



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

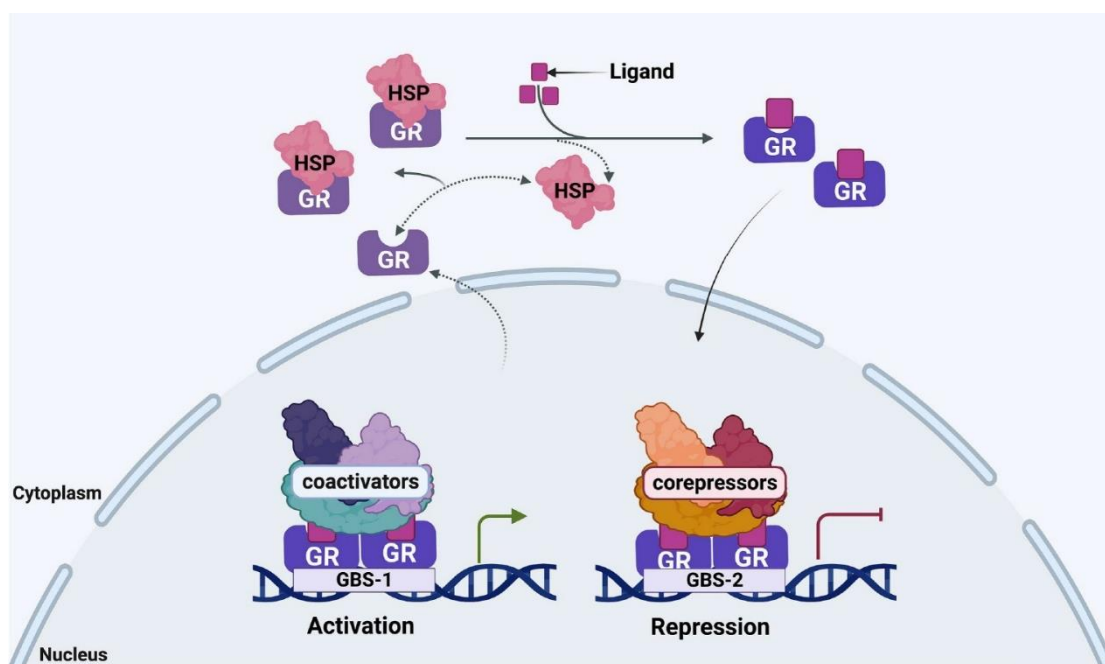
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΜΑΤΟΣ SH-SY5Y»

«INVESTIGATION OF THE SUBCELLULAR LOCALIZATION OF
GLUCOCORTICOID RECEPTOR DURING NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELL
DIFFERENTIATION»



Ονοματεπώνυμο: Παπαβασιλείου Μιχαέλα του Θεοφάνους

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα-Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

Ψαρρά Άννα -Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την τιμή που μου έκανε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την καθοδήγηση της και να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα για την υπομονή και την βοήθεια που προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άριστη συνεργασία και την υποστήριξη τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου που με στήριξε ψυχολογικά και με ενθάρρυνε καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SH-SY5Y.....	8
1.1.1 Νευροβλάστωμα	8
1.1.2 Κυτταρική σειρά SH-SY5Y	8
1.1.3 Διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y μέσω ρετινοϊκού οξέως (RA)	9
1.1.4 Δείκτης διαφοροποίησης νευρώνων Tuj-1	10
1.2 Πυρηνικοί υποδοχείς.....	10
1.3 Στεροειδείς ορμόνες	11
1.3.1 Ενδογενείς στεροειδείς ορμόνες	11
1.3.2 Οιστραδιόλη (E2)	11
1.3.3 Συνθετικά Στεροειδή	12
1.3.4 Διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN)	12
1.3.5 Δεξαμεθαζόνη (DEX)	13
1.4 Γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες	14
1.4.1 Γλυκοκορτικοειδή	14
1.4.2 Ρύθμιση της παραγωγής κι έκκρισης γλυκοκορτικοειδών ορμονών ..	14
1.4.3 Ρύθμιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών σε τοπικό επίπεδο	15
1.4.4 Φυσιολογικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών σε διαφορετικούς ιστούς	16
1.5 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ορμονών (GR)	17
1.5.1 Γονίδιο GR και ισομορφές.....	17
1.5.2 Δομή GR.....	18
1.5.3 Προσδετοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του GR	20
1.5.4 Μη προσδετοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του GR	21
1.5.5 Γενωμικές δράσεις του GR.....	21
1.5.6 Μη γενωμικές δράσεις του GR	23
1.6 Ρόλος του GR στα μιτοχόνδρια	24
1.7 GR και νευρική διαφοροποίηση.....	25
1.8 Σκοπός	25

2. Υλικά και μέθοδοι	27
2. 1 Όργανα.....	27
2.2 Υλικά.....	27
2.2.1 Αναλώσιμα	27
2.2.2 Χημικά	28
2.2.3 Διαλύματα	28
2.2.4 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών	30
2.2.5 Αντισώματα.....	30
2.2.6 Χρωστικές.....	30
2.3 Τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών	30
2.3.1 Θρυψινοποίηση.....	30
2.3.2 Καταμέτρηση κυττάρων	31
2.3.3 Καλλιέργεια διαφοροποιημένων κυττάρων.....	31
2.3.4 Καλλιέργεια αδιαφοροποίητων κυττάρων	32
2.4 Συλλογή κυττάρων (Harvest)	32
2.5 Τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας	33
2.5.1 Χρώση μιτοχονδρίων	33
2.5.2 Μονιμοποίηση κυττάρων.....	33
2.5.3 Χρώση πυρήνων και GR	34
2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και Western Blot	34
2.6.1 Lysis-Sonication-Bradford	34
2.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση	35
2.6.3 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες-SDS PAGE.....	36
2.6.4 Ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	37
2.6.5 Blocking.....	37
2.6.6 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών	38
2.6.7 Ανίχνευση σήματος χημειοφωταύγειας	39
3. Αποτελέσματα	40
3.1 Αποτελέσματα Ανοσοκυτταροχημείας	40
3.2 Αποτελέσματα Western blot	42
4. Συζήτηση – Μελλοντική έρευνα	46
5.Βιβλιογραφία	49

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs) αποτελούν μία κατηγορία στεροειδών ορμονών που έχουν ως πρόδρομη ένωση την χοληστερόλη και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού. Η κορτιζόλη είναι η πιο γνωστή και αντιπροσωπευτική ένωση αυτής της κατηγορίας στον άνθρωπο. Τα GCs λειτουργούν ως απόκριση στο στρες, τη φλεγμονή, ενώ συμμετέχουν και σε αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση, η αναπαραγωγή καθώς και στη ρύθμιση του μεταβολισμού. Η ευρεία δράση τους, έχει οδηγήσει στη δημιουργία συνθετικών παραγώγων τους, που χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς.

Η δράση των γλυκοκορτικοειδών πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (glucocorticoid receptor, GR), ο οποίος σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενεργοποιηθεί ακόμη και απουσία των ορμονών. Με την ενεργοποίηση του ο GR, μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λειτουργώντας ως μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Επιπλέον, έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως των MAPK και PI3K/Akt, ενώ παράλληλα έρευνες υποδεικνύουν τη σημαντική του δράση και σε μιτοχονδριακό επίπεδο.

Με στόχο να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών, στην διαδικασία πρώιμων σταδίων νευρικής διαφοροποίησης της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y, ελέγξαμε την πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αλλά και την πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών του επιπέδων, παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών (DEX, E2, DPN). Έτσι, αφού επήγαμε την διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y, σε πρώιμα στάδια μέσω ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid, RA), χρησιμοποιήσαμε τις τεχνικές της ανοσοκυταροχημείας και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν, πως κατά διαδικασία της διαφοροποίησης στο χρονικό διάστημα που μελετήσαμε, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα. Όσο αναφορά τα πρωτεϊνικά του επίπεδα, φάνηκε να μειώνονται στις συνθήκες των διαφοροποιημένων κυττάρων, τόσο απουσία όσο και παρουσία ορμονών.

Abstract

Glucocorticoids (GCs) are a class of steroid hormones derived from cholesterol that play an important role in various physiological processes of the body. Cortisol is the most common and representative compound of this class in humans. GCs function in response to stress, inflammation and they are also involved in developmental processes such as differentiation, reproduction, and metabolic regulation. Their broad action has led to the production of their synthetic derivatives, which are used for medical purposes.

The action of glucocorticoids occurs through their binding to the glucocorticoid receptor (GR), which, in some cases, can be activated even in the absence of hormones. Upon activation, GR moves from the cytoplasm to the nucleus of cells, where it functions as a transcription factor, either inducing or suppressing the transcription of specific target genes. Additionally, GR can interact with other signaling pathways such as MAPK and PI3K/Akt, and research also suggests its significant role at the mitochondrial level.

Aiming to clarify the role of glucocorticoid receptor in the process of early-stage neuronal differentiation of SH-SY5Y cell line, we examined the possible differential subcellular localization of the receptor during this process and any possible changes in its protein levels, both in the presence and absence of steroid hormones (DEX, E2, DPN). After inducing differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells, at early stages via retinoic acid (RA), we used immunocytochemistry and Western blotting techniques. The results showed that during the differentiation process over the time period we studied, no change in the subcellular localization of the receptor was observed. Regarding its protein levels, they appeared to decrease in differentiated cells, both in the presence and absence of hormones.

1. Εισαγωγή

1.1 Κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SH-SY5Y

1.1.1 Νευροβλάστωμα

Το νευροβλάστωμα, αποτελεί έναν πολύπλοκο τύπο καρκίνου που παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά. Προέρχεται από συμπαθοεπινεφριδιακά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας και συνήθως εμφανίζεται στα επινεφρίδια και τα παρασπονδυλικά γάγγλια. Τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας έχουν εμβρυική εξωδερμική προέλευση και μεταναστεύουν σε διάφορα μέρη του σώματος μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα. Παλαιότερα κυριαρχούσε η πεποίθηση πως τα κύτταρα αυτά μετά την μετανάστευσή τους, έχαναν την «πλαστικότητα» τους. Ωστόσο, μελέτες δείχνουν πως κάποιοι υποπληθυσμοί αυτών διατηρούν ιδιότητες βλαστοκυττάρων σε ενήλικους ιστούς και έτσι συμβάλλουν στην ανάπτυξη όγκων, όπως το μελάνωμα και το νευροβλάστωμα. Στη δημιουργία του νευροβλαστώματος εμπλέκονται διάφορα γονίδια, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας MYC ή το γονίδιο ALK που κωδικοποιεί για έναν υποδοχέα κινάσης-τυροσίνης (Kholodenko et al., 2018).

1.1.2 Κυτταρική σειρά SH-SY5Y

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί έναν υποκλώνο της σειράς SK-N-SH που προήλθε από μία βιοψία μυελού των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού με μεταστατικό νευροβλάστωμα. Η κυτταρική σειρά SK-N-SH αποτελείται από 3 νευρονικούς τύπους κυττάρων. Οι τύποι αυτοί, αφορούν νευρονικά κύτταρα (N type), κύτταρα Schwann (S type) κι ενδιάμεσους νευρώνες (I type). Η σειρά SH-SY5Y είναι σχετικά ομοιογενής κι αποτελείται από νευρονικού τύπου κύτταρα (Xie et al., 2010).

Τα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y έχουν την δυνατότητα διαφοροποίησης προς κύτταρα με φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των νευρώνων και μπορούν να αναπαράγουν τις βιοχημικές και μορφολογικές τους ιδιότητες. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για την μελέτη της νευροτοξικότητας, της νευροπροστασίας, της καρκινογένεσης καθώς και της διαφοροποίησης και των μεταβολικών χαρακτηριστικών των νευρώνων (Zhang et al., 2021).

1.1.3 Διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y μέσω ρετινοϊκού οξέως (RA)

Για την διαφοροποίηση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y και την διεξαγωγή μελετών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι παράγοντες, με τους πιο γνωστούς από αυτούς να είναι: το ρετινοϊκό οξύ (RA), ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF), το διβουτύρυλο κυκλικό AMP (dBcAMP) και η σταυροσπορίνη (Xie et al., 2010).

Το ρετινοϊκό οξύ, που λειτουργεί ως παράγοντας διαφοροποίησης και χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y, είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της βιταμίνης Α. Ασκεί τη δράση του συνδεδεμένο στους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος (RAR), οι οποίοι σχηματίζουν ετεροδιμερές με τους υποδοχείς Χ του ρετινοϊκού οξέος (RXR), ενώ και οι δύο αυτοί τύποι υποδοχέων ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. (Schubert & Germain, 2023). Απουσία προσδέτη, το ετεροδιμερές βρίσκεται προσδεδεμένο σε συγκεκριμένες περιοχές των γονιδίων που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στο ρετινοϊκό οξύ (RAREs) και σε συνεργασία με καταστολείς της μεταγραφής, καταστέλλουν την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Παρουσία του ρετινοϊκού οξέος, το οποίο συνδέεται στους RARs, οι υποδοχείς υφίστανται αλλαγή της διαμόρφωσής τους με αποτέλεσμα την αντικατάσταση των καταστολέων με ενεργοποιητές της μεταγραφής (Makimoto et al., 2024). Ανάμεσα στα γονίδια που ενεργοποιούνται μέσω του RA, είναι αυτά που κωδικοποιούν για υποδοχείς νευροτροφινών. Παράλληλα το RA συμβάλλει στη διαφοροποίηση των κυττάρων, αλληλεπιδρώντας επίσης με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως το Wnt (Xie et al., 2010) και το PI3K/Akt (Illendula et al., 2020).

Τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα. Τα μη διαφοροποιημένα, πολλαπλασιάζονται γρήγορα, δεν παρουσιάζουν πολικότητα κι εμφανίζουν ανώριμους νευρονικούς δείκτες. Αντιθέτως, τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζουν πολικότητα (Shipley et al., 2016) και μορφολογικά χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό εκτεταμένων, διακλαδισμένων νευριτών καθώς και συνάψεων (Cheung et al., 2009). Επιπλέον, εμφανίζουν ώριμους νευρονικούς δείκτες, όπως η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την ανάπτυξη (GAP-43), η συναπτοφυσίνη (SYN) και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους (MAP) (Shipley et al., 2016).

1.1.4 Δείκτης διαφοροποίησης νευρώνων Tuj-1

Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, που έχουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες διεργασίες, όπως τη μεταφορά κυστιδίων, τη κινητικότητα των κυττάρων και τη μίτωση. Ουσιαστικά αποτελούνται από ετεροδιμερή α- και β- τουμπουλίνης. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν 8 ισομορφές της α-τουμπουλίνης και 7 ισομορφές της β-τουμπουλίνης.

Η βIII-τουμπουλίνη (Tuj-1) αποτελεί μια ισομορφή β-τουμπουλίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο TUBB3 που βρίσκεται στην τελομερική περιοχή του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (Duly et al., 2022). Αυτή η ισομορφή, εκφράζεται νωρίς κατά την νευρική διαφοροποίηση, ενώ συνεχίζει να εκφράζεται σε ώριμους νευρώνες. Έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νευραξόνων, την μετανάστευση νευρώνων και τη δημιουργία πολικότητας. Κατά συνέπεια αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της νευρικής διαφοροποίησης (Katsetos et al., 2003).

1.2 Πυρηνικοί υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NRs) αποτελούν μία κατηγορία μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούνται με την σύνδεση κατάλληλου προσδέτη κι συμμετέχουν σε διάφορες διαδικασίες της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού (Frigo et al., 2021). Κάποιες από αυτές τις διαδικασίες αφορούν τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την αναπαραγωγή. Παραδείγματα προσδετών που συνδέονται στους πυρηνικούς υποδοχείς και ενεργοποιούν την δράση τους είναι λιπόφιλα μόρια, όπως οι στεροειδείς και οι θυροειδείς ορμόνες, τα ρετινοειδή και η βιταμίνη D. Βέβαια, υπάρχουν μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων που χαρακτηρίζονται ως ορφανοί υποδοχείς, καθώς μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστοί οι προσδέτες που τους ενεργοποιούν (Aranda & Pascual, 2001).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι NRs ασκούν την δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, κάποια μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων απουσία προσδέτη βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργά σύμπλοκα. Με την σύνδεση αυτού, μετατοπίζονται στον πυρήνα κι έχουν την δυνατότητα να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (ενεργοποιητές ή καταστολείς). Από την άλλη, κάποιοι NRs χωρίς την σύνδεση προσδέτη βρίσκονται στον πυρήνα και σχηματίζουν σύμπλοκα με καταστολείς της μεταγραφής, επιφέροντας την γονιδιακή σίγηση. Παρουσία προσδέτη, οι υποδοχείς υφίστανται αλλαγή της διαμόρφωσής τους, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση των καταστολέων με ενεργοποιητές της μεταγραφής και ακολούθως την μεταγραφική ενεργοποίηση

των γονιδίων (Weikum et al., 2018). Παράλληλα, εκτός από τον ρόλο τους στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μπορεί να επάγουν και έμμεσες επιδράσεις, ενεργοποιώντας άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. ενεργοποίηση μονοπατιού Src/Ras/MAPK από τα οιστρογόνα) (Aranda & Pascual, 2001).

Η οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων χωρίζεται σε 7 υποοικογένειες (υποοικογένεια 0 – υποοικογένεια 6). Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών ορμονών, ανήκουν στην υποοικογένεια 3, η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών που έχουν σημαντικό ρόλο σε αναπτυξιακές και μεταβολικές διαδικασίες. Άλλα μέλη αυτής της υποοικογένειας, είναι ο υποδοχέας των ανδρογόνων (AR), ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR) και οι υποδοχείς των οιστρογόνων (ERα, ERβ) (Weikum et al., 2018).

1.3 Στεροειδείς ορμόνες

1.3.1 Ενδογενείς στεροειδείς ορμόνες

Οι στεροειδείς ορμόνες αποτελούν μία κατηγορία μορίων, που ασκούν τον ρόλο τους μέσω της σύνδεσής τους σε συγκεκριμένους υποδοχείς (υποδοχείς στεροειδών ορμονών, υποκατηγορία πυρηνικών υποδοχέων). Φυσιολογικά στον οργανισμό, παράγονται από τον φλοιό των επινεφριδίων, τις γονάδες και τον πλακούντα και πρόδρομη ένωση αυτών είναι η χοληστερόλη. Η χοληστερόλη στα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη που υπό την επίδραση διαφόρων ενζύμων μπορεί να δώσει διαφορετικά μέλη στεροειδών ορμονών (Schiffer et al., 2019). Αυτές για να ασκήσουν την δράση τους, μεταφέρονται με τη κυκλοφορία του αίματος, συνδεόμενες σε πρωτεΐνες μεταφοράς (τρανσκορτίνη, αλβουμίνη) στα κύτταρα στόχους. Διαχέονται μέσω της πλασματικής μεμβράνης και συνδέονται στο κυτταρόπλασμα στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, ώστε να ρυθμίσουν μέσω των υποδοχέων την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων (Stanišić et al., 2010).

1.3.2 Οιστραδιόλη (E2)

Στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών ανήκουν τα γλυκοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα (Chen et al., 2022). Τα οιστρογόνα είναι λιποδιαλυτά μόρια που συντίθενται κυρίως στις ωοθήκες, καθώς και στα επινεφρίδια και τον λιπώδη ιστό (Fuentes & Silveyra, 2019). Τέτοιες ενώσεις είναι οιστρόνη (E1), η 17β-οιστραδιόλη (E2), η οιστριόλη (E3) και η οιστετρόλη (E4). Όσο αναφορά την οιστραδιόλη, πρόκειται για μία ορμόνη που έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου στις γυναίκες, στην ρύθμιση του κύκλου της έμμηνου ρύσης και στην ανάπτυξη

της επένδυσης του ενδομητρίου. Η συγκεκριμένη ορμόνη, για να ασκήσει τον ρόλο της συνδέεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς, τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERα, ERβ). Οι υποδοχείς ERα και ERβ έχουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης στον οργανισμό. Ο ERα εκφράζεται στο αναπαραγωγικό σύστημα, τους νεφρούς, το ήπαρ, στο μαστό και στο λευκό λιπώδη ιστό. Από την άλλη, ο ERβ εκφράζεται στα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το καρδιαγγειακό και το ανοσοποιητικό σύστημα, τους πνεύμονες και τους νεφρούς. Με την σύνδεση της οιστραδιόλης στους διαφορετικούς υποδοχείς ERs, μπορούν να επαχθούν διακριτές δράσεις (Chen et al., 2022).

1.3.3 Συνθετικά Στεροειδή

Οι στεροειδείς ορμόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες. Έτσι, έχουν συντεθεί συνθετικά στεροειδή που μιμούνται τις φυσιολογικές δράσεις των ενδογενών στεροειδών ορμονών που παράγονται στον οργανισμό. Τέτοιου είδους ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς σκοπούς. Παραδείγματος χάρη, τα αναβολικά στεροειδή αποτελούν συνθετικές ενώσεις τεστοστερόνης που μπορεί να χορηγηθούν σε άνδρες με μειωμένη ενδογενή παραγωγή τεστοστερόνης καθώς και σε περιπτώσεις παθήσεων μυϊκής ατροφίας (Kicman, 2008). Αντίστοιχα, τα κορτικοστεροειδή (ομάδα που περιλαμβάνει τα γλυκοκορτικοειδή και τα αλατοκορτικοειδή) χρησιμοποιούνται για την θεραπεία μιας ευρείας έκτασης διαταραχών, όπως άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ρευματοειδή αρθροίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας καθώς και περιπτώσεις δερματίτιδας και ψωρίασης (Hodgens & Sharman, 2023).

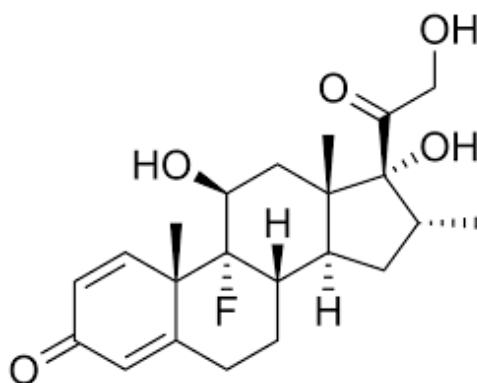
1.3.4 Διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN)

Μία συνθετική στεροειδής ένωση είναι το διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN), που στον οργανισμό αποτελεί εκλεκτικό αγωνιστή του ERβ (υποδοχέας οιστρογόνων β). Η συγκεκριμένη ένωση, φαίνεται να συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια στον ERβ σε σχέση με τον ERα και συνεπώς να επάγει τις δράσεις της δεδομένης ισομορφής του υποδοχέα (Meyers et al., 2001). Η χρήση εξειδικευμένων αγωνιστών για μία συγκεκριμένη ισομορφή του υποδοχέα, όπως του DPN μπορεί να συμβάλλει σε μελέτες αποσαφήνισης του διαφορετικού ρόλου των υποδοχέων και να παρέχει θεραπευτικές επιδράσεις με λιγότερες παρενέργειες (Carroll et al., 2012). Παραδείγματος χάρη σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, η ενεργοποίηση του ERβ μέσω DPN έδειξε μία προστατευτική δράση των καρδιομυοκυττάρων μετά από MI (myocardial

infracation) (Du et al., 2020), μείωσε αγχώδεις συμπεριφορές (Walf et al., 2008) και συνέβαλε στη βελτίωση της γνωστικής ικανότητας (Walf et al., 2008).

1.3.5 Δεξαμεθαζόνη (DEX)

Η δεξαμεθαζόνη (DEX) αποτελεί μία συνθετική γλυκοκορτικοειδή ένωση (υποκατηγορία της ομάδας των στεροειδών ορμονών). Άλλες ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η υδροκορτιζόνη, η πρεδνιζολόνη και η μεθυλοπρεδνιζολόνη (Scherholz et al., 2019). Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, χορηγούνται σε διάφορες παθήσεις λόγω των αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων τους (Timmermans et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα για την δεξαμεθαζόνη, χορηγείται σε αλλεργικές αντιδράσεις, αυτοάνοσες ασθένειες, για τη θεραπεία της λευχαιμίας, αλλά και την αντιμετώπιση της ναυτίας και του εμετού. Το συγκεκριμένο φάρμακο έχει ένα χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται στις 36-72 ώρες, που είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνθετικές ενώσεις. Για αυτό τον λόγο σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει την καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης (ανάλογα με τη δόση και την συχνότητα χορήγησης), λόγω αρνητικής ανατροφοδότησης. Κατά αυτό τον τρόπο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί επιτηδευμένα για την καταστολή αυτού του άξονα και συνεπώς την μελέτη παθολογικών καταστάσεων (σύνδρομο Cushing) και της ενδεχόμενης φαρμακευτικής χρήσης άλλων συνθετικών ενώσεων (Scherholz et al., 2019).



Εικόνα 1: Χημική δομή της δεξαμεθαζόνης (DEX) (Sversut et al., 2015).

1.4 Γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες

1.4.1 Γλυκοκορτικοειδή

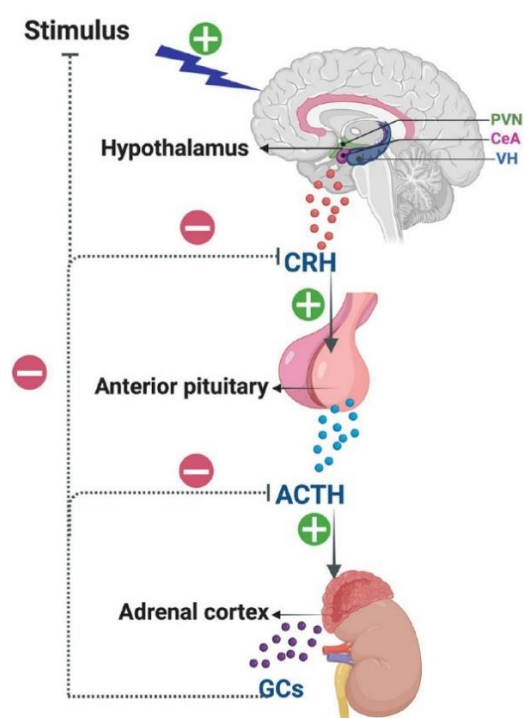
Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) αποτελούν μία κατηγορία στεροειδών ορμονών που είναι απαραίτητες για καθημερινές λειτουργίες των θηλαστικών και παράγονται κατά κύριο λόγο από την στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων. Βέβαια, σε μικρό βαθμό έχει παρατηρηθεί και η παραγωγή τους από τον θύμο αδένα, το αγγειακό σύστημα και τον εγκέφαλο. Σε αυτή την περίπτωση όμως η δράση των GCs φαίνεται να είναι τοπική, προσδίδοντάς τους μία εξειδίκευση που είναι ανεξάρτητη από την παραγωγή τους ως απόκριση στο στρες και τον κιρκάδιο κύκλο (επινεφριδιακή σύνθεση) (Timmermans et al., 2019). Έχουν σημαντικό ρόλο, στη ρύθμιση και τη διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής και μεταβολικής ομοιόστασης του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, λειτουργούν ως απόκριση στο στρες, στη φλεγμονή και συμμετέχουν στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την αναπαραγωγή, καθώς και την ρύθμιση της ισορροπίας του νερού και των ηλεκτρολυτών. Στους ανθρώπους, το κύριο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη και στα τρωκτικά η κορτικοστερόνη. Αυτές οι ορμόνες επάγουν την δράσης τους, μέσω της σύνδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (GR) (Lockett et al., 2024).

1.4.2 Ρύθμιση της παραγωγής κι έκκρισης γλυκοκορτικοειδών ορμονών

Η παραγωγή και η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων πραγματοποιείται με έναν κιρκάδιο τρόπο και ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA axis). Αυτός ο κιρκάδιος ρυθμός παρουσιάζει μέγιστα επίπεδα έκκρισης τις πρώτες πρωινές ώρες για τους ανθρώπους και την αρχή της νύχτας για τα νυκτόβια ζώα (όπως τα ποντίκια) (Timmermans et al., 2019). Εκτός, από την φυσιολογική κιρκάδια διέγερση του άξονα, ο ίδιος ενεργοποιείται σε καταστάσεις στρες, όπως κατά την σωματική άσκηση, τον τραυματισμό ιστών, την ανοσολογική απόκριση αλλά και σε καταστάσεις συναισθηματικού στρες (Cain et al., 2017).

Η ενεργοποίηση λοιπόν του HPA, ξεκινά με την διέγερση του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου από συγκεκριμένα σήματα, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της ορμόνης απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH). Η CRH με την σειρά της δρα στη πρόσθια υπόφυση και οδηγεί στη σύνθεση και έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Στη συνέχεια, η ACTH δρα στο φλοιό των επινεφριδίων, διεγείροντας την παραγωγή και την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η διέγερση αυτού του άξονα, ρυθμίζεται από έναν κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης. Ουσιαστικά, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν στον υποθάλαμο και την υπόφυση, έτσι ώστε να αναστείλουν την παραγωγή κι έκκριση των CRH και ACTH αντίστοιχα. Έτσι τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα παραμένουν σε ένα σχετικά σταθερό επίπεδο (Fadel et al., 2023).



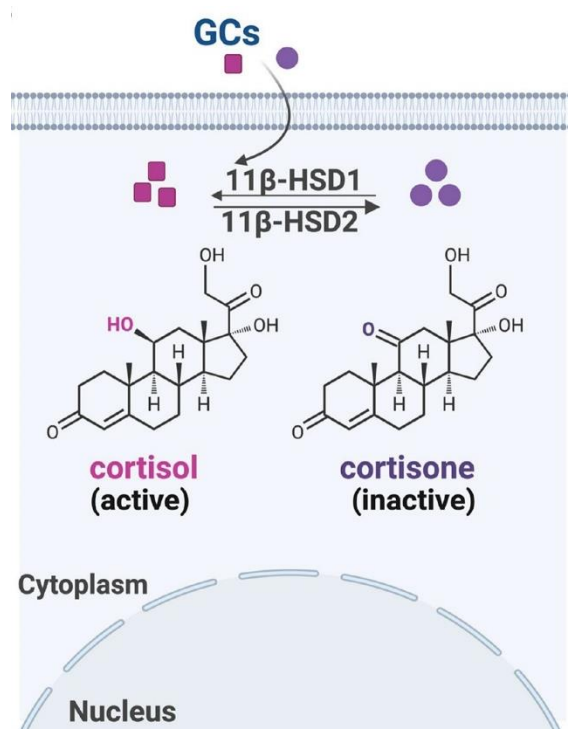
Εικόνα 2: Διακρίνεται η διέγερση του άξονα HPA ως απόκριση σε κατάλληλο σήμα. Αρχικά με την επίδραση κατάλληλου ερεθίσματος παράγεται η ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH) από τον παρακλιμακό πυρήνα του υποθαλάμου (PVN). Ακολούθως, η CRH δρα στην πρόσθια υπόφυση και διεγείρει την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH ασκεί τον ρόλο της στον φλοιό των επινεφριδίων, επάγοντας την παραγωγή κι έκκριση γλυκοκορτικοειδών ορμονών (GCs). Η όλη διαδικασία ρυθμίζεται από έναν κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης. CeA: κεντρικός πυρήνας της αμυγδαλής, VH: κοιλιακός ιππόκαμπος (Fadel et al., 2023).

1.4.3 Ρύθμιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών σε τοπικό επίπεδο

Η βιοδιαθεσιμότητα και η δράση των γλυκοκορτικοειδών σε τοπικό επίπεδο ρυθμίζεται από την λειτουργία ενδοκυτταρικών ενζύμων, καθώς κι από εξωκυτταρικές δεσμευτικές πρωτεΐνες. Η σφαιρίνη που δεσμεύει τα κορτικοστεροειδή (CBG) είναι υπεύθυνη για την μεταφορά και την κατανομή των GCs στους διάφορους ιστούς. Παράλληλα όμως, ρυθμίζει τα επίπεδα αυτών που είναι «ελεύθερα» και συνεπώς ενεργά για να ασκήσουν την δράση τους. Κι αυτό γιατί μόνο τα αδέσμευτα GCs μπορούν να διαπεράσουν την πλάσματική μεμβράνη και να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα (Oakley & Cidlowski, 2013).

Στο εσωτερικό των κυττάρων δύο ένζυμα είναι υπεύθυνα για την αλληλομετατροπή μεταξύ της ενεργής κορτιζόλης και της μη ενεργής κορτιζόνης. Η αφυδρογονάση 1 των 11β-υδροξυστεροειδών (11β-HSD1) μετατρέπει τις μη ενεργές μορφές των GCs σε ενεργές, ενώ η αφυδρογονάση 2 των 11β-

υδροξυστεροειδών (11β-HSD2), είναι υπεύθυνη για την κατάλυση της αντίστροφης διαδικασίας. Η αναλογία αυτών των δύο ενζύμων, μπορεί να είναι εξαρτημένη από τον κάθε ιστό και σε κάποιες περιπτώσεις επηρεασμένη από συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (Chapman et al., 2013).



Εικόνα 3: Αλληλομετατροπή μεταξύ της ενεργής κορτιζόλης και της μη ενεργής κορτιζόνης. Η αφυδρογονάση 1 των 11β-υδροξυστεροειδών (11β-HSD1) είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της κορτιζόνης σε κορτιζόλη. Η αφυδρογονάση 2 των 11β-υδροξυστεροειδών (11β-HSD2) καταλύει την αντίστροφη διαδικασία (Fadel et al., 2023).

1.4.4 Φυσιολογικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών σε διαφορετικούς ιστούς

Τα GCs έχουν ποικίλους ρόλους ανάλογα με τον ιστό στον οποίο επιδρούν. Αρχικά, στο ήπαρ έχουν την δυνατότητα να προάγουν την σύνθεση του γλυκογόνου και την γλυκονεογένεση, ενώ στους μυς παρεμποδίζουν την πρόσληψη γλυκόζης (αναστέλλοντας την σηματοδότηση μέσω ινσουλίνης). Επιδρούν δηλαδή με αυτό τον τρόπο στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Στον λιπώδη ιστό από την άλλη, διεγείρουν την λιπόλυση και παράλληλα συμβάλλουν στην διαφοροποίηση και την δημιουργία νέων λιποκυττάρων. Όσο αναφορά τους σκελετικούς μυς και τα οστά, τα GCs συμβάλουν στον καταβολισμό των πρωτεϊνών, ώστε τα αμινοξέα που θα προκύψουν να είναι διαθέσιμα για τη χρήση τους σε οξειδωτικές οδούς. Ακόμη, η κορτιζόλη μπορεί και αλληλεπιδρά με το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης ρυθμίζοντας την ισορροπία αλάτων και νερού και συνεπώς τον όγκο και την πίεση του αίματος (Lockett et al., 2024). Ένας ακόμη ρόλος των γλυκοκορτικοειδών, αφορά στον σχηματισμό της μνήμης και στη γνωστική

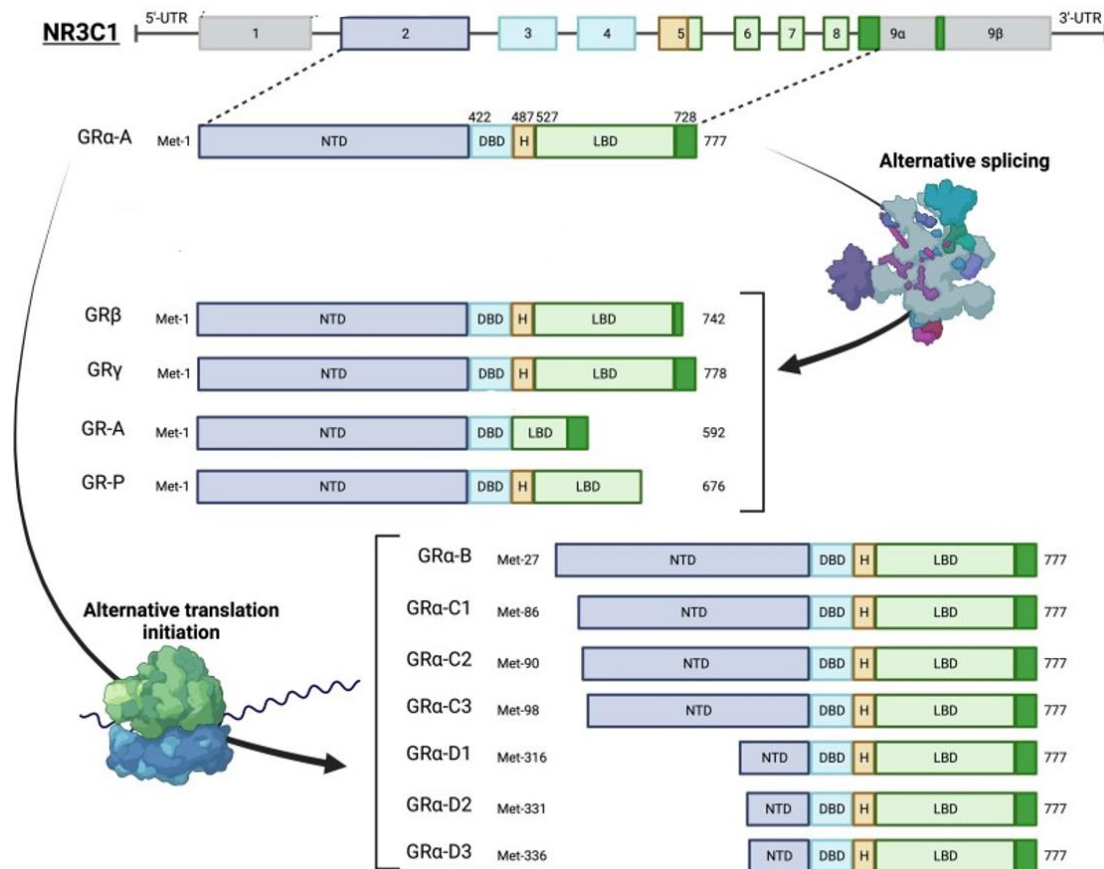
λειτουργία στον εγκέφαλο (Kadmiel et al., 2013). Όσο αναφορά το ανοσοποιητικό σύστημα τα GCs έχουν διπλό ρόλο, που αφορά την ενίσχυση της έμφυτης ανοσίας και τον έλεγχο των επιπέδων φλεγμονής. Αυτές είναι μόνο κάποιες από τις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στον οργανισμό και υποδεικνύουν την σημασία και την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει αυτή την σηματοδότηση. Απορρύθμιση αυτής κι έκθεση των ιστών σε υψηλά επίπεδα GCs οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις, όπως υπεργλυκαιμία, οστεοπόρωση, ανοσοκαταστολή και νευρολογικές διαταραχές. Ακριβώς για αυτό τον λόγο, η θεραπευτική χρήση των γλυκοκορτικοειδών πρέπει να γίνεται με προσοχή (Lockett et al., 2024).

1.5 Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ορμονών (GR)

1.5.1 Γονίδιο GR και ισομορφές

Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (hGR) είναι το NR3C1. Το όνομα αυτού του γονιδίου, προέρχεται από το γεγονός πως ο υποδοχέας ανήκει στην υποοικογένεια 3 των πυρηνικών υποδοχέων, στην ομάδα C και αποτελεί το πρώτο μέλος της (nuclear receptor subfamily 3 group c member 1). Το συγκεκριμένο γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31.3) (Motavalli et al., 2021).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον hGR αποτελείται από 9 εξώνια. Το εξώνιο 1 σχηματίζει την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR) και τα εξώνια 2-9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (Kadmiel & Cidlowski, 2013). Διαφορετικά προϊόντα (ισομορφές) του ίδιου γονιδίου, μπορούν να προκύψουν από διαφορετικά σημεία έναρξης της μεταγραφής και λόγω εναλλακτικού ματίσματος. Η πιο κοινή μορφή GR είναι ο GRα-A, μία πρωτεΐνη 777 αμινοξέων που είναι υπεύθυνη για την επιτέλεση γενωμικών και μη γενωμικών λειτουργιών που διαμεσολοβούνται μετά από σύνδεση ή όχι γλυκοκορτικοειδών ορμονών. Η συγκεκριμένη ισομορφή προκύπτει από μάτισμα του εξωνίου 2 μέχρι το εξώνιο 8 κι από το τέλος του εξωνίου 8 σε ένα σημείο δότη στην αρχή του εξωνίου 9. Άλλες ισομορφές του γονιδίου, έχουν μελετηθεί σε κάποιο βαθμό, χωρίς όμως ο ρόλος τους ή η συχνότητα έκφρασής τους να έχουν διευκρινιστεί πλήρως, ενώ παράλληλα φαίνεται να σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις (Lockett et al., 2024). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον GR μπορεί να υποστεί επίσης μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση) που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασής του (επιγενετική ρύθμιση), τη δραστηριότητά του και την αντίσταση του υποδοχέα σε GCs που σχετίζεται με διάφορα είδη καρκίνου (Timmermans et al., 2019).



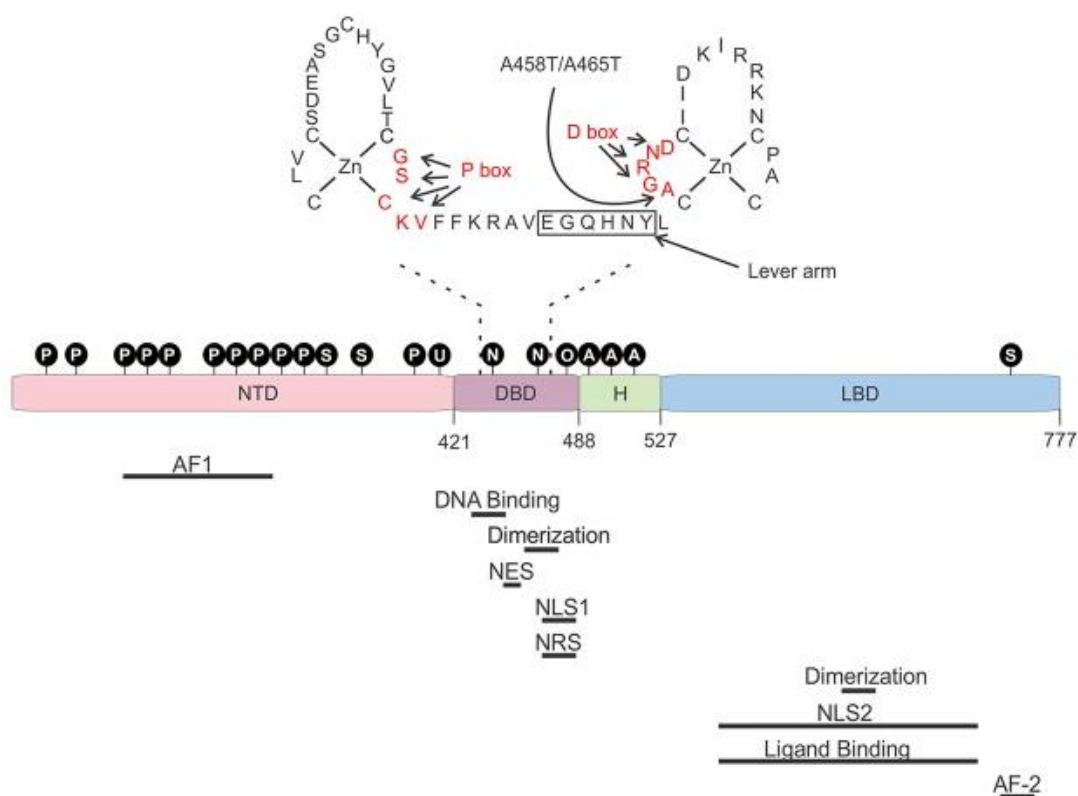
Εικόνα 4: Διαφορετικές ισομορφές του γονιδίου NR3C1 που προκύπτουν από διαφορετικά σημεία έναρξης της μεταγραφής και λόγω εναλλακτικού ματίσματος. 5' UTR: 5' αμετάφραστη περιοχή, 3' UTR: 3' αμετάφραστη περιοχή, NTD: αμινοτελική περιοχή, DBD: περιοχή πρόσδεσης στο DNA, H: περιοχή άρθρωσης, LBD: περιοχή σύνδεσης προσδέτη, Met: μεθειονίνη. Οι αριθμοί που αναγράφονται, αναφέρονται στα αμινοξέα της πρωτεΐνης (Lockett et al., 2024).

1.5.2 Δομή GR

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ορμονών, είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις κύριες επικράτειες κι έχει ανάλογη δομή με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς. Αυτές οι επικράτειες αφορούν την αμινοτελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal-transactivation domain, NTD), την περιοχή με την οποία ο υποδοχέας έχει την δυνατότητα να προσδένεται στο DNA (central DNA-binding domain, DBD), και την καρβοξυτελική περιοχή στην οποία συνδέονται οι προσδέτες (C-terminal ligand-binding domain, LBD). Οι επικράτειες LBD και DBD διαχωρίζονται μεταξύ τους, μέσω μίας περιοχής άρθρωσης, που ονομάζεται hinge region (Oakley & Cidlowski, 2013).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η επικράτεια NTD περιλαμβάνει μία περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-1) που είναι απαραίτητη για την

αλληλεπίδραση του GR με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, την συγκρότηση της μεταγραφικής μηχανής και την αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Αντίστοιχα, η LBD περιλαμβάνει επίσης μία περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, την AF-2. Οι επικράτειες DBD και LBD, περιλαμβάνουν μία περιοχή πυρηνικού εντοπισμού η κάθε μία (NLS1, NLS2 αντίστοιχα) που είναι απαραίτητες για την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Ανάμεσα στις προαναφερθείσες επικράτειες, η DBD παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά συντήρησης μεταξύ της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Αυτή η περιοχή σχηματίζει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, τα οποία συνδέονται στα γονίδια στόχους. Το δεύτερο από τα δύο μοτίβα περιλαμβάνει μία αλληλουχία 5 αμινοξέων (D-box) που είναι απαραίτητη για τον διμερισμό του υποδοχέα (Timmermans et al., 2019). Το πρώτο μοτίβο από την άλλη, περιλαμβάνει μία αλληλουχία (P-box) που συμβάλλει στην εξειδικευμένη πρόσδεση του GR στο DNA. Ανάμεσα στα δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, υπάρχει ένα σήμα (μία αλληλουχία αμινοξέων) που προωθεί την έξοδο του υποδοχέα από τον πυρήνα (nuclear export signal, NRS) (Lockett et al., 2024).

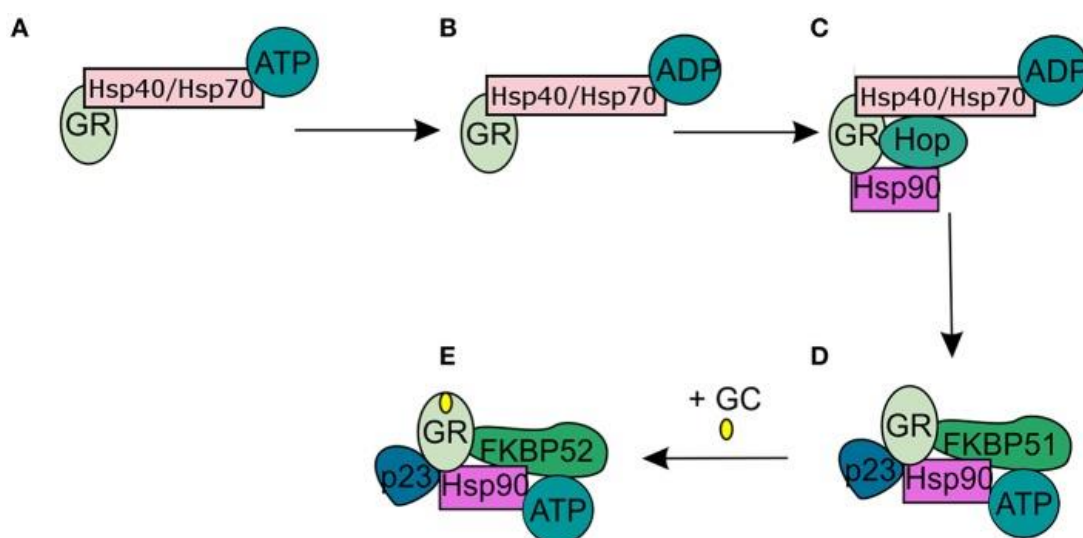


Εικόνα 5: Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών, που αποτελείται από την αμινοτελική περιοχή (NTD), την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), την περιοχή σύνδεσης των προσδετών (LBD) και μία περιοχή άρθρωσης (H). Έμφαση δίνεται στην αλληλουχία σχηματισμού της DBD. Στην εικόνα επιπλέον απεικονίζονται οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις: φωσφορυλίωση (P), σουμυλίωση (S), ουβικιτινίλωση (U), νιτροζιλίωση (N), οξειδωση (O), ακετυλίωση (A). Στο κάτω μέρος της εικόνας διακρίνονται σημαντικές περιοχές (επικράτειες) του υποδοχέα. Ανάμεσα σε αυτές, είναι οι περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-1, AF-2),

σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS1, NLS2), σήμα εξόδου της πρωτεΐνης από τον πυρήνα (NES) και σήμα παραμονής στον πυρήνα (NRS) (Timmermans et al., 2019).

1.5.3 Προσδετοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του GR

Απουσία προσδέτη ο GR βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο με μία σειρά πρωτεϊνών. Τα μόρια που σχηματίζουν αυτό το σύμπλοκο, εξαρτώνται από την κατάσταση που βρίσκεται ο GR (ωρίμανση, ενεργοποίηση). Για αρχή αφού ολοκληρωθεί η μετάφραση του, δεσμεύεται με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp40 και Hsp70 που συμβάλλουν στην αναδίπλωσή του. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη Hop καταλύει την αντικατάσταση των Hsp40/Hsp70 με Hsp90. Ακολούθως, στο σύμπλοκο στρατολογούνται η πρωτεΐνη chaperon p23 και η ανοσοφιλίνη FKBP51. Με την σύνδεση προσδέτη (γλυκοκορτικοειδή), ο υποδοχέας υφίσταται αλλαγή της διαμόρφωσής του, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση της FKBP51 με την FKBP52 στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Αυτή η αντικατάσταση, οδηγεί στην έκθεση σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLS1, NLS2) του υποδοχέα. Ακολούθως, νουκλεοπορίνες και ιμπορτίνες που αναγνωρίζουν τα NLSs, κατευθύνουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Ενώ, παλαιότερα πιστευόταν πως η μετατόπιση του GR επιτυγχάνονταν με την αποδιάταξη του από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν πως η διατήρηση του συμπλόκου είναι απαραίτητη για αυτήν την μετακίνηση (Timmermans et al., 2019).



Εικόνα 6: Σχηματισμός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) ανάλογα με την κατάσταση του στο κυτταρόπλασμα. Α) Μετά την μετάφραση του ο GR συνδέεται με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp40 και Hsp70 Β) ADP-εξαρτώμενη αλλαγή στη διαμόρφωση

της Hsp70 συμβάλλει στη στρατολόγηση της Hsp C) Η Hsp συμβάλλει στη στρατολόγηση της Hsp90 D) Απελευθέρωση Hsp40/Hsp70 από το σύμπλοκο και στρατολόγηση FKBP51, p23 E) Σύνδεση γλυκοκορτικοειδών (GCs) και αντικατάσταση FKBP51 με FKBP52 στο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο (Timmermans et al., 2019).

1.5.4 Μη προσδετοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του GR

Μελέτες έχουν αναδείξει πως η ενεργοποίηση του GR σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να πραγματοποιηθεί ανεξαρτήτως της σύνδεσης προσδέτη. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες όπως το αυξημένο pH, το θερμικό σοκ, το μηχανικό στρες, έχει παρατηρηθεί η δυνατότητα μετατόπισης του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων, ανεξαρτήτως της σύνδεσης των γλυκοκορτικοειδών (Ji et al., 2003), (Sanchez, 1992). Επιπλέον, μία μελέτη υποδεικνύει την επαγόμενη από TNF-α ενεργοποίηση μονοπατιών GR, με αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα IL-6 και IL-8 (Verhoog et al., 2011). Βέβαια, οι μηχανισμοί που ευθύνονται για αυτή την ανεξαρτήτως σύνδεσης προσδέτη ενεργοποίηση του GR, δεν έχουν αποσαφηνιστεί σε μεγάλο βαθμό. Κάποιες μελέτες, υποστηρίζουν πως η φωσφορυλίωση της Ser σε συγκεκριμένα κατάλοιπα (Ser-211, Ser-134) θα μπορούσε να επάγει τέτοιου είδους ενεργοποίηση (Matthews et al., 2011), (Galliher-Beckley et al., 2011). Πάντως, η μη προσδετοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του GR, μπορεί να επιτρέψει την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με έναν δυναμικό τρόπο, που είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα των GCs στον οργανισμό κι συμβάλλει στην διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και την προσαρμογή στο στρες.

1.5.5 Γενωμικές δράσεις του GR

Με την μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, ο υποδοχέας συνδέεται σε εξειδικευμένες αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) στα γονίδια στόχους, προκαλώντας την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής τους. Στα γονίδια στόχους, ο υποδοχέας δρα κατά κύριο λόγο ως διμερές αλλά μπορεί να δράσει και ως μονομερές. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί πως ο υποδοχέας μπορεί να ασκήσει την δράση του και ως τετραμερές με σκοπό να ρυθμίσει την μεταγραφή των γονιδίων, ωστόσο ο μηχανισμός αυτός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

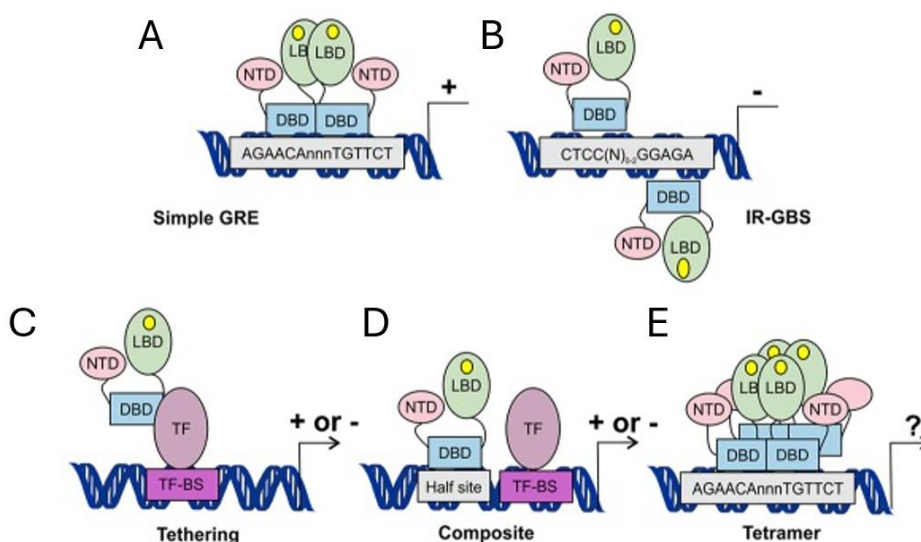
Με την σύνδεση του υποδοχέα στα γονίδια στόχους, επάγεται η στρατολόγηση συμπαραγόντων (co-regulators) της μεταγραφής, που μπορεί να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων μέσω τροποποίησης της δομής της χρωματίνης. Η αλληλουχία GRE είναι αυτή που θα καθορίσει την στρατολόγηση ενεργοποιητών (coactivators) ή καταστολέων (corepressors) της

μεταγραφής. Την ενεργοποίηση της μεταγραφής, φαίνεται να επάγουν αλληλουχίες που έχουν την μορφή AGAACA_{nnn}TGTTCT, ενώ την καταστολή της αλληλουχίες με την μορφή CTCC(N)₀₋₂GGAGA, που ονομάζονται αρνητικά GREs (nGREs).

Ένας άλλος τρόπος που ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ορμονών μπορεί να ασκήσει την δράση του, είναι με την απευθείας σύνδεση του με μεταγραφικούς παράγοντες. Ουσιαστικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι εκείνοι που συνδέονται στα γονίδια στόχους και μάλιστα σε περιοχές των γονιδίων που δεν περιλαμβάνουν GREs. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν μέλη των οικογενειών AP1, STAT, NF-κB και η σύνδεσή τους με τον GR, οδηγεί στην ενεργοποίηση ή την καταστολή γονιδίων.

Παράλληλα, ο GR έχει την δυνατότητα να συνδέεται ως μονομερές σε περιοχές των γονιδίων που περιλαμβάνουν το μισό τμήμα των GREs, δηλαδή την αλληλουχία AGACA (ή την συμπληρωματική της TGTGT). Αυτό το μονομερές, μπορεί να συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται σε κοντινή περιοχή συνδεόμενοι στο DNA και η αλληλεπίδρασή τους επάγει την ενεργοποίηση ή την καταστολή των γονιδίων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως σύμφωνα με μελέτες, η σύνδεση του GR ως μονομερές σε συγκεκριμένα γονίδια είναι πιο συχνή (από την πρόσδεσή του ως διμερές) όταν τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών είναι ιδιαίτερα χαμηλά.

Από όλα τα παραπάνω καταλαβαίνουμε, πως υπάρχει μία πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει την ρύθμιση του GR και τις γενωμικές του δράσεις (Timmermans et al., 2019).



Εικόνα 7: Γενωμικοί μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (GR). Α) Ο GR συνδέεται ως διμερές σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) στα γονίδια

στόχους και επάγει την ενεργοποίηση των γονιδίων B) Ο GR συνδέεται σε αρνητικά GREs (nGREs) και επάγει την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης C) Ο GR μπορεί να ασκήσει την δράση του αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες (TFs) που συνδέονται με τα γονίδια στόχους D) Ο GR μπορεί να ασκήσει τη δράση του συνδεόμενος ως μονομερές σε μισό τμήμα των GREs E) Έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός τετραμερούς GR (Timmermans et al., 2019).

1.5.6 Μη γενωμικές δράσεις του GR

Τα γλυκοκορτικοειδή ενέχουν κι έμμεσες (μη γενωμικές) δράσεις που είναι ανεξάρτητες από την μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων. Αυτές οι δράσεις, φαίνεται να έχουν πιο «γρήγορα» αποτελέσματα, που γίνονται ορατά στον οργανισμό μεταξύ δευτερολέπτων με λεπτών. Η επιτέλεση τέτοιων δράσεων, μπορεί να επαχθεί μέσω μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με τη πλασματική μεμβράνη ή μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών. Έτσι, τα GCs μπορούν και ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του Ca^{2+} , την λειτουργία σκελετικών και λείων μυών, επάγουν την σύνθεση δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), ενώ παράλληλα συμμετέχουν σε αποπτωτικά και φλεγμονώδη μονοπάτια (Panettieri et al., 2018).

Στις μη γενωμικές δράσεις που επάγονται από τον GR, εμπλέκεται η ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών, όπως των PI3K/Akt και MAPK. Αυτή η ενεργοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί, μέσω της κινάσης τυροσίνης c-Src που απουσία γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή σε σύμπλοκο με τον GR και άλλες πρωτεΐνες. Παρουσία γλυκοκορτικοειδών το σύμπλοκο αποδιατάσσεται, η c-Src απελευθερώνεται και είναι πλέον ελεύθερη να ενεργοποιήσει τις προαναφερθείσες κινάσες μέσω φωσφορυλίωσης. Μελέτες έχουν δείξει πως αυτός ο μηχανισμός δράσης, εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση της ανεξίνης 1 (ANXA1) (Solito et al., 2003) και τη παραγωγή δραστικών μορφών αζώτου (Flaherty et al., 2017).

Ανάλογες δράσεις φαίνεται να επιτελούνται και από μία μορφή του GR που βρίσκεται προσδεδμεμένος στην πλασματική μεμβράνη (membrane-bound GR, mGR). Οι ερευνητές παρατήρησαν πως ο mGR, έχει την δυνατότητα να βρίσκεται σε λιπιδιακές σχεδίες της πλασματικής μεμβράνης (που ονομάζονται caveolae), συνδεόμενος με την πρωτεΐνη caveolin-1. Πειράματα χορήγησης δεξαμεθαζόνης σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα (A549) έδειξαν την φωσφορυλίωση της caveolin-1 και των κινασών PI3K/Akt με τρόπο που εξαρτάται από την κινάση c-Src (Matthews et al., 2008). Επιπλέον, μελέτες υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του mGR και άλλων μεμβρανικών υποδοχέων, όπως των GPCRs (Y. Zhang et al., 2012).

Παράλληλα, περιορισμένη έρευνα έχει πραγματοποιηθεί στην μη γενωμική και άμεση ενεργοποίηση καναλιών ιόντων μέσω των GCs. Μία μελέτη υποστηρίζει

την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} μέσω ενεργοποίησης των υποδοχέων P2X σε κύτταρα SGNs ύστερα από χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Το εάν σε αυτή την ενεργοποίηση εμπλέκεται η ύπαρξη ενός mGR χρειάζεται να διερευνηθεί περαιτέρω (Yukawa et al., 2005).

1.6 Ρόλος του GR στα μιτοχόνδρια

Σε μελέτες οι οποίες είχαν πραγματοποιηθεί, βρέθηκαν μιτοχονδριακές γενωμικές αλληλουχίες, οι οποίες παρουσίαζαν ομολογία με τις αλληλουχίες GREs των γονιδίων του πυρήνα (mtGREs). Έτσι, υπήρχε η υπόνοια πως ο GR ασκεί την δράση του και σε μιτοχονδριακό επίπεδο (Sekeris, 1990). Μάλιστα, μελέτη έδειξε την επαγόμενη από DEX σύνδεση του GR στη περιοχή του D-βρόχου και την επακόλουθη μιτοχονδριακή ενεργοποίηση μιτοχονδριακών γονιδίων και των μιτοχονδριακών 12S και 16S RNA. Έτσι φαίνεται πως όντως ο GR, ασκεί τη δράση του με άμεσο τρόπο και στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, εμπλέκεται στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και με έμμεσο τρόπο, επάγοντας πυρηνικά γονίδια που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες (TFAM, TFB1M, TFB2M) (Psarra & Sekeris, 2011). Ακόμη, μελέτες υποδεικνύουν την άσκηση του ρόλου του GR σε μιτοχονδριακό επίπεδο και μέσω μη γενωμικών μηχανισμών (Lee et al., 2013).

Η μετατόπιση του GR στα μιτοχόνδρια για την άσκηση του ρόλου του προτείνεται πως επάγεται μέσω ενός κρυπτικού σήματος μιτοχονδριακού εντοπισμού. Το σήμα αυτό αποκαλύπτεται με την αποκοπή του αμινοτελικού άκρου του GR από μία πρωτεάση σερίνης (Boopathi et al., 2008). Παράλληλα, μελέτη υποστηρίζει την πιθανή παρουσία συγκεκριμένης ισομορφής του GR στα μιτοχόνδρια ανεξάρτητα από την σύνδεση προσδέτη για την άσκηση του ρόλου της (Morgan et al., 2016).

Ο σημαντικότερος ρόλος του GR στα μιτοχόνδρια, φαίνεται να είναι η ρύθμιση των επιπέδων ενέργειας σε αυτά, μέσω της ενεργοποίησης γονιδίων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS genes) (Psarra & Sekeris, 2011). Άλλες δράσεις του αφορούν την ρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Talabér et al., 2009), (Prenek et al., 2017), του οξειδωτικού στρες καθώς και των ανοσολογικών αποκρίσεων (Psarra et al., 2009). Το αποτέλεσμα βέβαια της δράσης του GR, εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης στα γλυκοκορτικοειδή, καθώς και από τα επίπεδά τους. Πιο συγκεκριμένα, η μικρή χρονική έκθεση σχετίζεται αυξημένη μιτοχονδριακή βιογένεση και αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας. Αντιθέτως η έκθεση για μεγάλο χρονικό διάστημα σε GCs έχει ως αποτέλεσμα δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, μειωμένη παραγωγή ATP, αυξημένη παραγωγή ROS,

ανωμαλία της δομής των μιτοχονδρίων και απορρύθμιση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Kokkinopoulou & Moutsatsou, 2021). Επίσης, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η μιτοχονδριακή εντόπιση του GR σχετίζεται και με τη καρκινογένεση (Karra et al., 2023), (Karra et al., 2022).

1.7 GR και νευρική διαφοροποίηση

Μελέτες έχουν υποδείξει την συμμετοχή του GR στη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος. Σε μία έρευνα η χορήγηση δεξαμεθαζόνης σε κύτταρα νευροβλαστώματος (N-τύπου), οδήγησε στην διαφοροποίησή τους προς νευροενδοκρινικά κύτταρα, όπως φάνηκε από την μορφολογία τους και την εμφάνιση νευρονικών δεικτών (CgA, TH) (Ross et al., 2002). Επίσης, μία άλλη μελέτη εξετάζει τον ρόλο κάποιων πυρηνικών υποδοχέων στη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος, ως μία θεραπευτική προσέγγιση. Ανάμεσα στους υποδοχείς που εξετάστηκαν ήταν κι ο GR που όντως φάνηκε να συμμετέχει στην επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης και την μείωση της ογκογένεσης (κυρίως με την υπερέκφραση του) (Sainero-Alcolado et al., 2022). Βέβαια, έρευνα η οποία έχει πραγματοποιηθεί αυτή τη φορά σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hiPSCs), έχει υποδείξει την ανασταλτική δράση του GR στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Φαίνεται δηλαδή, πως η δράση του GR στην επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης είναι πολύπλοκη κι εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως τα επίπεδα των GCs, τον κυτταρικό τύπο και το γενικότερο πλαίσιο που επικρατεί (Nürnberg et al., 2018).

1.8 Σκοπός

Όπως έχει αναφερθεί, ο ρόλος του GR στην επαγωγή της νευρικής διαφοροποίησης είναι αμφιλεγόμενος. Βέβαια, οι ερευνητές έχουν πραγματοποιήσει πειράματα που υποδεικνύουν την συμμετοχή του υποδοχέα στην διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος και αυτή η λειτουργία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς που αντιμετωπίζουν ασθένειες νευρολογικής φύσης. Ως στόχος της ερευνητικής μας ομάδας τέθηκε, η μελέτη για την πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ή/και τα μιτοχόνδρια, κατά τα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y. Επιπλέον, μελετήθηκε η πιθανή μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ίδιων κυττάρων, παρουσία και απουσία των στεροειδών ορμονών, δεξαμεθαζόνη

(DEX), 17β-οιστραδιόλη (E2) και διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN). Στα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της ανοσοκυτταροχημείας και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αντίστοιχα. Η παραπάνω μελέτη, θα συμβάλει στην αποσαφήνιση της πιθανής συμμετοχής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) στη διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y, ώστε να αποτελέσει εν δυνάμει φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπιση διαταραχών που σχετίζονται με το νευροβλάστωμα του ανθρώπινου οργανισμού.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Όργανα

- ✚ Υδατόλουτρο (P-selecta)
- ✚ Laminar Flow Hood (Tel Star AV-30/70)
- ✚ Επωαστήρας (New Brunswick Galaxy 170S)
- ✚ Ανάστροφο μικροσκόπιο (A. Kruss Optronic Germany)
- ✚ Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)
- ✚ Quick spin (Nippon Genetics Europe GmbH)
- ✚ Vortex (Bio Vortex V1)
- ✚ Heat block (Kisker)
- ✚ Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS TM
- ✚ Φυγόκεντρος (Helme Z36HK)
- ✚ Sonicator (Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S)
- ✚ Πιπέτες - Air displacement pipettes, όγκου 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl
- ✚ Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad mini-PROTEAN® tetra cell)
- ✚ Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Transfer) (Biorad mini-trans Blot)
- ✚ Συνεστιακό Μικροσκόπιο (Zeiss)
- ✚ Ζυγός (Kern 440-47N)

2.2 Υλικά

2.2.1 Αναλώσιμα

- ✚ Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια 25 cm² και 75 cm² (Sarstedt)
- ✚ Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας των 6 θέσεων (6-well plates) (Sarstedt)
- ✚ Τετράγωνες καλυπτίδρες (Sigma)
- ✚ Αντικειμενοφόροι πλάκες (Sigma)
- ✚ Σιφώνια των 2 ml, 5 ml, 10 ml (Sarstedt)
- ✚ Βαθμονομημένοι σωλήνες (falcon) των 15 ml και 50 ml (Sarstedt)
- ✚ Ρύγχοι-tips μέγιστου όγκου 2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Sarstedt)
- ✚ Σωληνάκια eppendorf των 1,5 ml (Sarstedt)
- ✚ Διηθητικά χαρτιά (Whatman) (Sigma)
- ✚ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,25 µm (Amersham™ Protran™)
- ✚ Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος χημειοφωταύγειας (Fuji Medical)

2.2.2 Χημικά

Ουσία	Εταιρία	Ουσία	Εταιρία
Μεθανόλη	Sigma	DTT	Sigma
Ακετόνη	Sigma	PMSF	Serva
Glycine	Serva	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Sigma
L-glutamine	Invitrogen	Bradford protein assay	Biorad
FBS	Gibco	Glycerol	Applichem
P/S	Gibco	Paregular TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific Fermentas
Lysis Buffer 5x	Promega	B-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën
SDS	Sigma	Κυανούν της βρομοφαινόλης	Research Organics
Triton X-100	Applichem	Ισοπροπανόλη	Sigma
Tris	Serva	Tween 20	Sigma
EDTA	Serva	APS	Sigma
NaCl	Panreac	Acrylamide/Bis acrylamide 40%	Bio-Rad
Glycine	Serva	TEMED	Applickem
Na ₂ HPO ₄	Merck	Developer	Fujifilm
NaH ₂ PO ₄	Merck	Fixer	Fujifilm
NaOH	Merck	ECL A	Santa Cruz
HCl	Merck	ECL B	Santa Cruz
Skimmed milk powder	Regilait		

Πίνακας 1: Στην πρώτη και την τρίτη στήλη αναγράφονται τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, ενώ στην δεύτερη και την τέταρτη στήλη οι εταιρείες από όπου προμηθεύτηκαν.

2.2.3 Διαλύματα

Διάλυμα	Σύσταση
Lysis Buffer	20 mM Tris (pH 7.5), 0,5% v/v Triton X-100, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA
Διάλυμα Bradford	Αραίωση του διαλύματος ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1x (αρχική συγκέντρωση stock 5x)
PMSF 200mM	Αραίωση 10% w/v και παρασκευή aliquots των 200 μl. Αποθήκευση στους -

	20° C
DTT 1M	1,54 g DTT 1M σε ddH ₂ O με τελικό όγκο 10ml. Δημιουργία aliquots των 1 ml. Αποθήκευση σε -20° C
Sample buffer 4x	1 M Tris (pH 6.8), 10% v/v γλυκερόλη, 10% w/v SDS, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% v/v κυανούν της βρομοφαινόλης. Φύλαξη στους -20° C
Tris 20mM (pH 7.5)	Αραίωση stock διαλύματος Tris 1M (pH 7 που είναι αποθηκευμένο στους 4° C σε ddH ₂ O. Διατήρηση σε RT
Tris-HCl 1.5M (pH 8,8)	Διάλυση απαραίτητης ποσότητας Tris σε dH ₂ O. Ρύθμιση του pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 M. Φύλαξη στους 4° C
Temed	Δεν χρειάζεται αραίωση. Αποθήκευση σε 4° C
APS	10 % w/v και χρήση ως διαλύτη ddH ₂ O. Αποθήκευση στους -20° C
Running Buffer 10x	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 w/v SDS, διαλυμένα σε ddH ₂ O. Αποθήκευση σε RT
Running Buffer 1x	Συγκέντρωση διαλύματος 10% v/v χρησιμοποιώντας Running Buffer 10x σε διαλύτη dH ₂ O. Προσθήκη SDS σε αναλογία 0,1% w/v. Αποθήκευση σε RT
Transfer Buffer 10x	10% v/v Running Buffer 10x, 20% v/v MeOH, 0,05% w/v SDS. Συμπλήρωση όγκου με dH ₂ O και αποθήκευση στους 4° C
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x	91 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ , 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε RT
Ρυθμιστικό διάλυμα PBST 1x	Αραίωση του stock PBS 10x σε ddH ₂ O και προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1% v/v. Αποθήκευση σε RT
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10x	0,2 M Tris, 1,5 M NaCl. Ρύθμιση του pH με πυκνό HCl στο 7,2-7,4. Διατήρηση σε RT
TBST 1x	Αραίωση του TBS 10x σε διαλύτη dH ₂ O. Προσθήκη στο διάλυμα 0,07% v/v Tween-20 και διατήρηση σε RT
Διαλύματα εμφάνισης σήματος	Χρησιμοποιούνται τα εμπορικά σκευάσματα ανάπτυξης σήματος: Developer solution (Fujifilm) και Fixer solution (Fujifilm) που διαλύονται σε dH ₂ O

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

2.2.4 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

- DMEM low glucose 1 g/L with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate
- DMEM low glucose 1 g/L without phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate

Η παραγωγή του πλήρους θρεπτικού υλικού, απαιτεί την επιπλέον προσθήκη 10% v/v FBS (Fetal Bovin Serum), 1% v/v L-γλουταμίνη, 1% v/v P/S (μείγμα αντιβιοτικών: πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη).

2.2.5 Αντισώματα

- Αντίσωμα έναντι του GR, G-5 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα που είναι συζευγμένο με την χρωστική Alexa fluor 488 (Thermo Fisher Scientific)
- Αντίσωμα έναντι του Tuj-1 (Abcam)
- Αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης (Sigma)
- Δευτερογενές αντίσωμα, mouse IgG-HRP (Pierce Antibodies)

2.2.6 Χρωστικές

- Χρωστική MitoTracker Red CMX-Ros (Thermo Fisher Scientific)
- Χρωστική Hoechst-33342 (Sigma)

2.3 Τεχνικές κυτταροκαλλιιεργειών

2.3.1 Θρυψινοποίηση

Η θρυψινοποίηση είναι μια διαδικασία, η οποία χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων που προηγουμένως είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια (πχ μιας φλάσκας) κατά την καλλιέργεια τους. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι σημαντική καθώς επιτρέπει τη δημιουργία εναιωρήματος κυττάρων που μπορεί να μεταφερθεί σε μία νέα φλάσκα για επανακαλλιέργεια όταν η προηγούμενη φλάσκα έχει υποστεί ένα ποσοστό κορεσμού περίπου στο 80% ή όταν απαιτείται η συλλογή των κυττάρων με το πέρας μιας συγκεκριμένης διαδικασίας για ανάλυση. Κάθε φορά που πραγματοποιείται η διαδικασία της θρυψινοποίησης αντιστοιχεί σε ένα γήρας (passage) για τα κύτταρα.

Ουσιαστικά, η θρυψίνη αποτελεί μέλος της οικογένειας πρωτεασών σερίνης, δηλαδή είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που έχει τη δυνατότητα να διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο λυσίνης ή αργινίνης των

πρωτεϊνών που συγκρατούν τα κύτταρα προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Έτσι, η συγκεκριμένη διαδικασία βοηθά στην αποκόλληση των κυττάρων με μη βίαιο τρόπο.

Αρχικά, το διάλυμα θρυψίνης θερμαίνεται στους 37° C σε υδατόλουτρο και αφαιρείται από τη φλάσκα το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρυψίνης, που αντιστοιχεί σε 1 ml για τη φλάσκα T-25 και σε 2 ml για τη φλάσκα T-75. Ακολούθως η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 2-5 λεπτά, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Με το πέρας αυτών η φλάσκα μεταφέρεται στο μικροσκόπιο και παρατηρείται η μορφολογία των κυττάρων, η οποία πρέπει να είναι διαφορετική από ότι αυτή της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα πρέπει να έχουν αποκτήσει κυκλική μορφή και να αιωρούνται.

Μόλις τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από την φλάσκα στον επιθυμητό βαθμό, πρέπει να προκληθεί η διακοπή της διαδικασίας της θρυψινοποίησης. Έτσι, προστίθεται στη φλάσκα τετραπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού από την ποσότητα θρυψίνης που είχε προστεθεί προηγουμένως. Στη συνέχεια, η συνολική ποσότητα της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15 ml και τα κύτταρα υπόκεινται στην εκάστοτε επιθυμητή διεργασία.

2.3.2 Καταμέτρηση κυττάρων

Με το πέρας της διαδικασίας της θρυψινοποίησης, μικρή ποσότητα διαλυτοποιημένων κυττάρων μεταφέρεται σε erpendorf, για τη χρήση εκτός του hood. Από το erpendorf συλλέγονται με πιπέτα 10 μl και τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο για να υπολογιστεί με τη βοήθεια μικροσκοπίου η ποσότητα των κυττάρων που περιέχονται σε αυτά. Ακολούθως, μπορεί να υπολογιστεί προσεγγιστικά ο αριθμός των κυττάρων που περιέχεται σε 1 ml εναιωρήματος. Έτσι, ανάλογα με την ποσότητα των κυττάρων που θέλουμε να επιστρώσουμε συλλέγονται συγκεκριμένα ml από το falcon και μεταφέρονται σε νέο, τα οποία συμπληρώνονται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού. Η ποσότητα των κυττάρων που δεν χρησιμοποιήθηκε και παρέμεινε στο αρχικό falcon, μπορεί να μεταφερθεί σε νέα φλάσκα για επανακαλλιέργεια.

2.3.3 Καλλιέργεια διαφοροποιημένων κυττάρων

Σε κάθε πηγαδάκι του 6-well, επιστρώνονται 250.000 c/w (όταν χρησιμοποιείται η τεχνική του Western blot) ή 80.000 c/w (για την μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας) σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με phenol red, low glucose και 10% v/v FBS. Την μέρα διαφοροποίησης 0, αφαιρείται το θρεπτικό

μέσο καλλιέργειας και στη συνέχεια προστίθεται το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (1) που περιλαμβάνει phenol red, low glucose, 1% v/v FBS και 10 μ M RA. Ύστερα από 48 ώρες (μέρα διαφοροποίησης 2), το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (1) αντικαθίσταται με το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (2) που είναι χωρίς phenol red, low glucose, 1% v/v FBS cis και 10 μ M RA. Την μέρα διαφοροποίησης 4 ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (2) και την μέρα διαφοροποίησης 6 συλλέγονται τα κύτταρα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για το πείραμα της ανοσοκυτταροχημείας, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά coverslip, που βρίσκονται στον πυθμένα των 6-well.

Η προσθήκη και η ποσότητα των ορμονών στα αντίστοιχα 6-well, εξαρτάται από την τεχνική που χρησιμοποιείται. Όσο αφορά το Western blot προστίθενται ορμόνες την 4 μέρα της διαφοροποίησης κατά την αλλαγή του θρεπτικού μέσου της διαφοροποίησης. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ορμονών που προστίθενται είναι 10^{-8} M για τη DEX, 10^{-9} M για την E2 και 10^{-8} M για το DPN. Όσον αφορά το πείραμα της ανοσοκυτταροχημείας, προστίθενται DEX την 6 μέρα της διαφοροποίησης κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας για 30-45 λεπτά πριν την συλλογή των κυττάρων, σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M.

2.3.4 Καλλιέργεια αδιαφοροποίητων κυττάρων

Όπως και προηγουμένως, επιστρώνονται 250.000 κύτταρα (για την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western) ή 80.000 κύτταρα (για τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας) για κάθε συνθήκη του 6-well, σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με phenol red, low glucose, 10% v/v FBS. Την μέρα 0 αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθενται θρεπτικό μέσο χωρίς phenol red, low glucose και με 10% v/v FBS cis. Μετά από 48 ώρες (μέρα 2) ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο χωρίς phenol red, low glucose, 10% v/v FBS cis. Την μέρα 6 όπως και προηγουμένως ανανεώνεται το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και συλλέγονται τα κύτταρα. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι συγκεντρώσεις και η στιγμή που προστίθενται οι αντίστοιχες ορμόνες εξαρτάται από την πειραματική διαδικασία που θα ακολουθήσουμε.

2.4 Συλλογή κυττάρων (Harvest)

Στο συγκεκριμένο στάδιο, πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων που προορίζονται για την διαδικασία του Western blot. Επειδή η κυτταρική σειρά SH-SY5Y είναι σχετικά ευαίσθητη, η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιείται σε πάγο, παρουσία απλώς του θρεπτικού υλικού και όχι παρουσία PBS 1x όπως θα γινόταν σε άλλη περίπτωση. Με την βοήθεια μιας ράβδου με πλαστική εύκαμπτη

επιφάνεια (scraper) τα κύτταρα συλλέγονται σε erppendorf και στη συνέχεια υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση σε 2000 RPM, στους 4° C. Πριν την φυγοκέντρηση των δειγμάτων, η φυγόκεντρος είχε υποβληθεί σε σύστημα fast cool στους 4° C ενώ ήταν κενή. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση των δειγμάτων, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80° C. Σε καμία περίπτωση δεν πραγματοποιείται η αποθήκευση των κυττάρων παρουσία θρεπτικού υλικού, καθώς θα υπήρχε το ενδεχόμενο λύσης τους και πρόκλησης κυτταρικού θανάτου.

2.5 Τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας

2.5.1 Χρώση μιτοχονδρίων

Για να πραγματοποιηθεί η χρώση των μιτοχονδρίων, χρησιμοποιείται η χρωστική CMX. Η συγκεκριμένη χρωστική εφαρμόζεται σε ζωντανά κύτταρα και προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 200 nM. Αυτή η προσθήκη πραγματοποιείται την 6 μέρα της καλλιέργειας (για διαφοροποιημένα ή μη κύτταρα), κατά την ανανέωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και μαζί με την παράλληλη προσθήκη της DEX, στη τελική συγκέντρωση που αναφέρθηκε προηγουμένως. Αφού τα κύτταρα επωαστούν για περίπου 30-40 λεπτά παρουσία χρωστικής (και ορμόνης DEX), αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί η μονιμοποίηση των καλυπτρίδων, στις οποίες έχουν καλλιεργηθεί τα διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα.

2.5.2 Μονιμοποίηση κυττάρων

Στο συγκεκριμένο στάδιο, χρησιμοποιούνται οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη 100% και ακετόνη 100%. Η μεθανόλη συμβάλλει στη διατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων και των δομικών χαρακτηριστικών τους, ενώ η ακετόνη διευκολύνει στην αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών (που είναι επιθυμητό για την διείσδυσή των απαραίτητων χρωστικών και αντισωμάτων). Αφού προηγουμένως έχει αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό από τα coverslip που είναι τοποθετημένα σε 6-well, προστίθεται σε κάθε συνθήκη μεθανόλη 100% που προηγουμένως βρισκόταν στους -20° C. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους -20° C, αφαίρεση της μεθανόλης και 2 πλύσεις με PBS 1x. Στη συνέχεια σε κάθε συνθήκη προστίθεται ακετόνη 100% και πραγματοποιείται επώαση για 1 λεπτό στους -20° C. Αφαιρείται η ακετόνη και πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με PBS 1x. Έπειτα θα ακολουθήσει η χρώση των πυρήνων και του GR.

2.5.3 Χρώση πυρήνων και GR

Αφού έχει πραγματοποιηθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων, σε αυτό το στάδιο η χρώση των πυρήνων και του υποδοχέα πραγματοποιείται ταυτόχρονα. Για την χρώση των πυρήνων χρησιμοποιείται η χρωστική Hoechst. Από την άλλη η ανοσοεντόπιση του GR πραγματοποιείται μέσω αντισωμάτων. Για αρχή, χρησιμοποιείται το πρωτογενές αντίσωμα G-5 που «ανιχνεύει» τον GR και στη συνέχεια ένα δευτερογενές που είναι συζευγμένο με τη χρωστική Alexa fluor 488 και στοχεύει στο πρωτογενές.

Πρώτα απ' όλα, τα coverslip αποκολλώνται από τα 6-well και τοποθετούνται σε μία επιφάνεια. Στη συνέχεια, επωάζονται για 1h σε RT με ένα διάλυμα που περιλαμβάνει το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR διαλυτοποιημένο σε PBST 1x σε τελική συγκέντρωση 1/50 v/v. Με το πέρας της 1 ώρας, για κάθε cover-slip πραγματοποιούνται 2 πλύσεις σε PBS 1x. Ακολούθως, παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιλαμβάνει, Hoechst σε τελική συγκέντρωση 1/500 v/v και δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς σε τελική συγκέντρωση 1/500 v/v, διαλυτοποιημένα σε PBST 1x. Με το συγκεκριμένο διάλυμα, επωάζεται κάθε coverslip για 1 ώρα στο σκοτάδι. Έπειτα, πραγματοποιούνται 2 πλύσεις σε PBS 1x και ακολουθεί η επικόλληση των coverslip με PVA σε αντικειμενοφόρους πλάκες (για 1h στο σκοτάδι). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι αποθηκεύονται στους 4° C και μπορούν πλέον να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε στιγμή για παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και Western Blot

2.6.1 Lysis-Sonication-Bradford

Η συγκεκριμένη διαδικασία, πραγματοποιείται με σκοπό να προκληθεί η λύση των κυττάρων και να εξαχθεί το κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει τις πρωτεΐνες που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Στη συνέχεια, μπορούμε να υπολογίσουμε και την συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών που περιέχεται σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα.

➤ Lysis

Αρχικά, τα erpendorf, που περιλαμβάνουν το κυτταρικό ίζημα, μεταφέρονται από τους -80° C σε πάγο και παρασκευάζεται το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί για την λύση των κυττάρων. Ουσιαστικά, σε 500 µl του διαλύματος Lysis Buffer προστίθενται DTT, PMSF και αναστολείς πρωτεασών σε τελικές συγκεντρώσεις 1% v/v, 0,2% v/v και 0,5% v/v αντίστοιχα. Η προσθήκη των τριών αυτών

συστατικών στο Lysis Buffer πραγματοποιείται λίγο πριν την χρησιμοποίηση του διαλύματος κι όχι νωρίτερα, διότι διαφορετικά θα έχαναν την δρασικότητά τους. Το DTT αναφέρεται στην διθειοθρεϊτόλη, μία ουσία που διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς και συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα υπόλοιπα δύο συστατικά αποτελούν αναστολείς πρωτεασών και χρησιμοποιούνται για την προστασία των πρωτεϊνών, όταν δημιουργηθεί ένα ενιαίο κυτταρικό εκχύλισμα. Στη συνέχεια, σε κάθε eppendorf μεταφέρονται 20-25 μl του διαλύματος λύσης ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος που περιέχεται κάθε φορά και τα κύτταρα αφήνονται να λυθούν στον πάγο για περίπου 30 λεπτά.

➤ **Sonication** (λύση με υπερήχους)

Με το πέρας του χρόνου, τα eppendorf μεταφέρονται σε ένα sonication tube έτσι ώστε να προκληθεί η λύση των κυττάρων με πιο βίαιο τρόπο σε σχέση με προηγούμενως. Ο χρόνος έκθεσης στους υπερήχους και οι επαναλήψεις έκθεσης εξαρτώνται από την κάθε κυτταρική σειρά. Για τη κυτταρική σειρά SH-SY5Y, τα κύτταρα εκτίθεται σε 5 επαναλήψεις των 2 δευτερολέπτων η κάθε μία. Μεταξύ των επαναλήψεων μεσολαβούν 35 δευτερόλεπτα καθώς η διαδικασία παράγει θερμότητα.

➤ **Bradford**

Η μέθοδος Bradford, είναι μια χρωματομετρική μέθοδος και βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής του χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue από καφέ σε μπλε κατά την σύνδεσή της σε πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες. Αυτή η αλλαγή του χρώματος, μπορεί να υπολογιστεί με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου, μετρώντας την απορρόφηση στα 595 nm. Με τη βοήθεια εξίσωσης (πρότυπης καμπύλης) και γνωρίζοντας την απορρόφηση για κάθε συνθήκη μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης.

Για αυτόν τον υπολογισμό χρησιμοποιείται διάλυμα Bradford που από 5x αραιώνεται σε 1x. Με το συγκεκριμένο διάλυμα υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που περιέχεται σε 1 μl συνθήκης. Στην περίπτωση του τυφλού αντί για 1 μl συνθήκης, περιέχεται 1 μl Lysis Buffer. Τα δείγματα που περιέχουν το διάλυμα Bradford, αφήνονται για 40 λεπτά στο σκοτάδι για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει η φωτομέτρηση τους.

2.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Ουσιαστικά με την διαδικασία του Bradford, υπολογίστηκε η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που περιέχεται σε 1 μl κάθε συνθήκης και μπορεί πλέον να πραγματοποιηθεί η προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Από

κάθε συνθήκη παραλαμβάνεται η απαραίτητη ποσότητα δείγματος που περιέχει 50 mg πρωτεΐνης και μεταφέρεται σε ένα καινούριο erppendorf. Σε κάθε νέο erppendorf, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα Sample Buffer 4x ώστε η τελική του συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 1x. Το Sample Buffer εξασφαλίζει πως οι πρωτεΐνες έχουν αποδιαταχθεί και έχουν ένα συνολικό αρνητικό φορτίο, ότι δηλαδή τα δείγματα έχουν προετοιμαστεί κατάλληλα για ηλεκτροφόρηση. Τελικά στα erppendorf προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα Tris-HCl (ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 20 μ l). Τα δείγματα πλέον είναι έτοιμα και αποθηκεύονται στους -20° C μέχρι την στιγμή της ηλεκτροφόρησης.

2.6.3 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες-SDS PAGE

Σε αυτό το στάδιο, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς μετακινούνται κατά μήκος ενός ηλεκτρικού πεδίου σε μια πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Ουσιαστικά οι πρωτεΐνες υπό την επίδραση του απορρυπαντικού SDS, έχουν μετουσιωθεί (αποδιαταχθεί) και «κουβαλάνε» ένα συνολικό αρνητικό φορτίο, οπότε μετακινούνται προς τον θετικό πόλο (προς την βάση του gel). Με το πέρας της διαδικασίας, οι μικρότερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες θα βρίσκονται στο κάτω μέρος της πηκτής πολυακρυλαμίδιου, ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους θα βρίσκονται πιο ψηλά (καθώς θα έχουν διανύσει μικρότερη απόσταση).

Το gel, στο οποίο θα «τρέξουν» τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αποτελείται από δύο ειδών πηκτές, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή διαχωρισμού είναι αυτή με βάση την οποία θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες και μπορεί να έχει διάφορες συγκεντρώσεις. Για την παρασκευή πηκτής διαχωρισμού συγκέντρωσης 10%, απαιτούνται: 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% w/v SDS, 10 ή 12 % w/v ακρυλαμίδιο, 1% w/v APS και 0,04% v/v TEMED. Το APS είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών, των οποίων η παρουσία είναι σημαντική για τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμίδιου και τον σχηματισμό πηκτής πολυακρυλαμίδιου. Το TEMED από την άλλη λειτουργεί ως επιταχυντής του πολυμερισμού. Τα δύο αυτά συστατικά είναι τα τελευταία που προστίθενται για τον σχηματισμό της πηκτής. Η πηκτή επιστοίβαξης, είναι αυτή στην οποία θα «φορτωθούν» τα δείγματα (στον πυθμένα πηγαδιών), μέχρι να αρχίσει η διαδικασία του διαχωρισμού πρωτεϊνών. Για την παρασκευή της απαιτούνται: 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% w/v SDS, 4% w/v ακρυλαμίδιο και τελικά 1% w/v APS και 0,04% v/v TEMED.

Τα δείγματα που προηγουμένως ήταν αποθηκευμένα στους -20° C θερμαίνονται για 5 λεπτά στο heatblock στους 95° C, εάν πρόκειται για την πρώτη χρήση τους

ή για 2,5 λεπτά εάν έχουν χρησιμοποιηθεί και προηγουμένως. Μετέπειτα, υποβάλλονται σε ένα γρήγορο spin και ακολουθεί το «φόρτωμα» τους. Σε ένα πρώτο πηγαδάκι του gel φορτώνεται ο marker και στη συνέχεια τα προς ανάλυση δείγματα. Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης (που στο εσωτερικό της περιλαμβάνει Running Buffer 1x) ρυθμίζεται να λειτουργεί στα 90 V, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή διαχωριστική ικανότητα. Όταν τα δείγματα φτάσουν προς το τέλος της διαδρομής του gel, η διαδικασία σταματά.

2.6.4 Ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Επειδή σε μετέπειτα στάδιο θα χρησιμοποιήσουμε αντισώματα, ώστε να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στα δείγματα που προηγουμένως ηλεκτροφορήσαμε, είναι απαραίτητο να μεταφέρουμε την πληροφορία του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κι αυτό γιατί τα αντισώματα δεν μπορούν να «πιάσουν» τις πρωτεΐνες για τις οποίες εξειδικεύονται, όταν αυτές βρίσκονται στο gel. Όπως και στην περίπτωση της ηλεκτροφόρησης, η διαδικασία ανοσοαποτύπωσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης απαιτεί την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με βάση το οποίο οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς τον θετικό πόλο (προς την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης).

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης είναι επιπλέον απαραίτητη η παρασκευή του «blotting sandwich». Αυτή η παρασκευή απαιτεί, εκτός από την μεμβράνη και το gel, 4 διηθητικά χαρτιά Whatman (μεγέθους λίγο μεγαλύτερου από αυτό της μεμβράνης) καθώς και δύο σφουγγαράκια παρόμοιου μεγέθους. Όλα αυτά προηγουμένως εμβαπτίζονται σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, Transfer Buffer 1x. Το συγκεκριμένο διάλυμα συμβάλλει στην αύξηση της ικανότητας ηλεκτρομεταφοράς, καθώς περιέχει SDS που προσδίδει το αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες καθώς και μεθανόλη που αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Με την συγκρότηση του, το «blotting sandwich» μεταφέρεται στη συσκευή του Transfer, η οποία στο εσωτερικό της περιλαμβάνει Transfer Buffer 1x. Η συσκευή ρυθμίζεται στα 0,35 A και στα 70 min. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε TBST 1x.

2.6.5 Blocking

Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται έτσι ώστε να «μπλοκαριστούν» οι μη ειδικές θέσεις σύνδεσης και στη συνέχεια τα αντισώματα να συνδεθούν εξειδικευμένα στις πρωτεΐνες για τις οποίες προορίζονται. Κατά αυτόν τον τρόπο παρασκευάζεται ένα διάλυμα TBST 1x με περιεκτικότητα 10% w/v σε άπαχο

αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk, NFDM). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται στο συγκεκριμένο διάλυμα για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας του χρόνου πραγματοποιούνται 3 τρίλεπτες πλύσεις της μεμβράνης με TBST 1x υπό ανάδευση και στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος.

2.6.6 Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών

➤ Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία του blocking, ακολουθεί η επώαση με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης-στόχου. Αρχικά, παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιλαμβάνει 2% w/v γάλα σε TBST 1x. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται κατάλληλο αντίσωμα ανάλογα με την πρωτεΐνη που θέλουμε να στοχεύσουμε, έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 1/1000 v/v. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι έναντι του GR, της β-ακτίνης και του Tuj-1. Η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα πραγματοποιείται στους 4° C overnight (16h) υπό ανάδευση.

➤ Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται 5 πλύσεις της μεμβράνης, από 5 λεπτά η κάθε μία, σε TBST 1x υπό ανάδευση. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος. Η φύση του πρωτογενούς αντισώματος, είναι αυτή η οποία θα καθορίσει την φύση του δευτερογενούς, το οποίο μπορεί να είναι μονοκλωνικό (mouse) ή πολυκλωνικό (rabbit). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εμφάνιση και των 3 πρωτεϊνών, έχουν ως δευτερογενές αντίσωμα mouse. Πρέπει επίσης να αναφερθεί, πως το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP). Σε κάθε περίπτωση, παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιλαμβάνει 2% w/v γάλα σε TBST 1x. Σε αυτό το διάλυμα, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντισώματος έτσι ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1/50.000 v/v. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα για 1 ώρα υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας αυτού του χρόνου, πραγματοποιούνται εκ νέου 3 πλύσεις από 5 λεπτά η καθεμία για την απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος και κατά επέκταση την αναγνώριση ειδικών θέσεων.

2.6.7 Ανίχνευση σήματος χημειοφωταύγειας

Αφού έχει προηγηθεί η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές κι έπειτα το δευτερογενές αντίσωμα, ακολουθεί η προσθήκη σε αυτήν των αντιδραστηρίων ECL. Με πιπέτα παραλαμβάνεται ίση ποσότητα των αντιδραστηρίων ECLA και ECLB και μεταφέρονται σε ένα erpendorf, το οποίο αναδεύεται ήπια. Στη συνέχεια το διάλυμα που δημιουργείται, μεταφέρεται σε συγκεκριμένη ζώνη της μεμβράνης που βρίσκεται η πρωτεΐνη (ανάλογα με το μοριακό της βάρος) την οποία θέλουμε να εμφανίσουμε. Η μεμβράνη επωάζεται για 3 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου.

Το αντιδραστήριο ECLA περιλαμβάνει ένα υπόστρωμα (luminol) που όταν οξειδώνεται εκπέμπει φως. Το αντιδραστήριο ECLB περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) που δρα ως οξειδωτικός παράγοντας. Το ένζυμο HRP που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα, καταλύει την αντίδραση μεταξύ luminol και H_2O_2 , που τελικά οδηγεί στην παραγωγή φωτός.

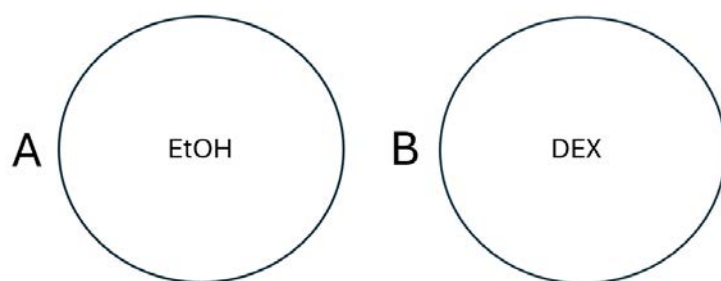
Με το πέρας του χρόνου, η μεμβράνη μεταφέρεται στον σκοτεινό θάλαμο (dark room), όπου βρίσκονται τα φωτοευαίσθητα φιλμ ανίχνευσης σήματος (x-ray film). Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ στη μεμβράνη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος. Μετά από αυτή την έκθεση, το φιλμ επωάζεται στο αντιδραστήριο developer έτσι ώστε να εμφανιστεί το σήμα. Ακολουθώντας, ξεπλένεται με νερό έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση του developer και επωάζεται στο fixer για να μονιμοποιηθεί το σήμα. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πάλι με νερό και αφού στεγνώσει, είναι πλέον έτοιμο να αναλυθεί και να αποθηκευτεί.

Αφού πραγματοποιηθεί το σκανάρισμα του φιλμ, υφίσταται επεξεργασία μέσω του προγράμματος ImageJ, το οποίο παρέχει τα επίπεδα (σε μορφή ποσοστών) των πρωτεϊνών που μελετώνται μέσω Western blot στις διαφορετικές συνθήκες. Ακολουθεί η κανονικοποίηση αυτών των επιπέδων ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης και ως προς την συνθήκη των μη διαφοροποιημένων κυττάρων, απουσία ορμονών. Στη συνέχεια, κατασκευάζεται ένα διάγραμμα μέσω excel, που απεικονίζει τα κανονικοποιημένα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετάμε (GR, Tuj-1). Επιπλέον μέσω του προγράμματος Adobe Photoshop κατασκευάζεται η συνολική εικόνα στην οποία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του Western blot (συμπεριλαμβανομένου του σκαναρισμένου φιλμ, και των κανονικοποιημένων πρωτεϊνικών επιπέδων).

3. Αποτελέσματα

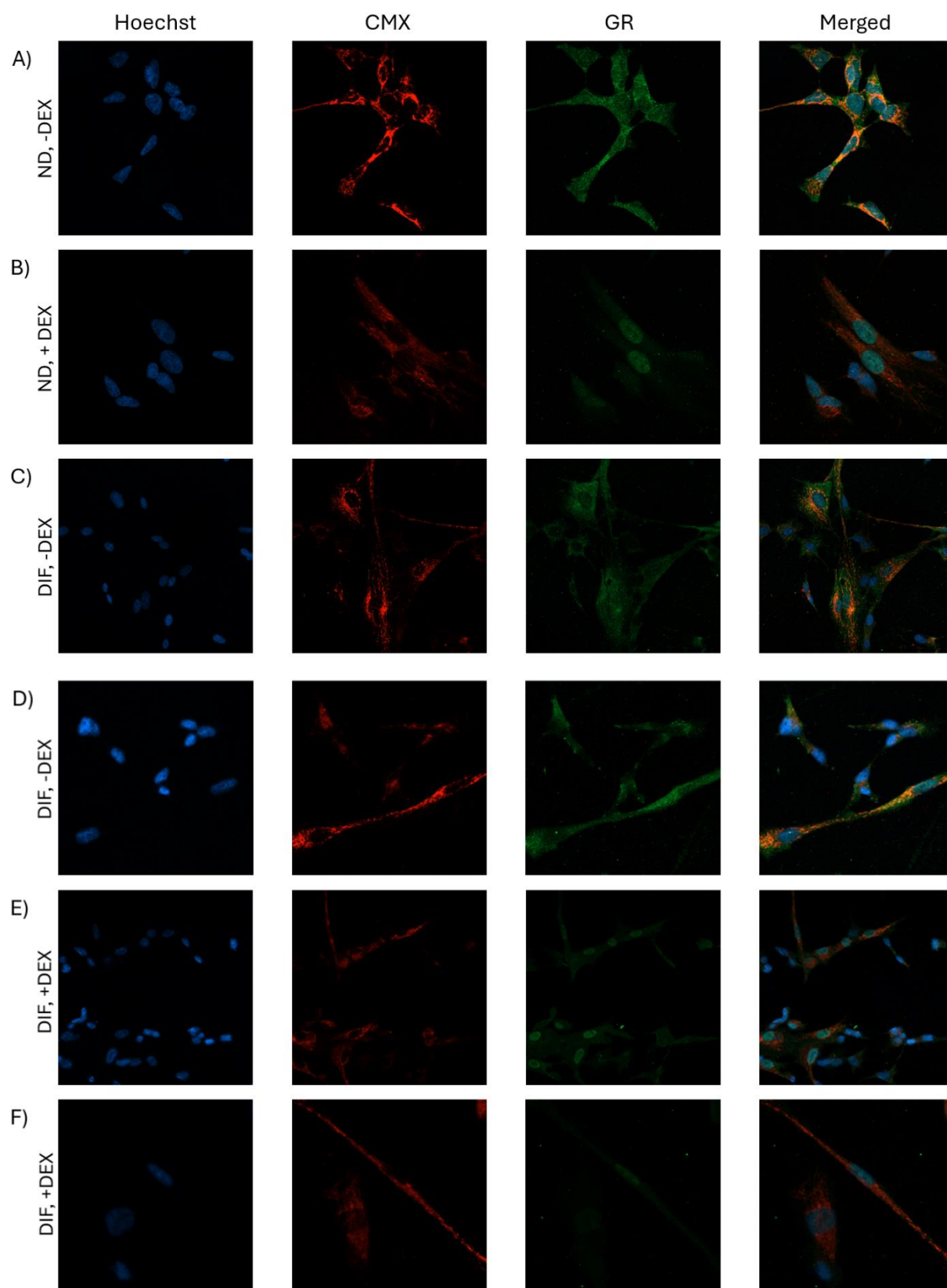
3.1 Αποτελέσματα Ανοσοκυτταροχημείας

Με στόχο την μελέτη της πιθανής υποκυτταρικής μετατόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ή/και στα μιτοχόνδρια κατά την διάρκεια πρώιμων σταδίων διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκυτταροχημείας. Για τον σκοπό αυτό, επιστρώθηκαν 80.000 c/w που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είτε απουσία είτε παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX). Η DEX προστέθηκε σε κάθε συνθήκη σε τελική συγκέντρωση 10^{-7} M και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν προς διαφοροποίηση ή όχι για 6 μέρες.



Εικόνα 8: Διακρίνονται οι συνθήκες των κυττάρων που καλλιεργούνται προς διαφοροποίηση ή όχι σε 6-well και τα οποία στη συνέχεια μελετώνται με την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας: A) Κύτταρα σε διαλύτη αιθανόλη (EtOH), απουσία ορμονών B) Κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX).

Τα αποτελέσματα της μελέτης απεικονίζονται στην εικόνα 9. Σημειώνεται πως οι πυρήνες διακρίνονται με μπλε χρώμα έχοντας σημειωθεί με τη χρωστική Hoechst, ενώ τα μιτοχόνδρια με κόκκινο χρώμα έχοντας σημειωθεί με τη χρωστική CMX. Ο υποδοχέας GR απεικονίζεται με πράσινο χρώμα χρησιμοποιώντας αντίσωμα που είναι συζευγμένο με τη χρωστική Alexa fluor 488. Επιπλέον, διακρίνεται η συγχώνευση των προηγούμενων τριών εικόνων.



Εικόνα 9: Ανοσοκυταροχημική μελέτη της υποκυτταρικής εντόπισης του GR, κατά την από ρετινοϊκό οξύ επαγόμενη διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y, παρουσία και απουσία DEX. Στην πρώτη στήλη διακρίνονται οι πυρήνες που χρωματίζονται με την χρωστική Hoechst. Στην δεύτερη στήλη διακρίνονται τα μιτοχόνδρια που χρωματίζονται με CMX. Στην τρίτη στήλη

εντοπίζεται ο GR με την Alexa fluor 488. Η τέταρτη στήλη αποτελεί μία συγχώνευση των προηγούμενων τριών στηλών. ND: μη διαφοροποιημένα κύτταρα, DIF: διαφοροποιημένα κύτταρα, DEX: δεξαμεθαζόνη. Τα +/- υποδεικνύουν την παρουσία ή απουσία ορμόνης (DEX) αντίστοιχα.

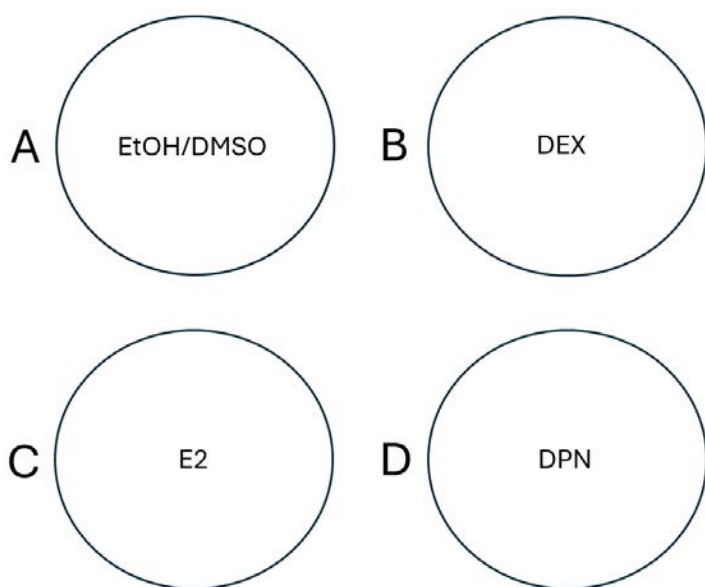
Στην περίπτωση των μη διαφοροποιημένων κυττάρων που καλλιεργούνται απουσία της ορμόνης DEX (εικόνα 9, A), το μεγαλύτερο ποσοστό του υποδοχέα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ διακρίνεται και η παρουσία του σε μικρό βαθμό στα μιτοχόνδρια. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία της ορμόνης DEX (εικόνα 9, B), ο GR μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, καθώς ενεργοποιείται η δράση του ως μεταγραφικού παράγοντα. Αυτή η συνθήκη λειτουργεί ως θετικό control που υποδεικνύει τα αποτελέσματα της κατανομής του υποδοχέα στο κύτταρο, στην περίπτωση ενεργοποίησής του. Όσο αναφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα, για αρχή παρατηρείται όπως αναμενόταν, αλλαγή στη μορφολογία τους συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα. Δηλαδή, τα κύτταρα από στρογγυλά με μικρές απολήξεις (εικόνα 9, A), φαίνεται να σχηματίζουν μεγάλους άξονες και παράλληλα να συγκροτούν ένα δίκτυο νευρώνων με τα γειτονικά τους κύτταρα κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης (εικόνα 9, C και D). Η κατανομή του υποδοχέα στη συνθήκη των διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία DEX (εικόνα 9, C και D) είναι ανάλογη με την αντίστοιχη συνθήκη στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Δηλαδή, ο υποδοχέας εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και σε ένα μικρό ποσοστό στα μιτοχόνδρια. Όσον αναφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία ορμόνης (εικόνα 9, E και F), τα αποτελέσματα είναι τα αναμενόμενα και υποδεικνύουν την μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα λόγω της ενεργοποίησής του.

Συμπερασματικά, για τα διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν απουσία της ορμόνης DEX, ο υποδοχέας εντοπίζεται σχεδόν καθολικά στο κυτταρόπλασμα, ενώ διακρίνεται και η παρουσία του σε μικρό βαθμό στα μιτοχόνδρια. Φαίνεται δηλαδή πως η διαδικασία της διαφοροποίησης δεν επάγει κάποια δραματική αλλαγή στην υποκυτταρική κατανομή του υποδοχέα.

3.2 Αποτελέσματα Western blot

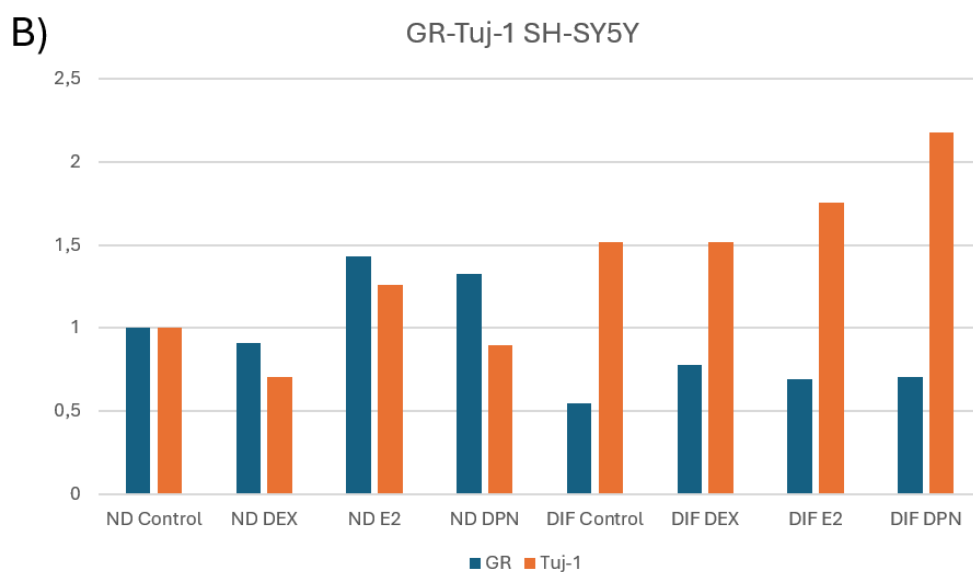
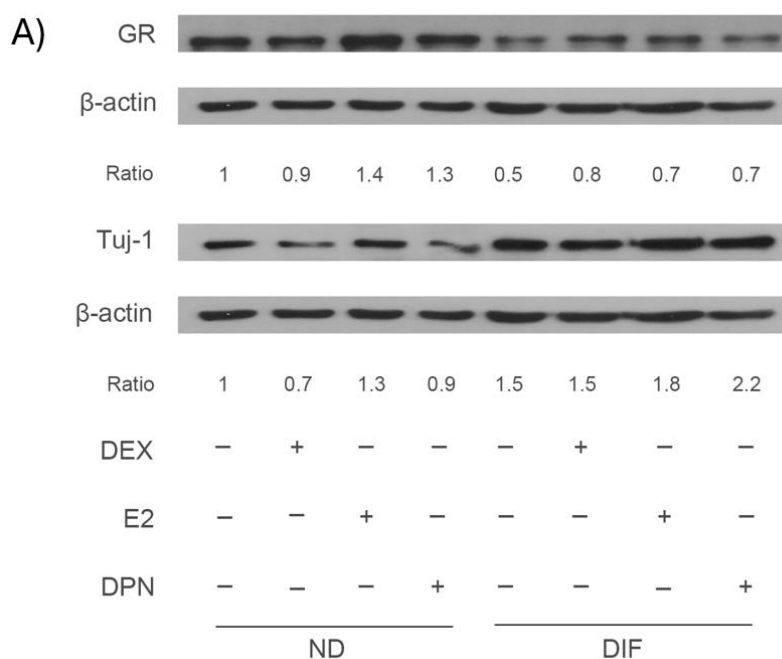
Από τη στιγμή που δεν παρατηρήσαμε την υποκυτταρική μετατόπιση του GR κατά τα πρώιμα στάδια της διαφοροποίησης των SH-SY5Y, επόμενος στόχος τέθηκε η μελέτη της πιθανή μεταβολής των πρωτεϊνικών του επιπέδων για το ίδιο χρονικό διάστημα διαφοροποίησης απουσία και παρουσία των ορμονών δεξαμεθαζόνη (DEX), 17β-οιστραδιόλη (E2) και διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN).

Έτσι επιστρώθηκαν σε 6-well 250.000 c/w που καλλιεργήθηκαν προς διαφοροποίηση ή όχι για 6 μέρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και μετά από κατάλληλη προετοιμασία, υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση και Western blot, του οποίου τα αποτελέσματα διακρίνονται παρακάτω. Οι συγκεντρώσεις των ορμονών που προστέθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων είναι 10^{-8} M για τη DEX, 10^{-9} M για την E2 και 10^{-8} M για τη DPN.



Εικόνα 10: Διακρίνονται οι συνθήκες των κυττάρων που καλλιεργούνται προς διαφοροποίηση ή όχι σε 6-well και τα οποία στη συνέχεια μελετώνται με τη μέθοδο του Western blot: A) Κύτταρα που καλλιεργούνται απουσία ορμονών B) Κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία DEX C) Κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία E2 D) Κύτταρα που καλλιεργούνται παρουσία DPN. EtOH: αιθανόλη, DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο, DEX: δεξαμεθαζόνη, E2: 17β-οιστραδιόλη, DPN: διαρυλοπροπιονιτρίλιο.

Στην εικόνα 11 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot για τις πρωτεΐνες GR, Tuj-1 και β-ακτίνη. Επιπλέον, διακρίνονται τα κανονικοποιημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR και Tuj-1 στις διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων, ως προς την β-ακτίνη και ως προς την συνθήκη των μη διαφοροποιημένων κυττάρων, απουσία ορμονών.



Εικόνα 11: Αποτελέσματα μελέτης των πρωτεϊνικών επιπέδων GR, κατά την από ρετινοϊκό οξύ επαγόμενη διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y, παρουσία και απουσία DEX, E2 και DPN. A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες της ανάλυσης Western blot για GR, Tuj-1 και β-actin. B) Κανονικοποιημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR και Tuj-1 ως προς την β-ακτίνη και ως προς τη συνθήκη μη διαφοροποίησης, απουσία ορμονών. ND: μη διαφοροποιημένα κύτταρα, DIF: διαφοροποιημένα κύτταρα, DEX: δεξαμεθαζόνη, E2: οιστραδιόλη, DPN: διαρυλοπροπιονιτρίλιο, GR: υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, Tuj-1: βIII-τουμπουλίνη, β-actin: β-ακτίνη, Ratio: Κανονικοποιημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR και Tuj-1. Τα +/- υποδεικνύουν την προσθήκη ή όχι των αντίστοιχων ορμονών.

Στη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία της ορμόνης DEX δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη απουσία ορμόνης. Στις συνθήκες των μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία των E2 και DPN, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων κατά 40% και 30% αντίστοιχα, σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμόνης. Όσον αφορά τα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών, ο GR μειώνεται σε ένα ποσοστό 50%, συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών. Όπως και στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα, παρουσία των ορμονών E2 και DPN παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, κατά περίπου 20% στις συνθήκες των διαφοροποιημένων κυττάρων, σε σύγκριση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών. Αντίστοιχη δράση παρατηρήθηκε παρουσία DEX στα διαφοροποιημένα κύτταρα.

Όσον αφορά τον παράγοντα διαφοροποίησης Tuj-1, στις συνθήκες των μη διαφοροποιημένων κυττάρων τα πρωτεϊνικά του επίπεδα φαίνεται να μειώνονται κατά 30% παρουσία DEX, ενώ παρουσία της ορμόνης E2 παρατηρείται μία αύξηση που κυμαίνεται στο 30%, σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών. Παρουσία DPN στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα τα επίπεδα του Tuj-1 δε φαίνεται να μεταβάλλονται. Στις συνθήκες των διαφοροποιημένων κυττάρων, όπως αναμενόταν τόσο απουσία ορμονών όσο και παρουσία ορμονών, παρατηρείται αύξηση του Tuj-1. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων κατά 50% απουσία ορμονών, κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η παρουσία της DEX δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή του Tuj-1 στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Παρουσία βέβαια των E2 και DPN παρατηρήθηκε επιπλέον αύξηση κατά 30% και 70% αντίστοιχα, σε σχέση με τα επίπεδα του Tuj-1 στα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών.

Συμπερασματικά, όσο αναφορά τον Tuj-1 παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων στις συνθήκες των διαφοροποιημένων κυττάρων είτε απουσία είτε παρουσία ορμονών, γεγονός που υποδεικνύει την επιτυχή πρόκληση διαφοροποίησης στα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Από την άλλη, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR φάνηκε να μειώνονται ως επακόλουθο της διαδικασίας της διαφοροποίησης, είτε παρουσία είτε απουσία ορμονών.

4. Συζήτηση – Μελλοντική έρευνα

Τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs) αποτελούν μία κατηγορία στεροειδών ορμονών που έχουν σημαντικό ρόλο στον οργανισμό (Timmermans et al., 2019). Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικές ενώσεις, ενώ παράλληλα έρευνες διεξάγονται για την εύρεση νέων θεραπευτικών ιδιοτήτων τους με τις λιγότερες παρενέργειες (Scherholz et al., 2019). Τα γλυκοκορτικοειδή, συμμετέχουν στην ρύθμιση και τη διατήρηση της φυσιολογικής κυτταρικής και μεταβολικής ομοιόστασης του οργανισμού (Lockett et al., 2024). Ασκούν τον ρόλο τους συνδεόμενα στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών (glucocorticoid receptor, GR), ο οποίος σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να ενεργοποιηθεί και ανεξάρτητα από την σύνδεση των GCs (Verhoog et al., 2011), (Galliher-Beckley et al., 2011). Με την ενεργοποίησή του, ο υποδοχέας μπορεί να μετατοπιστεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, για να ασκήσει τον ρόλο του ως ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης (μεταγραφικός παράγοντας), ενώ παράλληλα έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (PI3K/Akt, MAPK) (Panettieri et al., 2018). Επιπλέον, μελέτες έχουν αναδείξει τον σημαντικό ρόλο του GR και σε μιτοχονδριακό επίπεδο (Psarra & Sekeris 2008).

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε πως ο υποδοχέας έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει στη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος και ένας τέτοιος ρόλος θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή θεραπεία σε ασθενείς με νευροβλάστωμα (Ross et al., 2002) (Sainero-Alcolado et al., 2022). Στόχος της μελέτης μας ήταν να διερευνήσουμε την πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα ή/και τα μιτοχόνδρια καθώς και την πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών του επιπέδων ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Έτσι, καλλιεργήσαμε κύτταρα SH-SY5Y απουσία ή παρουσία των ορμονών δεξαμεθαζόνη (DEX), οιστραδιόλη (E2) και διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN) και τα οποία οδηγήθηκαν προς διαφοροποίηση ή όχι. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε τις τεχνικές της ανοσοκυταροχημείας και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την μελέτη της υποκυτταρικής κατανομής και των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην αποσαφήνιση του πιθανού ρόλου του GR και των στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση κυττάρων SH-SY5Y και της πιθανής στόχευσης του υποδοχέα για θεραπευτικούς σκοπούς.

Όσον αφορά την μέθοδο της ανοσοκυταροχημείας, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η κατανομή του GR στο κύτταρο δεν άλλαξε μεταξύ των συνθηκών διαφοροποιημένων και μη κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση η παρουσία του GR φάνηκε να βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα και σε μικρό βαθμό

στα μιτοχόνδρια, ενώ δεν παρατηρήθηκε η μετατόπισή του στον πυρήνα ως αποτέλεσμα της νευρικής διαφοροποίησης. Ουσιαστικά ο GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όταν είναι ανενεργός σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες (Vandevyver et al., 2012). Η παρουσία του GR στα μιτοχόνδρια μάλλον υποδηλώνει την συμμετοχή του στην μιτοχονδριακή βιογένεση και την παραγωγή ενέργειας ATP που χρειάζεται για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των κυττάρων. Άλλωστε, παλαιότερες μελέτες έχουν αναδείξει τον ρόλο του υποδοχέα σε τέτοιου είδους διαδικασίες μέσω της ενεργοποίησης συστατικών της αναπνευστικής αλυσίδας, της ενίσχυσης της έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων, της αύξησης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της πρόληψης του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Psarra & Sekeris, 2008), (Psarra & Sekeris, 2009), (Psarra & Sekeris, 2011), (Karra et al., 2022), (Kokkinopoulou & Moutsatsou, 2021). Βέβαια, η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανοσοκυτταροχημείας, απαιτεί την πραγματοποίηση περισσότερων βιολογικών επαναλήψεων του πειράματος μας καθώς και την διεξαγωγή περαιτέρω μελετών, στοχεύοντας σε μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα διαφοροποίησης της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς.

Με την μέθοδο του Western blot, φάνηκε πως τα επίπεδα του Tuj-1, όπως ήταν αναμενόμενο ήταν υψηλότερα στις συνθήκες των διαφοροποιημένων κυττάρων. Μάλιστα, η μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων διακρίνεται στην περίπτωση των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν παρουσία E2 ή DPN. Όσον αφορά τον GR παρατηρήθηκε μια συνολική μείωση των πρωτεϊνικών του επιπέδων είτε απουσία είτε παρουσία ορμονών (DEX, E2 ή DPN) στα πρώιμα διαφοροποιημένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Η κυτταρική διαφοροποίηση είναι μία πολύπλοκη διαδικασία κατά τη διάρκεια της οποίας η έκφραση των γονιδίων και τα πρωτεϊνικά επίπεδα ρυθμίζονται ανάλογα με τις ανάγκες των κυττάρων, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σωστή λειτουργία τους και κατ' επέκταση η ακεραιότητα των ιστών και να αποφευχθεί η περιττή δαπάνη ενέργειας (Barresi et al., 2019). Σε αυτά τα πλαίσια ρυθμίζονται και τα επίπεδα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ορμονών που μπορεί να μειώνονται μέσω επιγενετικής ρύθμισης, μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων και μέσω της συμβολής miRNAs (Cao-lei et al., 2011), (Vandevyver et al., 2014). Μάλιστα, μία μελέτη υπέδειξε τον πιθανό ρόλο του miR-124a στην αναστολή της μετάφρασης του mRNA του GR, κατά την νευρική διαφοροποίηση κυττάρων P19 (Vreugdenhil et al., 2009). Η μείωση των επιπέδων του GR, θα μπορούσε να σχετίζεται με τον ρόλο του υποδοχέα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Nürnberg et al., 2018), (Ninomyia et al., 2014), (Wessely et al., 1997), καθώς είναι απαραίτητη η διακοπή της δεδομένης διαδικασίας για την επαγωγή διαφοροποίησης (Janesick et al., 2015). Σε κάθε περίπτωση, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή περισσότερων βιολογικών επαναλήψεων που να αποδεικνύουν τα αποτελέσματα του

πειράματος μας, καθώς και επιπλέον μελετών για την διερεύνηση του μηχανισμού που ευθύνεται για την μείωση των επιπέδων του GR. Ακόμη, χρήσιμη θα ήταν η πραγματοποίηση πειραμάτων για τον υπολογισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα σε διαφοροποιημένα και μη κύτταρα για τα διαφορετικά υποκυτταρικά κλάσματα.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον αποτέλεσμα του πειράματός μας που όμως είναι ανεξάρτητο με την διαδικασία της διαφοροποίησης, είναι η αύξηση των επιπέδων του GR σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία των ορμονών E2 ή DPN σε σχέση με την συνθήκη απουσίας ορμονών. Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει την αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή και τα οιστρογόνα, η οποία αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει στην ρύθμιση των επιπέδων του GR (Ycaza Herrera & Mather, 2015), (Burgess & Handa, 1993), (Ferrini & De Nicola, 1991) (Miranda et al., 2013), (Cvoro et al., 2011). Σε κάθε περίπτωση, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τη διερεύνηση του ενδοκυτταρικού μηχανισμού που οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του GR παρουσία των ορμονών.

5.Βιβλιογραφία

- Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, 81(3), 1269–1304.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
- Barresi, M. J. F., & Gilbert, S. F. (2019). *Developmental biology* (12th. edition). Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Burgess, L. H., & Handa, R. J. (1993). Estrogen-Induced Alterations in the Regulation of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor Messenger RNA Expression in the Female Rat Anterior Pituitary Gland and Brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4(2), 191–198.
<https://doi.org/10.1006/mcne.1993.1023>
- Carroll, V. M., Jeyakumar, M., Carlson, K. E., & Katzenellenbogen, J. A. (2012). Diarylpropionitrile (DPN) Enantiomers: Synthesis and Evaluation of Estrogen Receptor β -Selective Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(1), 528–537. <https://doi.org/10.1021/jm201436k>
- Chapman, K., Holmes, M., & Seckl, J. (2013). 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiological Reviews*, 93(3), 1139–1206.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>
- Chen, P., Li, B., & Ou-Yang, L. (2022). Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839005>
- Du, M., Shan, J., Feng, A., Schmull, S., Gu, J., & Xue, S. (2020). Oestrogen Receptor β Activation Protects Against Myocardial Infarction via Notch1 Signalling. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 34(2), 165–178.
<https://doi.org/10.1007/s10557-020-06949-3>
- Duly, A. M. P., Kao, F. C. L., Teo, W. S., & Kavallaris, M. (2022). β III-Tubulin Gene Regulation in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.851542>
- Fadel, L., Dacic, M., Fonda, V., Sokolsky, B. A., Quagliarini, F., Rogatsky, I., & Uhlenhaut, N. H. (2023). Modulating glucocorticoid receptor actions in physiology and pathology: Insights from coregulators. *Pharmacology & Therapeutics*, 251, 108531.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108531>
- Ferrini, M., & De Nicola, A. F. (1991). Estrogens up-regulate type I and type II glucocorticoid receptors in brain regions from ovariectomized rats. *Life*

- Sciences*, 48(26), 2593–2601. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(91\)90617-K](https://doi.org/10.1016/0024-3205(91)90617-K)
- Flaherty, R. L., Owen, M., Fagan-Murphy, A., Intabli, H., Healy, D., Patel, A., Allen, M. C., Patel, B. A., & Flint, M. S. (2017). Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 19(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0823-8>
- Frigo, D. E., Bondesson, M., & Williams, C. (2021). Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays in Biochemistry*, 65(6), 847–856. <https://doi.org/10.1042/EBC20210020>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). *Estrogen receptor signaling mechanisms* (pp. 135–170). <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Galliher-Beckley, A. J., Williams, J. G., & Cidlowski, J. A. (2011). Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(23), 4663–4675. <https://doi.org/10.1128/MCB.05866-11>
- Hodgens, A., & Sharman, T. (2023). Corticosteroids. *Surviving Prescribing: A Practical Guide, Second Edition*, 199–200. <https://doi.org/10.1017/9781108776936.043>
- Illendula, A., Fultang, N., & Peethambaran, B. (2020). Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements. *Oncology Reports*, 44(3), 1013–1024. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7681>
- Janesick, A., Wu, S. C., & Blumberg, B. (2015). Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(8), 1559–1576. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1815-9>
- Ji, J. Y., Jing, H., & Diamond, S. L. (2003). Shear stress causes nuclear localization of endothelial glucocorticoid receptor and expression from the GRE promoter. *Circulation Research*, 92(3), 279–285. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000057753.57106.0b>
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9), 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Karra, A. G., Sioutopoulou, A., Gorgogietas, V., Samiotaki, M., Panayotou, G., & Psarra, A.-M. G. (2022). Proteomic analysis of the mitochondrial glucocorticoid receptor interacting proteins reveals pyruvate

- dehydrogenase and mitochondrial 60 kDa heat shock protein as potent binding partners. *Journal of Proteomics*, 257, 104509. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104509>
- Karra, A. G., Tsialtas, I., Kalousi, F. D., Georgantopoulos, A., Sereti, E., Dimas, K., & Psarra, A.-M. G. (2023). Increased Expression of the Mitochondrial Glucocorticoid Receptor Enhances Tumor Aggressiveness in a Mouse Xenograft Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3740. <https://doi.org/10.3390/ijms24043740>
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., & Mörk, S. J. (2003). Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motility*, 55(2), 77–96. <https://doi.org/10.1002/cm.10116>
- Kholodenko, I. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Deyev, S. M., & Kholodenko, R. V. (2018). Neuroblastoma Origin and Therapeutic Targets for Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2018/7394268>
- Kicman, A. T. (2008). Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, 154(3), 502–521. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.165>
- Kokkinopoulou, I., & Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6054. <https://doi.org/10.3390/ijms22116054>
- Lee, S.-R., Kim, H.-K., Song, I.-S., Youm, J., Dizon, L. A., Jeong, S.-H., Ko, T.-H., Heo, H.-J., Ko, K. S., Rhee, B. D., Kim, N., & Han, J. (2013). Glucocorticoids and their receptors: Insights into specific roles in mitochondria. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 112(1–2), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2013.04.001>
- Lockett, J., Inder, W. J., & Clifton, V. L. (2024). The Glucocorticoid Receptor: Isoforms, Functions, and Contribution to Glucocorticoid Sensitivity. *Endocrine Reviews*, 45(4), 593. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAE008>
- Makimoto, A., Fujisaki, H., Matsumoto, K., Takahashi, Y., Cho, Y., Morikawa, Y., Yuza, Y., Tajiri, T., & Iehara, T. (2024). Retinoid Therapy for Neuroblastoma: Historical Overview, Regulatory Challenges, and Prospects. *Cancers*, 16(3), 544. <https://doi.org/10.3390/cancers16030544>
- Matthews, L., Berry, A., Ohanian, V., Ohanian, J., Garside, H., & Ray, D. (2008). Caveolin Mediates Rapid Glucocorticoid Effects and Couples Glucocorticoid Action to the Antiproliferative Program. *Molecular Endocrinology*, 22(6), 1320–1330. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0154>

- Matthews, L., Johnson, J., Berry, A., Trebble, P., Cookson, A., Spiller, D., Rivers, C., Norman, M., White, M., & Ray, D. (2011). Cell cycle phase regulates glucocorticoid receptor function. *PloS One*, 6(7), e22289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022289>
- Meyers, M. J., Sun, J., Carlson, K. E., Marriner, G. A., Katzenellenbogen, B. S., & Katzenellenbogen, J. A. (2001). Estrogen Receptor- β Potency-Selective Ligands: Structure-Activity Relationship Studies of Diarylpropionitriles and Their Acetylene and Polar Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(24), 4230–4251. <https://doi.org/10.1021/jm010254a>
- Miranda, T. B., Voss, T. C., Sung, M.-H., Baek, S., John, S., Hawkins, M., Grøntved, L., Schiltz, R. L., & Hager, G. L. (2013). Reprogramming the Chromatin Landscape: Interplay of the Estrogen and Glucocorticoid Receptors at the Genomic Level. *Cancer Research*, 73(16), 5130–5139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0742>
- Morgan, D. J., Poolman, T. M., Williamson, A. J. K., Wang, Z., Clark, N. R., Ma'ayan, A., Whetton, A. D., Brass, A., Matthews, L. C., & Ray, D. W. (2016). Glucocorticoid receptor isoforms direct distinct mitochondrial programs to regulate ATP production. *Scientific Reports*, 6(1), 26419. <https://doi.org/10.1038/srep26419>
- Motavalli, R., Majidi, T., Poulak, T., Abediazar, S., Shoja, M. M., Zununi Vahed, S., & Etemadi, J. (2021). The clinical significance of the glucocorticoid receptors: Genetics and epigenetics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 213, 105952. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105952>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2013.09.007>
- Prenek, L., Boldizsár, F., Kugyelka, R., Ugor, E., Berta, G., Németh, P., & Berki, T. (2017). The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis*, 22(2), 239–253. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1320-8>
- Psarra, A.-M. G., & Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(10), 1814–1821. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.014>

- Ross, R. A., Hein, A. M., Braca, J. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L., & Scammell, J. G. (2002). Glucocorticoids induce neuroendocrine cell differentiation and increase expression of N-myc in N-type human neuroblastoma cells. *Oncology Research*, 13(2), 87–94.
- Sanchez, E. R. (1992). Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 17–20.
- Scherholz, M. L., Schlesinger, N., & Androulakis, I. P. (2019). Chronopharmacology of glucocorticoids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 151–152, 245–261. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.02.004>
- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., Shackleton, C. H. L., & Storbeck, K.-H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 194, 105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>
- Schubert, M., & Germain, P. (2023). Retinoic Acid and Retinoid X Receptors. *Cells*, 12(6), 864. <https://doi.org/10.3390/cells12060864>
- Sekeris, C. E. (1990). The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo (Athens, Greece)*, 4(5), 317–320.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments*, 108. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Stanišić, V., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2010). *Modulation of Steroid Hormone Receptor Activity* (pp. 153–176). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81009-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81009-6)
- Talabér, G., Boldizsár, F., Bartis, D., Pálinkás, L., Szabó, M., Berta, G., Sétáló, G., Németh, P., & Berki, T. (2009). Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *International Immunology*, 21(11), 1269–1276. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp093>
- Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), 1545. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01545>
- Verhoog, N. J. D., Du Toit, A., Avenant, C., & Hapgood, J. P. (2011). Glucocorticoid-independent repression of tumor necrosis factor (TNF)

- alpha-stimulated interleukin (IL)-6 expression by the glucocorticoid receptor: a potential mechanism for protection against an excessive inflammatory response. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19297–19310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193672>
- Vreugdenhil, E., Verissimo, C. S. L., Mariman, R., Kamphorst, J. T., Barbosa, J. S., Zweers, T., Champagne, D. L., Schouten, T., Meijer, O. C., Ron de Kloet, E., & Fitzsimons, C. P. (2009). MicroRNA 18 and 124a Down-Regulate the Glucocorticoid Receptor: Implications for Glucocorticoid Responsiveness in the Brain. *Endocrinology*, 150(5), 2220–2228. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1335>
- Walf, A. A., Koonce, C. J., & Frye, C. A. (2008). Estradiol or diarylpropionitrile administration to wild type, but not estrogen receptor beta knockout, mice enhances performance in the object recognition and object placement tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.01.008>
- Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*, 27(11), 1876–1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>
- Xie, H., Hu, L., & Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123(8), 1086–1092.
- Ycaza Herrera, A., & Mather, M. (2015). Actions and interactions of estradiol and glucocorticoids in cognition and the brain: Implications for aging women. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 55, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.005>
- Yukawa, H., Shen, J., Harada, N., Cho-Tamaoka, H., & Yamashita, T. (2005). Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca²⁺ mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons. *Neuroscience*, 130(2), 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.037>
- Zhang, T., Gygi, S. P., & Paulo, J. A. (2021). Temporal Proteomic Profiling of SH-SY5Y Differentiation with Retinoic Acid Using FAIMS and Real-Time Searching. *Journal of Proteome Research*, 20(1), 704–714. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00614>
- Zhang, Y., Sheng, H., Qi, J., Ma, B., Sun, J., Li, S., & Ni, X. (2012). Glucocorticoid acts on a putative G protein-coupled receptor to rapidly regulate the activity of NMDA receptors in hippocampal neurons. *American Journal of*

Physiology-Endocrinology and Metabolism, 302(7), E747–E758.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00302.2011>