσο του Χάντινγκτον και η απόπτωση των κινητικών νευρώνων χαρακτηρίζει την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (Graeber & Moran, 2002). Σε ασθενείς με εγκεφαλική ισχαιμία και τραύμα, ο αποπτωτικός νευρικός θάνατος συμβαίνει γιατί στο ΚΝΣ νεκρωτικά κύτταρα εκκρίνουν νευροτοξικές ουσίες που προκαλούν εκτεταμένο θάνατο σε μεγάλες γειτονικές περιοχές του εγκεφάλου. Τέλος, η απόπτωση των νευρικών κυττάρων θεωρείται ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στην ατροφία του εγκεφάλου κατά την γήρανση (Mattson, 2000).

Συγκεκριμένα, προκειμένου οι ιστοί να διατηρούν ένα σταθερό μέγεθος και να λειτουργούν σωστά, τα «παλιότερα» κύτταρα πρέπει να πεθάνουν για να επιτρέψουν την ανάπτυξη νέων κυττάρων. Ο προγραμματισμένος αυτός κυτταρικός θάνατος περιλαμβάνει μια αλληλουχία βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που επιτρέπουν στο κύτταρο να πεθάνει χωρίς να επηρεάσει τα γειτονικά του κύτταρα (Εικόνα 4). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται απόπτωση. Παρόλο που δεν υπάρχει ένας κοινός ορισμός της απόπτωσης, είναι αποδεκτό ότι η απόπτωση είναι μια διαδικασία

κυτταρικού θανάτου που περιλαμβάνει ενεργοποίηση της κασπάσης και διατήρηση των κυτταρικών οργανιδίων. Αντιθέτως, υπάρχει μια άλλη μορφή κυτταρικού θανάτου που καλείται νέκρωση, κατά την οποία τα κυτταρικά οργανίδια διογκώνονται και προκαλείται λύση των κυττάρων, καταλήγοντας σε μαζικό κυτταρικό θάνατο σε όλο τον ιστό. Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, απόπτωση συμβαίνει σε διάφορες νευρολογικές διαταραχές, όπου ο νευρικός θάνατος αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό (Mattson, 2000).



Εικόνα 4: Βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (M. Mattson, 2000).

2.3.2) Απόπτωση και κασπάσες

Οι κασπάσες είναι συντηρημένες εξελικτικά πρωτεάσες κυστεΐνης που παίζουν κεντρικό ρόλο στην απόπτωση και είναι μέλη του interleukin-1 β -converting enzyme (Mattson, 2000). Συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα, τα οποία συμμετέχουν σε ένα υψηλά ελεγχόμενο καταρράκτη πρωτεολυτικών αντιδράσεων προκειμένου να ενεργοποιηθούν τον εαυτό τους, καθώς και η μία την άλλη (Feinstein-Rotkopf & Arama, 2009). Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί 14 κασπάσες, οι οποίες παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά. Είναι όλες πρωτεάσες κυστεΐνης, έχουν όλες ένα συντηρημένο πενταπεπτίδιο (QACXG) και όλες προέρχονται από τις προκασπάσες. Η απόπτωση ρυθμίζεται από μια σειρά σηματοδοτικών μονοπατιών υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ο καταρράκτης αντιδράσεων της κασπάσης παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή, στην μετατροπή και στον πολλαπλασιασμό των ενδοκυτταρικών αποπτωτικών σημάτων. Η ενεργοποίηση και η λειτουργία των κασπασών που εμπλέκονται στο μονοπάτι της απόπτωσης ρυθμίζονται από διάφορα μόρια, όπως είναι η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2 που είναι αναστολείς της απόπτωσης καθώς και από μόρια ασβεστίου (T.Fan, L.Han, R. Cong et al., 2005). Ανάμεσα στις αναγνωρισμένες κασπάσες, η κασπάση-3 ξεχωρίζει γιατί ενεργοποιείται από πολλά θνησιγόνα σήματα και διασπά διάφορες σημαντικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Επίσης, μελέτες σε knock-out ποντίκια για την κασπάση-3 έχουν δείξει ότι αυτή η πρωτεάση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του εγκεφάλου (Sprengart, Michael L et al., 1998). Οι αποπτωτικές κασπάσες ταξινομούνται σε εκκινητές (initiators) και τελεστές (effectors), ανάλογα με την θέση τους στην πρωτεολυτική ιεραρχία (Yael Feinstein-Rotkopf et. al, 2009). Κάποιες κασπάσες ενεργοποιούνται κατά τα πρώιμα στάδια της απόπτωσης. Γενικά, υπάρχουν δύο μονοπάτια ενεργοποίησης των κασπασών, το ένα επάγεται από θνησιγόνο σήμα (death signal-induced) και ονομάζεται death receptor-

mediated pathway και το άλλο είναι επαγόμενο από το στρες, και ονομάζεται mitochondrion-mediated pathway (Fan, Han, Cong, & Liang, 2005). Ένα παράδειγμα είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 στους νευρώνες ως απάντηση στην πρόσδεση ενός θνησιγόνου υποδοχέα (death receptor), όπως είναι ο p75 νευροτροφικός υποδοχέας. Αυτές οι κασπάσες ενεργοποιούν στην συνέχεια, άμεσα ή έμμεσα, τις κασπάσες τελεστές, όπως είναι η κασπάση-3 και μπορούν επομένως να οδηγήσουν σε απόπτωση ανεξάρτητα από μιτοχονδριακή αλλαγή. Οι κασπάσες τελεστές μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν ως απόκριση σε αλλαγές που συμβαίνουν στο μιτοχόνδριο και στην αποδέσμευση του κυτοχρώματος c. Οι κασπάσες αυτές μπορούν έπειτα να ενεργοποιήσουν μια DNάση που κόβει το DNA σε ολιγονουκλεοσώματα (Mattson, 2000).

Όπως προαναφέρθηκε, η κασπάση-3 είναι από τις βασικότερες κασπάσες που είναι ενεργοποιημένες κατά την απόπτωση, γεγονός που δείχνει ότι παίζει βασικό ρόλο στην διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Faleiro, Kobayashi, Fearnhead, & Lazebnik, 1997). Πέρα από την παραπάνω παρατήρηση, πειράματα που έγιναν σε ποντίκια με έλλειψη της κασπάσης-3 έδειξαν νευρικές ανωμαλίες, αλλά όχι αναπτυξιακές ανωμαλίες (Kuida et al., 1996). Επίσης, η απαίτηση της κασπάσης-3 στην απόπτωση φαίνεται να είναι ιστοειδική και ακόμα, ειδική σε κάποιο ερέθισμα μέσα στον ίδιο κυτταρικό τύπο (Sprengart, Wati, & Porter, 1998). Τέλος, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση της απόπτωσης στους νευρώνες του προσθιγέφαλου και τέτοια ενεργοποίηση έχει δειχτεί σε εγκεφάλους ασθενών που πάσχουν από την νόσο Αλτσχάιμερ (Gastard, Troncoso, & Koliatsos, 2003).

Υπάρχουν διάφορα αντι-αποπτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχει δειχτεί ότι οι νευροτροφικοί παράγοντες μπορούν να προστατέψουν τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση ενεργοποιώντας υποδοχείς που συνδέονται μέσω καταρρακτών κινάσης και παράγουν πρωτείνες που είναι υπεύθυνες για την επιβίωση των κυττάρων. Για παράδειγμα, ο BDNF (brain-derived neurotrophic factor) και ο NGF (nerve growth factor) μπορούν να εμποδίσουν τον θάνατο νευρώνων σε καλλιέργεια, προάγοντας την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, Bcl-2 πρωτεϊνών και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ομοιόσταση του ασβεστίου (Mattson, 2000).

2.4) ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός νέων συνθετικών αναλόγων της DHEA, η δράση τους και η αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς των νευροτροφικών, καθώς και η διερεύνηση των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μηχανισμών.

Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε το συστατικό TC237 σε σύγκριση με τον NGF και τη DHEA. Το TC237 είναι συνθετικό ανάλογο της DHEA, το οποίο ύστερα από τροποποίηση έχει χάσει την ιδιότητα να μεταβολίζεται σε οιστρογόνα και ανδρογόνα. Ύστερα από χορήγησή τους σε PC12 κύτταρα παρατηρήθηκε κατά πόσο μεταβάλλεται η απόπτωση μέσω της κασπάσης-3. Τελικός σκοπός ήταν να ελεγχθεί αν η δράση του συστατικού TC237 είναι παρόμοια με την δράση της DHEA.

3) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1) Καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι PC12 (rat adrenal medulla pheochromocytoma), HEK293 (Human Embryonic Kidney) και CHO (Chinese Hamster Ovary).

Τα PC12 κύτταρα προέρχονται από φαιοχρωμοκύτωμα μυελού των επινεφριδίων αρουραίου και σταματούν να διαιρούνται και τελικά διαφοροποιούνται ύστερα από προσθήκη NGF. Το γεγονός αυτό κάνει τα PC12 ένα χρήσιμο μοντέλο για την μελέτη της νευρικής διαφοροποίησης. Επίσης, είναι καλό μοντέλο για την μελέτη της απόπτωσης, καθώς υπόκεινται στην διαδικασία της απόπτωσης υπό την έλλειψη τροφικών παραγόντων, όπως και οι νευρώνες. Τέλος, σημαντικό στοιχείο που βοήθησε στην παρούσα εργασία είναι η ενδογενής παρουσία των υποδοχέων TrkA και p75NTR.

Τα HEK293 κύτταρα προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού ανεπτυγμένα σε ιστοκαλλιέργεια. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται και διαμολύνονται πολύ εύκολα. Επίσης, δεν περιέχουν ενδογενώς τους υποδοχείς TrkA και p75NTR.

Τα CHO κύτταρα προέρχονται από ωοθήκη κινέζικου χάμστερ και όπως τα HEK293 καλλιεργούνται εύκολα και δεν περιέχουν ενδογενώς τους υποδοχείς TrkA και p75NTR.

Επίστρωση κυττάρων υγρής καλλιέργειας- Σπάσιμο κυττάρων:

Η επίστρωση των κυττάρων έγινε σε εκατοστάρια πιάτα για υγρές καλλιέργειες. Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε κυτταρική σειρά είναι τα εξής:

Για τα PC12 κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε RPMI θρεπτικό + 10% Horse Serum + 5% FBS (Fetal Bovine Serum) + 1% αντιβιοτικά (penicillin 5.000 units/ml, streptomycin 5.000μg/ml) + 1% L-glutamine 200 mM.

Για τα HEK293 και CHO κύτταρα χρησιμοποιήθηκε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 10% FBS + 1% αντιβιοτικά (penicillin 5.000 units/ml, streptomycin 5.000μg/ml).

Πριν χρησιμοποιηθούν οι οροί FBS και Horse Serum απαιτείται απενεργοποίησή τους στους 56 ° C για 30 λεπτά.

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε ειδικό στείρο θάλαμο καλλιέργειας και οι απαιτούμενες συνθήκες επώασης των κυττάρων είναι 37° C και 5% CO₂. Τα θρεπτικά θερμαίνονται στους 37° C σε υδατόλουτρο, πριν την χρήση τους.

Βήμα 1- Ξεπάγωμα κυττάρων που έχουν φυλαχτεί στους -80° C.

- Προσθήκη 5 ml θρεπτικού σε ένα falcon.
- Γίνεται επαναδιάλυση των κυττάρων με 1ml θρεπτικό, συλλογή των κυττάρων όταν ξεπαγώσουν και προσθήκη τους στο falcon.
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναδιάλυση κυττάρων με 10ml θρεπτικό και προσθήκη σε εκατοστάρι πιάτο.

Βήμα 2- Σπάσιμο κυττάρων

Ανά 2 μέρες περίπου πραγματοποιείται σπάσιμο των κυττάρων, ανάλογα την πυκνότητά τους.

- Αφαίρεση θρεπτικού και προσθήκη 10 ml φρέσκου θρεπτικού.
- Μάζεμα κυττάρων και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1500 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναδιάλυση κυττάρων.
- Επίστρωση σε πιάτο υγρής καλλιέργειας.

Ειδικότερα, για τα CHO κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον 3ml τρυψίνης σε κάθε σπάσιμο.

Βήμα 3- Επίστρωση κυττάρων σε 6-well plates για πραγματοποίηση πειράματος.

3.2) Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Βήμα 1- Μετασχηματισμός βακτηρίων

- Προσθήκη 1μg DNA σε 30-40 μl επιδεκτικά κύτταρα.
- Επώση για 30 λεπτά στον πάγο.
- 90 δευτερόλεπτα στους 42° C (heat shock).
- 1 λεπτό στον πάγο.
- Προσθήκη 900 μl LB και επώση στους 37° C για μια ώρα.
- Φυγοκέντρηση για 25 δευτερόλεπτα στις 14.000 rpm.

- Αφαίρεση μικρής ποσότητας θρεπτικού και επαναιώρηση κυττάρων
- Plating
- Επώαση στους 37° C overnight.

Βήμα 2- Απομόνωση πλαδισμιακού DNA μεγάλης κλίμακας με κολωνάκι (NucleoBond® Xtra Midi, Macherey-Nagel)

- Επιλογή μοναδιαίας αποικίας από μετασχηματισμό κυττάρων και προσθήκη σε 300ml LB.
- Επώαση στους 37° C overnight, shaking.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 20 λεπτά, στις 7500 rpm, 4° C και αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη 10 ml Resuspension buffer (για 300 ml καλλιέργειας), καλή επαναδιάλυση πελέτας (vortex) και μεταφορά σε falcon.
- Προσθήκη 10 ml Lysis buffer και αναστροφή 5 φορές
- Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 15 ml Equilibration buffer κυκλικά στο φίλτρο της κολώνας
- Παράλληλα, προσθήκη 10 ml Neutralization buffer στο falcon και αναστροφή 15 φορές.
- Όταν γίνει ομοιογενές διάλυμα, φορτώνεται στην κολώνα και περιμένουμε να φιλτραριστεί όλο.
- Ξέπλυμα κολώνας και φίλτρου με 7 ml Equilibration buffer.
- Αφαίρεση φίλτρου, αφού φορτωθεί η κολώνα.
- Πλύσιμο κολώνας με 15 ml Wash buffer.
- Έκλουση του DNA με 7 ml Elution buffer και προσθήκη 5 ml ισοπροπανόλης.
- 2 λεπτά επώαση σε θερμοκρασία δωματίου , vortex και μεταφορά σε 2 ml eppendorfs.
- Φυγοκέντρηση για 40 λεπτά, στις 12.000 rpm, 4°C.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και τα αφήνουμε να στεγνώσουν στον επαγωγό.
- Επαναδιάλυση σε 200 µl H₂O και φωτομέτρηση στα 260 nm.

Βήμα 3- Επιμόλυνση κυττάρων

Transfection με χρήση Turbofect *in vitro* Transfection reagent (Thermo Scientific)

- Προσθήκη serum free, turbofect και το πλασμιδιακό DNA, σε ένα falcon, ανάλογα με τις ποσότητες που προτείνονται σε κάθε πρωτόκολλο και επώαση για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στην hood.
- Ανανέωση του θρεπτικού στα πιάτα και προσθήκη της παραπάνω αντίδρασης.
- Επώαση για 4 ώρες στους 37° C, 5% CO₂.
- Ανανέωση του θρεπτικού και επώαση για 48 ώρες στους 37° C, 5% CO₂.

Ειδικότερα, έγινε transfection με p75NTR σε κύτταρα CHO για να ελεγχθούν τα επίπεδα της caspase-3 μετά από προσθήκη επιδράσεων.

Άρα για 6-well plate:

	Serum free	DNA	Turbofect
6-well plate	200 μl	4 μg	6 μl

3.3) Προσθήκη επιδράσεων

Έγινε προσθήκη επιδράσεων σε PC12 και CHO κύτταρα προκειμένου να ελεγχθεί η απόπτωση μέσω κασπάσης.

Συγκεκριμένα σε 6-well plate έγιναν οι εξής επιδράσεις:

Serum (S), Serum Free (SF), NGF, DHEA, TC237, BNN27

- Αρχικά γίνονται οι παρακάτω αραιώσεις

	STOCK	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
NGF	100 mg	100 ng
DHEA	10 ⁻² M	10 ⁻⁷ M
TC237	10 ⁻² M	10 ⁻⁷ M
BNN27	10 ⁻² M	10 ⁻⁷ M

- Γίνεται προσθήκη των επιδράσεων σε 2 ml SF τελικό όγκο και πραγματοποιείται η απαιτούμενη επώαση.

- Συλλογή κυττάρων με 1 ml PBS και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, 4000 x g.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναδιάλυση με sample buffer.
- Αποθήκευση στους -20° C ή χρήση των δειγμάτων για Western Blot.

Η

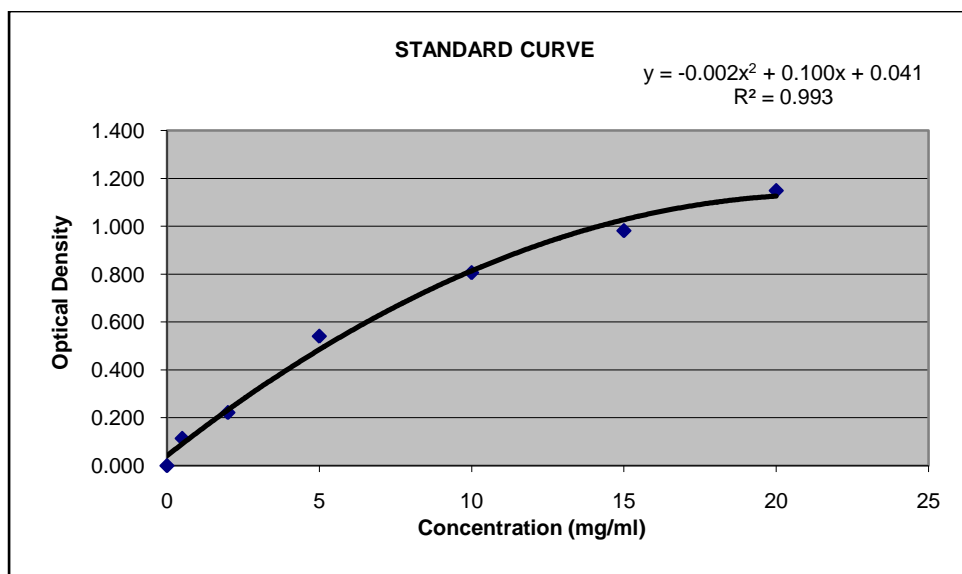
- Συλλογή κυττάρων με 200 μl Lysis buffer + PMSF + Aprotinin
- Χρήση nanodrop ή Bradford protein assay για υπολογισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης.
- Αποθήκευση στους -80° C ή χρήση των δειγμάτων για Western Blot.

3.4) Bradford protein assay

Βήμα 1 – Πρότυπη καμπύλη

Κατασκευή πρότυπης καμπύλης:

	Concentration (mg/μl)	H ₂ O (μl)	Lysis Buffer (μl)	BSA (μl)	Coomassie (μl)
A	Blank	159	1	0	40
B	0.5	158.5	1	0.5	40
C	1	158	1	1	40
D	2	157	1	2	40
E	5	154	1	5	40
F	10	149	1	10	40
G	15	144	1	15	40
H	20	139	1	20	40



Βήμα 2- Δείγματα

- Έλεγχος κατάλληλης ποσότητας δείγματος (0,5-2 μl).
- Προσθήκη H₂O στα πηγάδια, ανάλογα τις ποσότητες που ενδείκνυνται στον πίνακα.
- Vortex των δειγμάτων και εισαγωγή τους στα πηγάδια.
- Προσθήκη 40 μl Coomassie/well.
- Φωτομέτρηση στα 620 nm.

3.5) Western Blot

Βήμα 1- Προετοιμασία δειγμάτων

Τα κύτταρα μεταφέρονται από τα πιάτα που έγιναν οι επιδράσεις με τους φαρμακολογικούς παράγοντες σε σωληνάρια των 1.5 mL. Γίνεται πλύσιμο με PBS (1 δισκίο PBS (GIBCO) διαλύεται σε 500 mL dH₂O, το διάλυμα διηθείται και φυλάσσεται στους 4° C), φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/λεπτό (rpm) για περίπου 1 λεπτό, και επαναδιάλυση της πελέτας σε 60 ή 30 μL Sample Buffer (διάλυμα 2X με τελικό όγκο 10 mL: 0.625 mL Tris pH 6.8, 4 mL SDS 10%, 4ml H₂O, 0,4 mL β-mercaptoethanol, 2 mg Bromophenol Blue, 1 mL Glycerol) για κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πιάτα των 6 ή 12 πηγαδιών αντίστοιχα.

Βήμα 2- Ηλεκτροφόρηση

- Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%

- Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating Gel): 4.95 mL dH₂O, 6 mL 30% acrylamide, 3.75 mL Separating Gel Buffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS), 150 μL 10% APS (Ammonium Persulfate), 6 μL TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, MERCK).
 - Πήκτωμα πακεταρίσματος (Stacking Gel): 5.1 mL dH₂O, 1.275 mL 30% acrylamide, 0.937 mL Stacking Gel Buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS), 75 μL 10% APS, 8.5 μL TEMED.
- Τοποθέτηση του πήκτωματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (Biorad).
- Προσθήκη 1 L Running Buffer 1X (Running Buffer 10X, τελικός όγκος 1L σε H₂O: 30.3 g Tris-HCl, pH 8.3, 144.2 g Glycine, 10 g SDS).
- Φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα πηγάδια (wells) του πήκτωματος. Φορτώνουμε και δείγματα αρνητικού και θετικού ελέγχου.
- Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 80 V για όσο χρόνο τα δείγματα βρίσκονται στο πήκτωμα πακεταρίσματος και όταν το ξεπεράσουν ρυθμίζεται στα 100 V.

Βήμα 3 - Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- Παρασκευή 1X Transfer Buffer (Transfer Buffer 10X, τελικός όγκος 1L σε H₂O: 30.3 g Tris-HCl, pH 8.3, 144.2 g Glycine).
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφέρεται το πήκτωμα, απομακρύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού και κρατάμε το πήκτωμα πακεταρίσματος.
- Χρησιμοποιούμε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (PROTRAN) και κομμάτια χαρτιού whattman.
- Η συσκευή μεταφοράς τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε διάλυμα Transfer Buffer 1X και προστίθεται πάγος.
- Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος 350 mA για 1 ώρα.

Βήμα 4 - Ανοσοαποτύπωση

- Η μεμβράνη επώαζεται σε διάλυμα TBS 1X (TBS 10X, τελικός όγκος 1 L: 24.2 g Tris-HCl, pH 7.6, 80 g NaCl) με 1% Tween-20 (TBST) και 5% γάλα για 45 λεπτά περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πρωτεΐνες του γάλατος καλύπτουν τις μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης και ανταγωνίζονται την πρόσδεση σε αυτές των αντισωμάτων, μειώνοντας έτσι το θόρυβο.
- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτοταγές αντίσωμα, αραιωμένο σε TBST για 12-18 ώρες στους 4° C.

- Πρωτοταγές αντίσωμα capsase-3/rabbit (Cell Signaling) χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:1000.
 - Πρωτοταγές αντίσωμα GAP-DH/rabbit (Cell Signaling) χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:1000
- Τρεις πλύσεις με TBST των είκοσι λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Επώαση της μεμβράνης με το δευτεροταγές αντίσωμα anti-rabbit-R-phycoerythrin conjugated (Sigma), αραιωμένο σε TBST (1/8.000), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Τρεις πλύσεις με TBST των 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Προσθήκη στη μεμβράνη υποστρώματος υπεροξειδάσης για την αντίδραση χημειοφωταύγειας (ECL Western blotting kit – ECL Amersham Biosciences, UK) για λίγα δευτερόλεπτα.
 - Η μεμβράνη εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-Omat AR films) σε συνθήκες απόλυτου σκότους για την εμφάνιση των ειδικών ζωνών.
 - Γίνεται χρώση με το αντίσωμα της πρωτεϊνης GAP-DH, που εκφράζεται σταθερά σε όλα τα κύτταρα (house keeping), με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που παίρνουμε για την έκφραση της κασπάσης.

Βήμα 5 - Stripping

- Γίνονται πλύσεις με TBST για τον καθαρισμό της μεμβράνης από το ECL.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης σε Stripping Buffer (20ml SDS 10%, 12,5ml Tris pH 6.8, 67,5ml dH₂O, 0,8ml β-mercaptoethanol) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 56° C με ανάδευση κάθε 5 λεπτά.
- Πλύσεις για περίπου 30 λεπτά με TBST.
- Ακολουθείται η διαδικασία επώασης των αντισωμάτων, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

3.6) APOPercentage apoptosis Assay

1^η ΗΜΕΡΑ:

Βήμα 1: Στρώσιμο κυττάρων σε 96-well plate

- Προσθήκη 100μl/well κολλαγόνου (για τελικό όγκο 5ml κολλαγόνου: 0,1 ml κολλαγόνο, 1,4ml pure ethanol, 3,5ml H₂O) και επώαση για περίπου 2 ώρες στον incubator.
- Αφαίρεση του κολλαγόνου και προσθήκη κυττάρων σε 200μl/well ορό.
- Επώαση overnight.

2^η ΗΜΕΡΑ:

Βήμα 2: Προσθήκη επιδράσεων

Πριν την προσθήκη των επιγράσεων πραγματοποιήθηκε 3 φορές πλύσιμο με Serum Free.

3^η ΗΜΕΡΑ:

Βήμα 3: Προσθήκη χρώσης

- Προσθήκη 100μl/well φρέσκο ορό και 5μl/well APOPercentage dye.
- Επώση για 30 λεπτά, 37° C.
- Πλύσιμο με 200μl/well PBS (2x)
- Παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

3.7) Χρώση κασπάσης-3 για κυτταρομετρία ροής.

Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έγινε χρώση των κυττάρων με την βοήθεια του FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Biosciences, CA #550480). Τα κύτταρα, σε συγκέντρωση 1×10^6 , φιξαρίστηκαν και έγιναν διαπερατά ύστερα από επαναδιάλυση σε 100μl Cytotfix/ Cytoperm (BD Biosciences) buffer, επώση στον πάγο για 30 λεπτά και προσθήκη 0.5 ml BD Perm/Wash buffer (1x) (BD Biosciences). Ακολούθησε πλύσιμο και φυγοκέντρηση στα 300 x g για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 50 μl BD Perm/Wash buffer (1x) και προστέθηκαν 10 μl FITC-conjugated anti-Active Caspase-3 για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε πάλι πλύσιμο και φυγοκέντρηση και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 0,5 ml BD Perm/Wash buffer (1x) και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής.

4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1) Προσθήκη επιδράσεων σε PC12 κύτταρα και επώασή τους για 6,12,24,48 ώρες για έλεγχο κασπάσης-3.

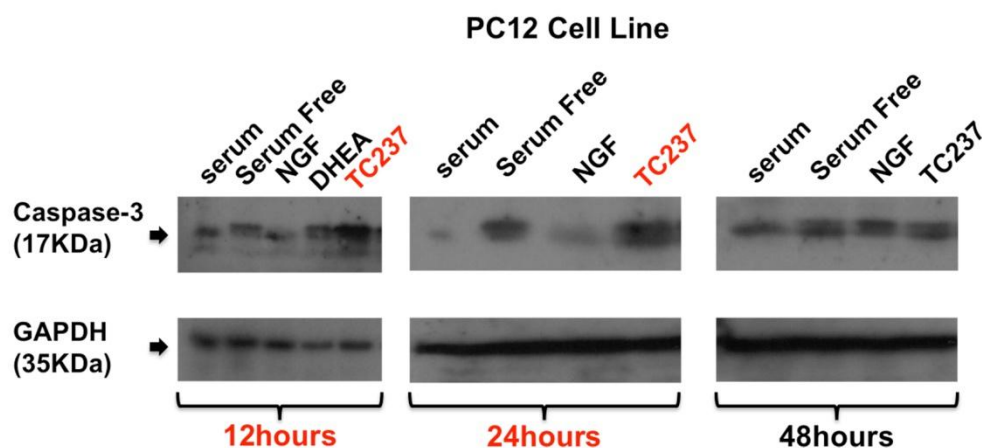
4.1.1) Σε 6-well plate έγινε προσθήκη serum(S), serum free (SF), NGF, DHEA, BNN27, TC237 σε τελικό όγκο 2 ml αφού έγιναν οι παρακάτω αραιώσεις (όλες οι αραιώσεις έγιναν σε SF):

	Stock	Final concentration	Dilution
NGF	100 µg	100 ng	1/1000
DHEA	10 ⁻²	10 ⁻⁷	1/100.000
BNN27	10 ⁻²	10 ⁻⁷	1/100.000
TC237	10 ⁻²	10 ⁻⁷	1/100.000

- Με το πέρας των επώσεων τα κύτταρα συλλέχθηκαν με 1ml PBS και τοποθετήθηκαν σε eppendorfs στον πάγο.
- Φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 4000xg.
- Επαναδιαλύθηκε η πελέτα με sample buffer και χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα για western blot.

4.1.2) Western blot για έλεγχο έκφρασης κασπάσης-3:

Αρχικά έγινε ένας έλεγχος προκειμένου να εντοπιστεί ο καλύτερος χρόνος επώσης των κυττάρων. Έγιναν επιδράσεις με S,SF,NGF,DHEA,TC237 σε PC12 κύτταρα και ύστερα πραγματοποιήθηκε western blot με πρωτοταγές αντίσωμα capsase-3/rabbit (Cell Signaling) προκειμένου να διαπιστωθεί η αποπτωτική δράση του TC237.



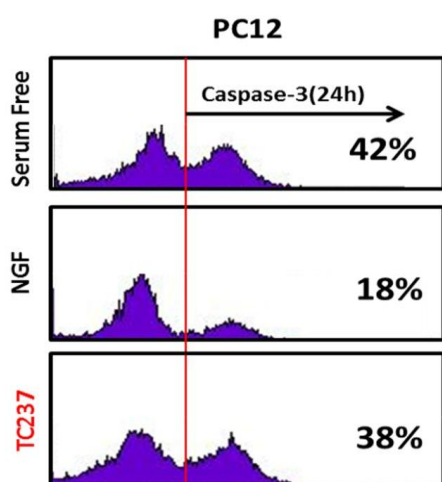
Εικόνα 6 : Έλεγχος για έκφραση της κασπάσης-3 σε PC12 κύτταρα ύστερα από 12,24 και 48 επώσης με τα συστατικά.

Η εικόνα 6 δείχνει την έκφραση της κασπάσης-3 ύστερα από 12, 24 και 48 ώρες επώασης. Για δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επώαστηκαν με ορό, χωρίς ορό και χωρίς ορό αλλά με παρουσία NGF. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι επώαση των κυττάρων με ορό ή χωρίς ορό αλλά με την παρουσία NGF, επάγει την επιβίωσή τους κι επομένως παρουσιάζεται μειωμένη έκφραση της κασπάσης-3, ενώ η επώασή τους χωρίς ορό επάγει την απόπτωση. Επομένως, ο κατάλληλος χρόνος επώασης αποφασίστηκε σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι κατάλληλος χρόνος επώασης είναι οι 24 ώρες, καθώς βλέπουμε αντιπροσωπευτικότερα αποτελέσματα στα δείγματα ελέγχου σε σχέση με τις 12 ώρες, ενώ ύστερα από 48 ώρες εμφανίζεται υψηλή απόπτωση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο στρες που δέχονται τα κύτταρα μετά από εκτεταμένη έκθεση στα συστατικά.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα το συστατικό TC237 φαίνεται να ενεργοποιεί την κασπάση-3, καθώς προσθήκη του συστατικού σε PC12 κύτταρα δείχνει αυξημένη έκφρασή της.

4.1.3) Ανάλυση έκφρασης κασπάσης-3 σε PC12 κύτταρα, με FACS.

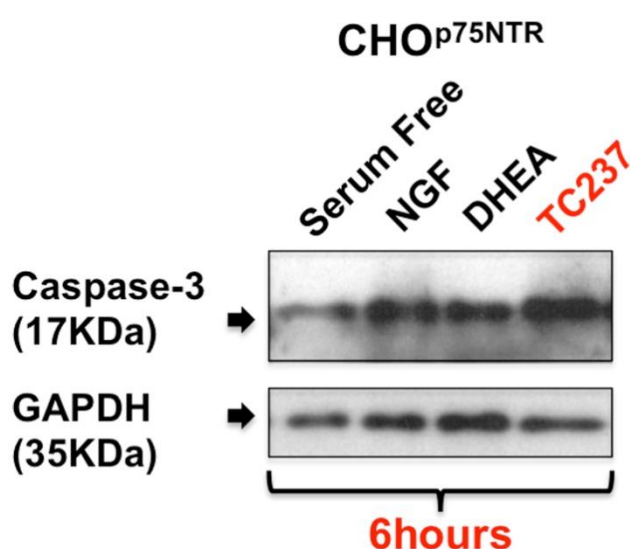
Το συμπέρασμα που προκύπτει από το western blot, επαληθεύεται από την ανάλυση με FACS, κυττάρων που έχουν επωαστεί παρουσία NGF και TC237. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, ύστερα από επώαση των κυττάρων για 24 ώρες παρουσία του συνθετικού αναλόγου TC237, εμφανίζεται αύξηση της κασπάσης-3, σε επίπεδα που πλησιάζουν την απόπτωση που επέρχεται ύστερα από επώαση των κυττάρων σε SF συνθήκες.



Εικόνα 7 : Ανάλυση με FACS για έκφραση κασπάσης-3 σε PC12 κύτταρα.

4.2) Διαμόλυνση CHO κυττάρων με p75NTR και έλεγχος έκφρασης κασπάσης-3 με western blot:

Ο p75NTR μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους Trk υποδοχείς επάγοντας την επιβίωση των νευρικών κυττάρων και την διαφοροποίησή τους, ως απόκριση στις νευροτροφίνες, ενώ μπορεί να μεσολαβήσει απόπτωση, ως απόκριση στις προνευροτροφίνες. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιήθηκαν CHO κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με τον νευροτροφικό υποδοχέα p75NTR, προκειμένου να ελεγχθεί η αποπτωτική δράση του TC237 μέσω του p75NTR.



Εικόνα 8 : Έλεγχος για έκφραση της κασπάσης-3 σε κύτταρα CHO διαμολυσμένα με p75NTR ύστερα από 6 ώρες επώασης με τα συστατικά.

Στην εικόνα 8 παρατηρείται αύξηση της κασπάσης-3 (σε σχέση με το SF) παρουσία NGF και DHEA, ενώ επίσης παρατηρείται ενεργοποίηση της κασπάσης-3 με προσθήκη του TC237, πιθανότατα μέσω του p75NTR.

5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε, η παρούσα εργασία είχε ως στόχο τον έλεγχο του συστατικού TC237. Το συστατικό αυτό είναι συνθετικό ανάλογο της DHEA με τα παρακάτω χαρακτηριστικά (Εικόνα 9).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ TC237	
Κωδικός ένωσης	TC237
Μοριακός Τύπος	$C_{25}H_{36}O_2$
Διαλυτότητα	MeOH

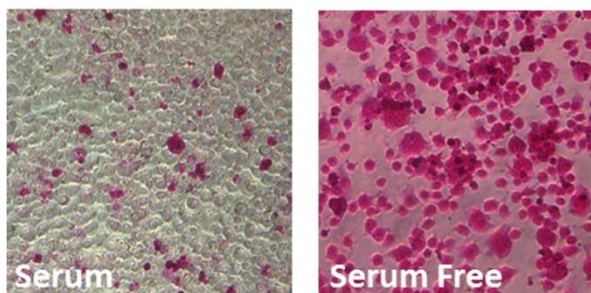
Εικόνα 9 : Χαρακτηριστικά της ένωσης TC237.

Το μόριο TC237 συντέθηκε χημικά με τροποποίηση των θέσεων C3 ή C17 της DHEA με σκοπό να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικό συστατικό για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Calogeropoulou et al., 2009), καθώς τα συνθετικά ανάλογα της DHEA που έχουν κατασκευαστεί έχουν χάσει την ιδιότητα να μεταβολίζονται σε ανδρογόνα και οιστρογόνα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν δείχνουν αύξηση της απόπτωσης με την προσθήκη του μορίου TC237, αλλά χρειάζονται αρκετές επαναλήψεις του πειράματος ώστε να υπάρξει καθοριστικό συμπέρασμα. Συγκεκριμένα, ύστερα από επώαση 24 ωρών και ύστερα από κανονικοποίηση με την πρωτεΐνη GAPDH εμφανίζεται μείωση της απόπτωσης με προσθήκη NGF, αλλά παρουσιάζεται αύξηση με προσθήκη του μορίου TC237.

Επόμενο βήμα για την επιβεβαίωση της δράσης του TC237 είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συστατικού με άλλους υποδοχείς και ιδιαίτερα με τον νευροτροφικό υποδοχέα TrkA. Η μελέτη αυτή μπορεί να γίνει είτε με έλεγχο της φωσφορυλίωσης μέσω TrkA, είτε με πραγματοποίηση binding assay. Επίσης, με την πραγματοποίηση πειραμάτων με χρήση APOPercentage apoptosis assay θα πάρουμε αρκετές πληροφορίες για late event απόπτωση. Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται μια ενδεικτική εικόνα από την παραπάνω τεχνική σε PC12 κύτταρα. Όπως φαίνεται, τα κύτταρα που έχουν επωαστεί σε SF συνθήκες εμφανίζουν αυξημένη απόπτωση, γεγονός που θα χρησιμοποιηθεί ως control για τα περαιτέρω πειράματα παρουσία του συστατικού TC237

PC12

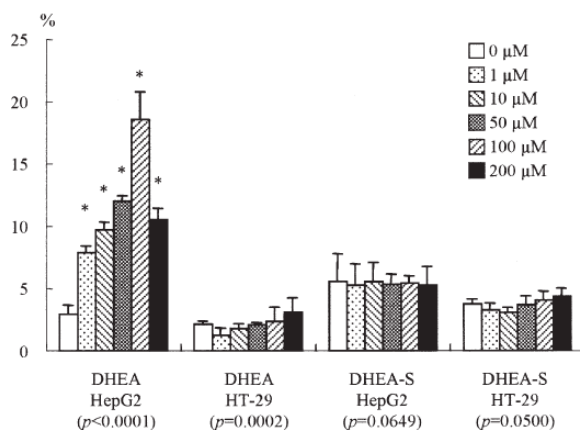


Εικόνα 10 : APOPercentage apoptosis assay σε κύτταρα PC12.

Εάν ύστερα από αρκετές επαναλήψεις εμφανίζονται τα ίδια αποτελέσματα, τότε μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το συνθετικό ανάλογο TC237, δεν έχει αντιαποπτωτικές δράσεις αντίστοιχες της DHEA.

Αντιθέτως, εάν αποδειχθεί ότι το συστατικό αυτό επάγει την απόπτωση μπορεί να μελετηθεί από μια άλλη σκοπιά. Η καταστολή των αποπτωτικών μονοπατιών είναι απαραίτητη για την ογκογένεση. Για να εγκαθιδρυθεί ένας πληθυσμός καρκινικών κυττάρων, δεν απαιτείται μόνο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, απαιτείται επίσης αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην απόπτωση. Για την ακρίβεια, η αντοχή στην απόπτωση είναι χαρακτηριστικό του καρκίνου. Διάφορες συμβατές θεραπευτικές αγωγές έχουν χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αντιμετωπιστεί ο καρκίνος, όπως χημειοθεραπεία και αγωγή κάποιων αντικαρκινικών φαρμάκων, τα οποία φαίνεται να σκοτώνουν κύτταρα μέσω επαγωγής αποπτωτικών διαδικασιών. Βασικός στόχος για την θεραπεία του καρκίνου είναι ο σχεδιασμός νέων φαρμάκων με αποπτωτικές δράσεις. Για τον λόγο αυτό, το συστατικό TC237 μπορεί να μελετηθεί σε καρκινικές σειρές που εκφράζουν τους υποδοχείς NGF προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες.

Παρακάτω φαίνεται ενδεικτικά ένα πείραμα κυτταρομετρίας ροής, που απεικονίζει την αποπτωτική δράση που έχουν οι διάφορες συγκεντρώσεις στεροειδών σε HepG2 και HT-29 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Σκοπός του πειράματος ήταν να εκτιμηθεί ο ρόλος των στεροειδών αυτών στον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Jiang et al., 2005). Με αντίστοιχο τρόπο μπορεί να μελετηθεί η δράση του συστατικού TC237.

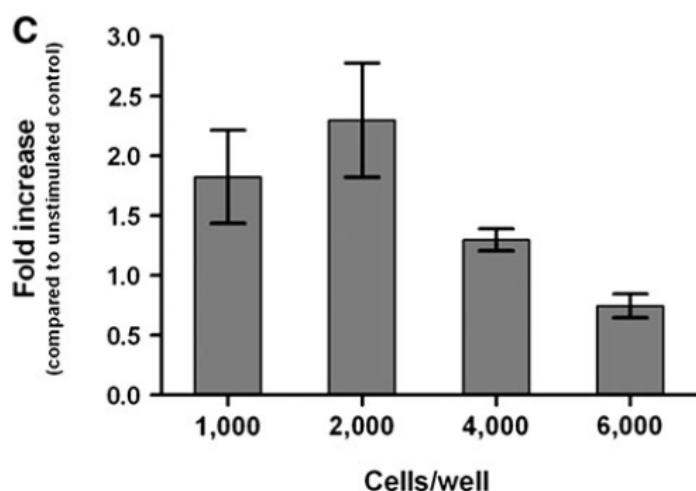


Εικόνα 11 : Επιδράσεις των διάφορων συγκεντρώσεων στεροειδών στην απόπτωση HepG2 και HT-29 κυττάρων (Jiang et al., 2005).

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι υπάρχει δυσκολία ανάλυσης της έκφρασης της κασπάσης-3 σε PC12 κύτταρα και μειωμένη επαναληψιμότητα των πειραμάτων, καθώς απαιτείται καθορισμένη πυκνότητα

κυττάρων για ορθή έκβαση αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί σε κύτταρα διαμολυσμένα μόνο με τον νευροτροφικό υποδοχέα p75NTR, ότι αν η αρχική πυκνότητα των κυττάρων είναι 2000 κύτταρα/πηγάδι, τότε παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης της κασπάσης-3 ύστερα από διέγερση με NGF από ότι αν η αρχική πυκνότητα ήταν 1000 ή 4000 κύτταρα/πηγάδι. Ενδιαφέρον επίσης, παρουσιάζει το γεγονός ότι σε αρχική πυκνότητα 6000 κύτταρα/πηγάδι δεν εμφανίζεται καμία αύξηση της κασπάσης-3 με προσθήκη NGF (Εικόνα 12). Επομένως, η ικανότητα των νευροτροφινών να επηρεάζουν την ενεργότητα τα κασπάσης-3 εξαρτάται από την αρχική πυκνότητα των κυττάρων στο πιάτο καλλιέργειας (Bradshaw et al., 2012).

Σε PC12 κύτταρα που περιέχουν ενδογενώς και τους δύο νευροτροφικούς υποδοχείς (TrkA, p75NTR), η έκφραση της κασπάσης-3 με την προσθήκη νευροτροφινών θα επηρεάζεται επίσης από την κυτταρική πυκνότητα.



Εικόνα 12 : Επίδραση της κυτταρικής πυκνότητας στην ικανότητα του NGF να καθορίζει την έκφραση της Κασπάσης-3 (Bradshaw et al., 2012).

Η ύπαρξη θεραπείας για νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι πλέον επιτακτική ανάγκη, καθώς μεγάλο μέρος του πληθυσμού πάσχει από νευροεκφυλιστικές νόσους. Τα νευροστεροειδή και ειδικότερα τα συνθετικά ανάλογα των νευροστεροειδών μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους, καθώς ήδη έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως φάρμακα τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Ενδεικτικά, φαίνεται ο φαρμακολογικός ρόλος και ο μηχανισμός δράσης κάποιων νευροστεροειδών στον Πίνακα 5.

Τέλος, η σημασία ύπαρξης αρκετών συνθετικών αναλόγων με κοινή λειτουργία και παρόμοια, αλλά όχι ίδια χαρακτηριστικά, δίνει στις φαρμακοβιομηχανίες την δυνατότητα εναλλακτικής χρήσης τους σε περίπτωση που υπάρξουν παρενέργειες από την χρήση του ενός συστατικού. Για το λόγο αυτό πρέπει να μελετηθούν όλα τα νέα συνθετικά ανάλογα που έχουν κατασκευαστεί.

Neurosteroid	Pharmacological Actions	Mechanism of Action
Allopregnanolone	Sedative-hypnotic Anxiolytic, anticonvulsant Antistress, neuroprotection	Potentialiation of GABA-A receptor function
THDOC	Sedative-hypnotic Anxiolytic, anticonvulsant Antistress, neuroprotection	Potentialiation of GABA-A receptor function
Androstanediol	Anxiolytic, anticonvulsant	Potentialiation of GABA-A receptor function
Pregnenolone sulfate	Anxiogenic, proconvulsant Memory enhancing, neuroprotection	Inhibition of GABA-A receptor function Enhanced NMDA receptor function
Dehydroepiandrosterone sulfate	Anxiogenic, proconvulsant Memory enhancing Neurogenesis, neuroprotection	Inhibition of GABA-A receptor function Enhanced NMDA receptor function Anti-glucocorticoid action

Πίνακας 5: Φαρμακολογικό προφίλ ορισμένων νευροστεροειδών (Reddy, 2010)

6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, M. C., & Shaham, S. (2004). Death without caspases, caspases without death. *Trends in cell biology*, 14(4), 184-93.
- Arévalo, J. C., & Wu, S. H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(13), 1523-37.
- Baulieu, E. (1998). NEUROSTEROIDS: A NOVEL FUNCTION OF THE BRAIN. *Psychoneuroendocrinology*, 23(8), 963-987.
- Baulieu, E. E., Robel, P., & Schumacher, M. (2001). Neurosteroids: Beginning of the story. In R. H. P. B. T.-I. R. of N. Giovanni Biggio (Ed.), *Neurosteroids and Brain Function* (Vol. Volume 46, pp. 1-32). Academic Press.
- Bradshaw, J. M., Nguyen, L., Wallace, W., Li, C., Sauer, J.-M., Bard, F., & Bova, M. P. (2012). Monitoring Signaling by the p75(NTR) Receptor Utilizing a Caspase-3 Activation Assay Amenable to Small-Molecule Screening. *Assay and drug development technologies*, XX(Xx), 1-12.
- Calogeropoulou, T., Avlonitis, N., Minas, V., Alexi, X., Pantzou, A., Charalampopoulos, I., Zervou, M., et al. (2009). Novel dehydroepiandrosterone derivatives with antiapoptotic, neuroprotective activity. *Journal of medicinal chemistry*, 52(21), 6569-87.
- Chao, M. V., & Bothwell, M. (2002). Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*, 33(1), 9-12.
- Chao, M. V., Rajagopal, R., & Lee, F. S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical science (London, England : 1979)*, 110(2), 167-73.
- Charalampopoulos, I., Lazaridis, I., & Gravanis, A. (2011). Neuroprotective and Neurogenic Properties of Dehydroepiandrosterone and its Synthetic Analogs. *Hormones in Neurodegeneration, Neuroprotection, and Neurogenesis* (pp. 137-154). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Charalampopoulos, I., Remboutsika, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2008). Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 19(8), 300-7.
- Charalampopoulos, I., Tsatsanis, C., Dermitzaki, E., Alexaki, V.-I., Castanas, E., Margioris, A. N., & Gravanis, A. (2004). Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via

antiapoptotic Bcl-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8209-14.

Compagnone, N. a, & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), 1-56.

Davies, A. M. (1991). Nerve Growth Factor Synthesis and Nerve Growth Factor Receptor Expression in Neural Development. In K. W. J. and M. F. B. T.-I. R. of Cytology (Ed.), (Vol. Volume 128, pp. 109-138). Academic Press.

Dechant, G., & Barde, Y.-A. (2002). The neurotrophin receptor p75NTR: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*, 5(11), 1131-1136.

Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead, H., & Lazebnik, Y. (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *EMBO J*, 16(9), 2271-2281. European Molecular Biology Organization.

Fan, T.-J., Han, L.-H., Cong, R.-S., & Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 719-727.

Feinstein-Rotkopf, Y., & Arama, E. (2009). Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 14(8), 980-95.

Gastard, M. C., Troncoso, J. C., & Koliatsos, V. E. (2003). Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 54(3), 393-8.

Graeber, M. B., & Moran, L. B. (2002). Mechanisms of Cell Death in Neurodegenerative Diseases: Fashion, Fiction, and Facts. *Brain Pathology*, 12(3), 385-390.

Haviv, R., Lindenboim, L., Li, H., Yuan, J., & Stein, R. (1997). Need for caspases in apoptosis of trophic factor-deprived PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research*, 50(1), 69-80. John Wiley & Sons, Inc.

Herrup, K., & Shooter, E. M. (1973). Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3884-8.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C.-Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., et al. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, 384(6607), 368-372

Lazaridis, I., Charalampopoulos, I., Alexaki, V.-I., Avlonitis, N., Pediaditakis, I., Efstathopoulos, P., Calogeropoulou, T., et al. (2011). Neurosteroid

- dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis. *PLoS biology*, 9(4), e1001051.
- Levi-montalcini, R. (1987). The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *The EMBO journal*, 6(9), 2856.
- Liepinsh, E., Ilag, L. L., Otting, G., & Ibanez, C. F. (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J*, 16(16), 4999-5005. European Molecular Biology Organization.
- Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(2), 120-9.
- Mellon, S. H., & Vaudry, H. (2001). Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. *International review of neurobiology*, 46, 33-78.
- Reddy, D. S. (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Progress in Brain Research*, 186, 113-137. Elsevier B.V.
- Schechterson, L. C., & Bothwell, M. (2010). Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Developmental neurobiology*, 70(5), 332-8.
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R. J., Garcia-Segura, L. M., Lambert, J. J., et al. (2003). Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in neurobiology*, 71(1), 3-29.
- Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Associated with Apoptosis. *Biochemistry*, 273(16), 9357-9360.
- Underwood, C. K., & Coulson, E. J. (2008). The p75 neurotrophin receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(9), 1664-8.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R. S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., et al. (2009). Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron*, 62(1), 72-83
- Watson, F. L., Porcionatto, M. A., Bhattacharyya, A., Stiles, C. D., & Segal, R. A. (1999). and Activity, 5.
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, a, Kägi, D., Hakem, a, et al. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes & development*, 12(6), 806-19.
- Zampieri, N., & Chao, M. V. (2006). Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochemical Society transactions*, 34(Pt 4), 607-11

Jiang, Y., Miyazaki, T., Honda, A., Hirayama, T., Yoshida, S., Tanaka, N., & Matsuzaki, Y. (2005). Apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in the anti-proliferative actions of dehydroepiandrosterone. *Journal of gastroenterology*, 40(5), 490-7.