



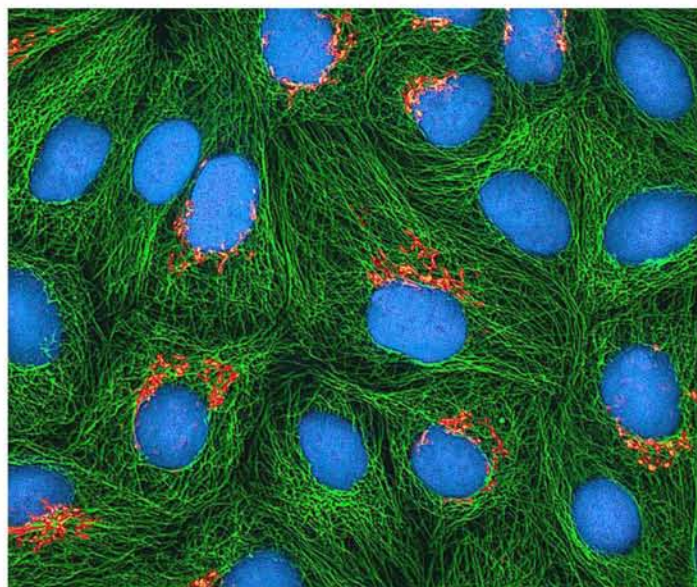
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Τίτλος:

Αξιολόγηση της ρυθμιστικής δράσης φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών στην ενεργότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε καρκινικά κύτταρα μήτρας.



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Λάμπης Ν. Κωνσταντίνος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία

Λάρισα 2014.



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



Graduate Program of the Department of Biochemistry and
Biotechnology
BIOTECHNOLOGY - QUALITY OF FOOD AND
ENVIRONMENT

Evaluation of regulatory action herbal
terpenoids in the activity of the glucocorticoid
receptor in tumor cells die.

DIPLOMA PROJECT
Lampis Konstantinos

Supervisor: Psarra G. Anna-Maria

Larisa 2014

Αξιολόγηση της ρυθμιστικής δράσης φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών στην ενεργότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε καρκινικά κύτταρα μήτρας.

Αξιολόγηση της ρυθμιστικής δράσης φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών στην ενεργότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε καρκινικά κύτταρα μήτρας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ψαρά Γ. Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια, ΤΒΒ, Π.Θ.

Λεωνίδας Δημήτριος, Αν. Καθηγητής, Π.Θ.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αν.Καθηγήτρια, Π.Θ.

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εγκρίθηκε ομόφωνα από την Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης (ΓΣΕΣ) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.) στην υπ' αριθμό συνεδρίασή του, με αριθμό πρωτοκόλλου #....., σύμφωνα με τον Εσωτερικό Κανονισμό Λειτουργίας του Προγράμματος Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ.

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του ΤΒΒ του Π.Θ. (Λάρισα, 2014) στα πλαίσια της μερικής εκπλήρωσης των απαιτήσεων για την απόκτηση προπτυχιακού τίτλου σπουδών, όπως προβλέπεται από το Πρόγραμμα Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ. Έγινε υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας δρ Α.-Μ. Γ. Ψαρρά, κατά το θερινό εξάμηνο του έτους 2014 και αποτελεί ένα μέρος της έρευνας που πραγματοποιείται στο χώρο του εργαστηρίου του Τμήματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Φωτογραφία εξωφύλλου

HeLa National Institutes of Health (NIH) - National Institutes of Health (NIH)

Multiphoton fluorescence image of cultured HeLa cells with a fluorescent protein targeted to the Golgi apparatus (orange), microtubules (green) and counterstained for DNA (cyan). Nikon RTS2000MP custom laser scanning microscope.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας νιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμότατα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, δρ Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την αμέριστη προσοχή, τη συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές, τη συμπαράσταση και τη βοήθειά της, καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα ΤΒΒ, Γοργογιέτα Βύρωνα, που συνέβαλε στο μέγιστο για την εκπόνηση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

Αφιερώνεται στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
Abstract.....	11
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. Πυρηνικοί Υποδοχείς	12
1.2. Ο μηχανισμός δράσης των πυρηνικών υποδοχέων	15
1.3. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών.....	17
1.3.1. Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	17
1.3.2. Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	18
1.4. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	20
1.4.1. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.....	20
1.4.2. GR β ισομορφή-προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.....	22
1.4.3. Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GRα-A.....	22
1.4.4. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ως προϊόντα εναλλακτικής έναρξης της μεταγραφής.....	23
1.5. Μηχανισμοί δράσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών	25
1.6. Πολυμορφισμοί GR.....	28
1.7. Τα γλυκοκορτικοειδή.....	29
1.7.1. Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών	30
1.7.2. Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών.....	32
1.8. Τερπένια και τα τριτερπενοειδή	35
1.8.1. Οι λειτουργίες των στερολών και τριτερπενίων.....	37
1.9. Το Ολεανολικό οξύ και το Ουρσολικό οξύ	39
1.10. Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA).....	46
2. Σκοπός	49
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	50
3.1. Υλικά	50
3.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς	50
3.1.2. Διαλύματα.....	51
3.1.3. Οργανολογία.....	52
3.1.4. Αναλώσιμα	53

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
3.2.1. Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων.....	54
3.2.2. Απομόνωση pDNA από μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep)	54
3.2.3. Διαχείριση Κυτταροκαλλιέργειών.....	55
3.2.4. Απόψυξη κυττάρων	56
3.2.5. Καλλιέργεια κυττάρων HeLa	56
3.2.6. Θρυψινοποίηση κυττάρων.....	57
3.2.7. Ψύξη κυττάρων.....	57
3.2.8. Μέτρηση κυττάρων	58
3.2.9. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa.	58
3.2.10. Λύση κυττάρων	60
3.2.11. Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS	61
3.2.12. Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/ β -γαλακτοσιδάσης.....	61
3.2.13. Ανοσοκυτταροχημεία – Ανοσοιστοχημεία.....	64
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
4.1 Επιλογή συνθηκών διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων HeLa.	66
4.2. Επίδραση του Ολεανολικού οξέος (OA) στη ρύθμιση της δραστικότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) σε HeLa κύτταρα.....	67
4.3. Έλεγχος της επίδρασης του ολεανολικού οξέος (OA) και ουρσολικού οξέος στην ενεργοποίηση της υποκυτταρικής μετακίνησης του υποδοχέα GR με τη μέθοδο ανοσοκυτταροχημείας.....	68
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι μεταξύ άλλων ένας μεταγραφικός παράγοντας που συμμετέχει στη ρύθμιση ποικίλων βιολογικών διεργασιών ελέγχοντας την έκφραση αρκετών γονιδίων στόχων, μέσω της ενεργοποίησης του από τις αντίστοιχες ορμόνες προσδέτες, τα γλυκοκορτικοειδή (GCs). Μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται είναι η μεταγραφική ρύθμιση ενζύμων της γλυκονεογένεσης, μεταξύ αυτών και της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK). Ρύθμιση της δράσης του επιδέχεται και ο ίδιος με διάφορους μηχανισμούς, όπως την αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Τα GCs χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική συνήθως λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Ωστόσο, παρά την εξαιρετική αποτελεσματικότητά τους, σοβαρές παρενέργειες συχνά περιορίζουν τη χρήση αυτών των φαρμάκων. Η αναζήτηση για νέους ρυθμιστές της δράσης των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών με μειωμένες παρενέργειες έχει ενταθεί μετά την απόκτηση νέας γνώσης σχετικά με την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Αυτές οι νέες ουσίες μπορούν να ανοίξουν το δρόμο για νέες, πιο ασφαλείς θεραπείες, δεδομένου ότι διατηρούν την αποτελεσματικότητά τους ως προς την ενεργοποίηση των επιθυμητών δράσεων που επιτελούνται μέσω των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη της δράσης του ολεανολικού οξέος και του ουρσολικού οξέος σε καρκινικά κύτταρα HeLa για τη μελέτη της δραστηριότητάς τους μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και κατά συνέπεια την εν δυνάμει αντιφλεγμονώδους δράση τους. Τα δύο αυτά τριτερπένια έχουν παρόμοια μορφή με τις ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ίαση διαφόρων φλεγμονών και στη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών και των συμπτωμάτων τους. Κατανοώντας το μηχανισμό δράσης αυτών και ειδικότερα εξετάζοντας το πιθανότητα επίτευξης της δράσης τους μέσω ενεργοποίησης της μετα-μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα των GCs στα καρκινικά κύτταρα μπορούμε να συμβάλουμε στην μελέτη και αποτελεσματικότερη χρήση των ουσιών στην αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών.

Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε την επίδραση του ολεανολικού και του ουρσολικού οξέως επί της μετατόπισης του GR υποδοχέα στον πυρήνα και την

πιθανή ενεργοποίησή του σε κύτταρα HeLa. Δείξαμε ότι τόσο το ολεανολικό όσο και το ουρσολικό οξύ προκάλεσε πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα. Στην περίπτωση του ολεανολικού οξέος, η πιθανή ρυθμιστική δράση του στον μεταγραφικό έλεγχο του GR εξετάστηκε επίσης με τη δοκιμασία του γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης και δείξαμε ότι το ολεανολικό οξύ προκάλεσε αύξηση στην μεταγραφική ενεργοποίηση του GR μόνο παρουσία και της δεξαμεθαζόνης, ενός συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς.

Με βάση την προέλευση αυτών των ουσιών που είναι φυτική και μελετώντας περαιτέρω τη δράση τους μπορούμε να προάγουμε τη χρήση αυτών στη διατροφή των ασθενών και του γενικού πληθυσμού ή να εμπλουτίσουμε τρόφιμα με αυτές από τη στιγμή που έχουν ευεργετικές ιδιότητες με στόχο την βελτίωση της υγείας.

Abstract

The glucocorticoid receptor (GR) is a transcription factor involved in the regulation of various biological processes. The glucocorticoid receptor (GR) controls the expression of several target genes through the activation of the respective hormone ligands, glucocorticoids (GCs). One of the most important regulatory actions of GCs is the hormonal regulation of several gluconeogenic gene transcription. Such gene is the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene. The effects of GCs through their receptors are exerted by various mechanisms including interaction of GR with other transcription factors.

The GCs are commonly used because of its strong anti-inflammatory action. Despite the excellent efficacy, side effects often limit the use of these drugs. Research on the characterization of the molecular mechanisms, that regulate the activity of the glucocorticoid receptor, and the discovery of new modulators of glucocorticoids receptors, may contribute to the elimination of the side effects. These new substances may pave the way for new, safer treatments that maintain their effectiveness for desired actions. In this work we studied the action of oleanolic and ursolic acid as putative regulators of glucocorticoid receptor actions in HeLa cancer cells. These two triterpenoids have a similar chemical structure to steroid hormones, substances commonly used in the cure of various inflammatory and autoimmune diseases. Understanding the molecular mechanisms of actions of these molecules may contribute to their use and application to the treatment of many diseases. Thus in this study we examined the effect of oleanolic and ursolic acid on the nuclear GR translocation and thus the possible GR activation in HeLa cells. We showed that both oleanolic and ursolic acid caused nuclear translocation of the receptor. In the case of oleanolic acid, the possible regulatory action of oleanolic acid on the transcriptional control of GR was also examined by luciferase reporter gene assay. We showed that oleanolic acid caused increase in the transcriptional activation of GR only in the presence of dexamethasone, a synthetic glucocorticoid compound.

Furthermore, the origin of these substances is herbal and at the same time studying their actions can promote their usage on a diet to a variety of different patients and also to the general public. Another option is to enrich foods with them once they have beneficial properties in order to improve health.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Πυρηνικοί Υποδοχείς

Μέχρι το 1990 ένα σύνολο 15 μελών της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων είχαν αναγνωρισθεί ως υποδοχείς όλων των γνωστών λιποδιαλυτών ορμονών. Σήμερα γνωρίζουμε πάνω από 150 διαφορετικά μέλη της οικογένειας τα οποία εντοπίζονται σε όλους τους ζωικούς οργανισμούς.

Οι κατηγορίες στις οποίες χωρίζεται η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων βασίζονται στο διαμερισμό τους και στις ιδιότητες πρόσδεσης στο DNA είναι οι ακόλουθες (Mangelsdorf DJ et al., 1995).

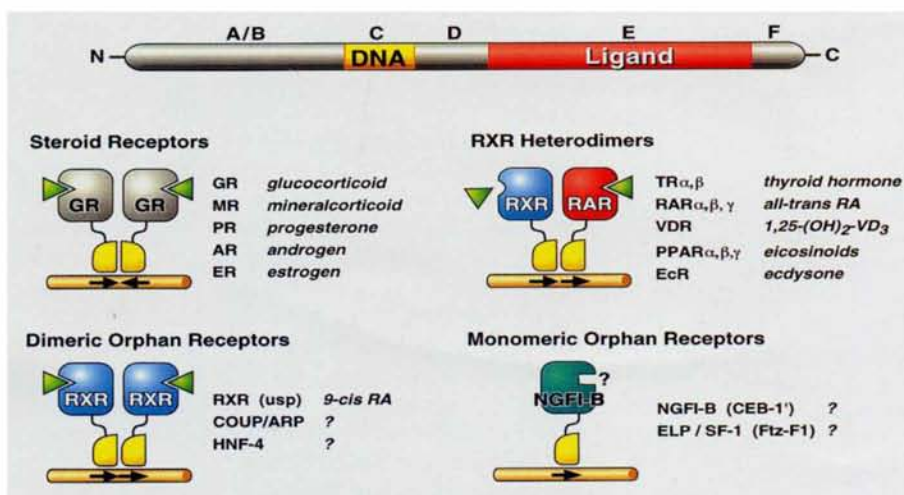
A) Η κατηγορία των κλασσικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών όπως τα γλυκοκορτικοειδή (GR), τα οιστρογόνα (ER), η προγεστερόνη (PR) κ.α. ενεργοποιούνται από τον προσδέτη τους στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα όπου προσδένονται στο DNA με τη μορφή ομοδιμερών.

B) Η κατηγορία των υποδοχέων του θυρεοειδικών ορμονών (TR), του ρετινοϊκού οξέως (RAR), της βιταμίνης D (VDR), του peroxisome proliferator – activated receptor (PPAR), της εκδυσόνης (EcR) κ.α.. Οι οποίοι προσδένονται στο DNA με μορφή ετεροδιμερών. Σημειώνουμε ότι με εξαίρεση τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, η κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνει τους υπόλοιπους γνωστούς προσδετο-εξαρτώμενους υποδοχείς.

Γ) Η κατηγορία των «ορφανών» υποδοχέων που προσδένονται κυρίως σε ευθείες επαναλήψεις στο DNA με τη μορφή ομοδιμερών μετά την πρόσδεση σε αυτούς προσδέτη, του οποίου η ταυτότητα δεν έχει μέχρι σήμερα καθοριστεί.

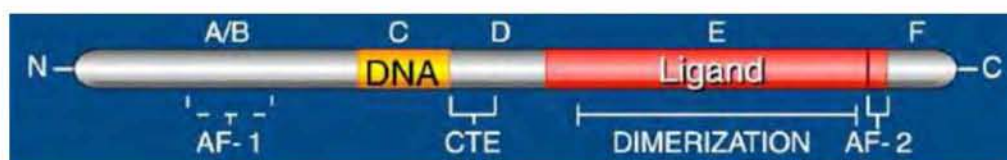
Δ) Η κατηγορία αυτή των «ορφανών» υποδοχέων προσδένει σε εκτεταμένες περιοχές του DNA με τη μορφή μονομερών μετά την πρόσδεση σε αυτούς προσδέτη, του οποίου η ταυτότητα δεν έχει μέχρι σήμερα καθοριστεί.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι περισσότεροι από τους “ορφανούς” υποδοχείς ανήκουν στην 3η και 4η κατηγορία πυρηνικών υποδοχέων, όπως φαίνεται και στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 1.1. Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες ανάλογα με τον προσδέτη τους, την πρόσδεση στο DNA και την ιδιότητα του διμερισμού τους (Mangelsdorf et al., 1995).

Όλοι οι παραπάνω υποδοχείς παρουσιάζουν σημαντικές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Οι επιμέρους δομικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων είναι οι ακόλουθες:



Εικόνα 1.2. Οι επιμέρους δομικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων (Aranda et al., 2001).

Το αμινοτελικό άκρο των πυρηνικών υποδοχέων είναι η περιοχή A/B και συχνά καλείται «ρυθμιστική περιοχή». Η επικράτεια αυτή περιέχει την περιοχή AF-1 με ιδιότητα την trans-ενεργοποίηση, που είναι ανεξάρτητη από την παρουσία προσδέματος. Η περιοχή A/B αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο (-NH₂) της πρωτεΐνης και έχει τη μικρότερη ομολογία μεταξύ των μελών της υπερικογένειας. Οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδένονται είτε στα στοιχεία απόκρισης, είτε στους υποκινητές των γονιδίων στόχων τους μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA (DBD, DNA Binding Domain) ή C περιοχή. Στα μέλη της υπερικογένειας των

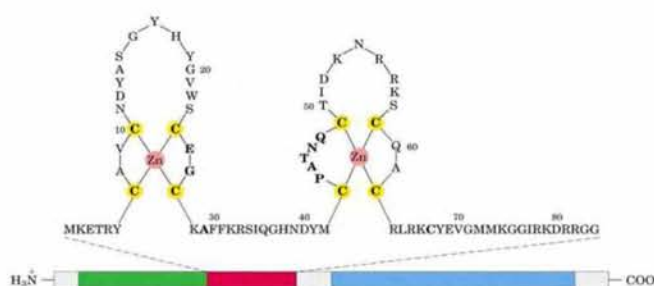
πυρηνικών υποδοχέων, η DBD αποτελείται από ένα εξαιρετικά συντηρημένο ‘‘πυρήνα’’ (core DBD) και από μία ποικίλλουσα-μη συντηρημένη καρβοξύ-τελική επέκταση της DBD (Carboxy-Terminal (CTE) extension of DBD) περίπου 30-40 αμινοξέων. Τα μοτίβα των δακτύλων ψευδαργύρου της DBD επικράτειας έχουν την εξής αλληλουχία: Cys-X2-Cys-Xi3-Cys-X2-Cys ή για συντομία C2C2 μιας και η θέση πρόσδεσης του ψευδαργύρου δημιουργείται από τέσσερις κυστεΐνες. Ο πρώτος δάκτυλος ψευδαργύρου περιέχει την αλληλουχία P- box, δομής α-έλικας που είναι υπεύθυνη για την υψηλής συγγένειας αναγνώριση και πρόσδεση του υποδοχέα στην ημιθέση του στοιχείου απόκρισης. Στο δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου, εντοπίζεται το D-box, το οποίο έχει δομή επίσης α-έλικας, και εκτείνεται κάθετα στην α-έλικα του P-box και είναι υπεύθυνο για τον διμερισμό του υποδοχέα αλλά και για τον καθορισμό της πρόσδεσης σε σχέση με την απόσταση μεταξύ των ημιθέσεων του στοιχείου απόκρισης.

Από την άλλη η CTE αποτελείται από δύο επιμέρους δομικά στοιχεία: Το <<T box>> που είναι ένας βρόγχος που συνδέει την core DBD με το «A-box», το οποίο και σχηματίζει μια α-έλικα (Rastinejad et al., 1995). Ενώ τα αμινοξέα στο «A-box» εμπλέκονται κυρίως στο σχηματισμό ειδικών συνδέσεων με το εκάστοτε στοιχείο απόκρισης, το «T-box» έχει διαφορετικές λειτουργίες, όπως η ειδική αναγνώριση ζευγών βάσεων, η διαμόρφωση της επιφάνειας του διμερούς καθώς και η υποστήριξη του κατάλληλου προσανατολισμού της α-έλικας του «A-box». Αμέσως παρακείμενα της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA βρίσκεται η hinge περιοχή ή περιοχή D. Η λειτουργία της περιοχής αυτής δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η D περιοχή προσδίδει ελαστικότητα στον υποδοχέα, επιτρέποντας του αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του κατά την δέσμευση του προσδέματος. Η αλληλουχία της επικράτειας πρόσδεσης του προσδέματος (LBD, Ligand Binding Domain) ή E/F περιοχή ποικίλει πολύ ανάμεσα στους πυρηνικούς υποδοχείς, αλλά όλοι μοιράζονται μια κοινή δομή α-ελίκων, οργανωμένων γύρω από ένα υδροφοβικό θυλάκιο πρόσδεσης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του θυλακίου προσδίδουν ειδικότητα στον υποδοχέα, καθορίζοντας αν η LBD θα δεχτεί στεροειδείς ορμόνες, ρετινοειδή ή ξενοβιοτικά προσδέματα που επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του υποδοχέα. Η εξαρτώμενη από το πρόσδεμα ενεργοποίηση του υποδοχέα απαιτεί την παρουσία της AF-2 περιοχής ενεργοποίησης, που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του πυρηνικού υποδοχέα. Η LBD επίσης περιέχει πληροφορίες για τον διμερισμό, για την

εγκατάσταση του υποδοχέα στον πυρήνα και θέσεις για αλληλεπίδραση με heat shock πρωτεΐνες, συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Wurtz et al., 1996).

1.2. Ο μηχανισμός δράσης των πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών μπορούν να δράσουν με δύο τρόπους ανάλογα με την κατηγορία στην οποία αυτοί κατατάσσονται (Smirnov, A.N. 2002). Ο πρώτος μηχανισμός δράσης ασκείται από τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και ο δεύτερος από τους υποδοχείς των ρετινοειδών, των θυρεοειδών και της βιταμίνης D. Απουσία του κατάλληλου προσδέματος, οι στεροειδικοί, μεταγραφικά μη ενεργοί υποδοχείς MR, PR, GR, AR και ER σχηματίζουν μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα με heat shock πρωτεΐνες (HSP-90,-70), FKBP52/51 και άλλες πρωτεΐνες τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις υπό εξέταση συνθήκες. Γενικά όμως το ισχύον κεντρικό δόγμα υποστηρίζει ότι οι στεροειδικοί υποδοχείς απουσία προσδέματος βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη δέσμευση του κατάλληλου προσδέματος επάγεται διακριτή αλλαγή στην στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα που πυροδοτεί την έναρξη σηματοδότησης. Στην περίπτωση των στεροειδών ορμονών η δέσμευση του προσδέματος επάγει την αποδέσμευση των HSP και απελευθερώνει έναν μονομερή υποδοχέα από το σύμπλοκο (Tsai et al., 1994; Aranda et al., 2001)



Εικόνα 1.3. Η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA. Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου εισέρχονται μέσα στη μεγάλη αλάκα του DNA (Aranda et al., 2001).

Από την άλλη μεριά, οι υποδοχείς TR, RAR και VDR δεν αλληλεπιδρούν με HSP και εντοπίζονται στον πυρήνα απουσία προσδέματος. Μερικοί υποδοχείς αυτής της κατηγορίας, απουσία προσδέματος, μπορούν να αλληλεπιδρούν με το DNA δρώντας ως μεταγραφικοί καταστολείς. Αυτό ενδεχομένως επιτυγχάνεται μέσω

αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες συγκαταστολείς. Εξάιρεση αποτελεί ο υποδοχέας CAR (Constitutively Active Receptor) που απουσία προσδέματος είναι μεταγραφικά ενεργός. Αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα κατά τη δέσμευση του προσδέματος, επιτυγχάνεται και σε αυτή την κατηγορία υποδοχέων, υποδεικνύοντας ότι οι αλλαγές στο σχήμα του υποδοχέα που επάγεται από τα προσδέματα είναι σημείο «κλειδί» για την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών (J.P. Vanden Heuvel, 2009).

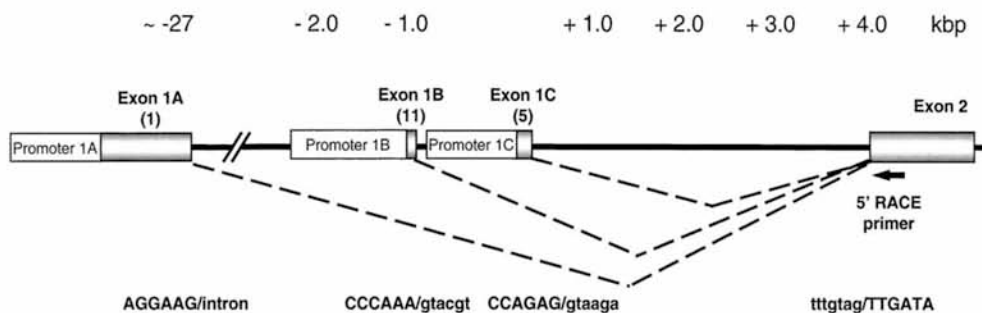
Οι πυρηνικοί υποδοχείς, ως μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων τους και για το σκοπό αυτό μπορούν να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες συν-εργοποιητές ή συγκαταστολείς, για να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν αντίστοιχα τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι πρωτεΐνες συνενεργοποιητές διακρίνονται σε δύο μεγάλες κλάσεις. Στην πρώτη κλάση ανήκει η οικογένεια του switch/sucrose non-fermental (SWI/SNF) συμπλόκου πρωτεϊνών και στην άλλη κλάση οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών αλληλεπιδρούν με την LBD αρκετών πυρηνικών υποδοχέων και οι πιο χαρακτηρισμένοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι οι πρωτεΐνες p160, p300, CREB, CBP και PCAF.

Οι πρωτεΐνες και των δύο κλάσεων έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το περιβάλλον της χρωματίνης, διευκολύνοντας τη μεταγραφική μηχανή. Με ανάλογο, αλλά αντίθετο λειτουργικά τρόπο, δρουν οι πρωτεΐνες συγκαταστολείς των πυρηνικών υποδοχέων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι NCoR (Nuclear hormone Receptor Corepressors) και οι SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors) (Evans et al., 1995). Όπως οι συνενεργοποιητές, έτσι και οι συγκαταστολείς προκαλούν αλλαγές στην χρωματινική δομή, επιστρατεύοντας αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs) γειτονικά των υποδοχέων. Οι NCoR και SMRT συγκαταστολείς αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς TR και RAR απουσία προσδέματος κατά τον ετεροδιμερισμό τους με τον υποδοχέα RXR. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια συγκεκριμένη περιοχή γνωστή ως CoR box που βρίσκεται στην hinge περιοχή των πυρηνικών υποδοχέων είναι βασική για την αλληλεπίδραση με τους συγκαταστολείς. Οι πρωτεΐνες NCoR και SMRT βρίσκονται οργανωμένες σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα των οποίων μέλη αποτελούν και οι παράγοντες SIN3, οι οποίοι λειτουργούν ως ενδιάμεσοι μεταξύ αποακετυλασών των ιστονών και υποδοχέων.

1.3. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

1.3.1. Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το cDNA του hGR κλωνοποιήθηκε το 1985 (Gehring et al., 1985; Hollenberg et al., 1985) και αργότερα χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q31-32 (Theriault et al., 1989). Μέχρι και σήμερα, έχει βρεθεί μόνο ένα γονίδιο για τον GR (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4. Αναπαρίσταται η δομή και η οργάνωση του γονιδίου του GR. (Breslin et al., 2001).

Η ανάλυση της γενωμικής δομής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών αποκάλυψε την παρουσία 9 εξονίων, καλύπτοντας μια περιοχή των 110 kb. Τα 184 nts του εξονίου 1 αντιπροσωπεύουν αποκλειστικά την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Το εξόνιο 2 (1197 bps) κωδικεύει το μεγαλύτερο μέρος του NH₂-τελικού άκρου (NTD) του υποδοχέα, συμπεριλαμβανομένης της ιδιόσυστατης AF-1 περιοχής που χρησιμεύει για trans-ενεργοποίηση.

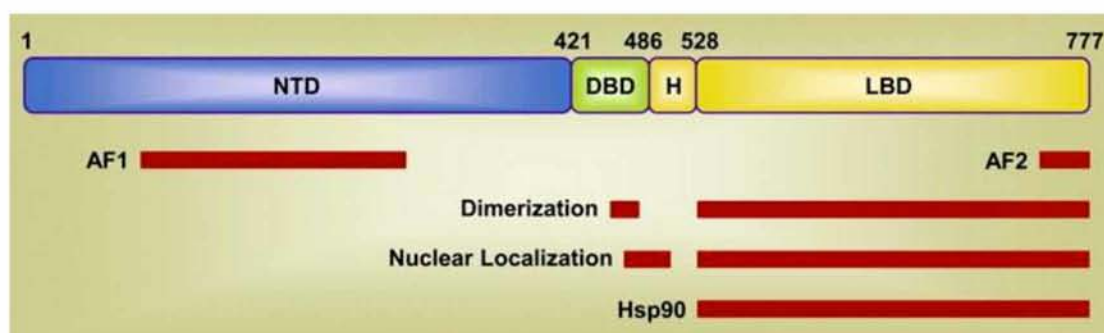
Τα δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA κωδικεύονται χωριστά από το εξόνιο 3 (167 bps) και το εξόνιο 4 (117 bps). Πέντε εξόνια (εξόνια 5, 6, 7, 8, 9α ή 9β) μαζί αποτελούν την περιοχή δέσμευσης του προσδέματος και την προσδετο-εξαρτώμενη περιοχή AF-2, καθώς επίσης και τις 3'-αμετάφραστες περιοχές.

Η ανάλυση των υποκινητών του γονιδίου του GR αποκάλυψε μία σαφή έλλειψη ενός πλαισίου TATA και την παρουσία ενός μοτίβου CCAAT στην 5'-πλευρική περιοχή. Παράλληλα, έχουν προσδιοριστεί πολλαπλά GC πλαίσια, AP-1, AP-2, Sp1, στοιχεία αποκρινόμενα στο c-AMP (CRE), Yin Yang1 (YY1), NF-κB και διάφορες ιστο-ειδικές περιοχές σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Ως εξ αυτών,

επιβεβαιώνεται η άποψη ότι ο GR εκφράζεται μεν σταθερά σε κάθε κυτταρικό τύπο, αλλά με ένα ιστο-ειδικό πρότυπο.

1.3.2. Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Όπως κάθε μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ο GR είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που συνίσταται από (Εικόνα 1.5): μία N-τελική δομική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal transactivation domain, NTD), μία κεντρική δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) και μία C-τελική δομική περιοχή δέσμευσης προσδέτη (ligand-binding domain, LBD) (Kumar and Thompson, 2005). Μια εύκαμπτη περιοχή του μορίου, αποκαλούμενη ως περιοχή «άρθρωσης», διαχωρίζει τις πρωτεϊνικές επικράτειες DBD και LBD.



Εικόνα 1.5. Ο GR συνίσταται από ένα αμινοτελικό άκρο (NTD), μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), την περιοχή άρθρωσης (hinge region ή H) και μία πρωτεϊνική επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Επισημαίνονται επίσης οι περιοχές που σχετίζονται με τη μεταγραφική ενεργότητα (AF1 και AF2), καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με το διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό και τη δέσμευση της πρωτεΐνης συνοδού HSP90. Οι αριθμοί των θέσεων αναφέρονται στην πρωτεϊνική αλληλουχία του ανθρώπινου GR. (Oakley and Cidlowski, 2011).

Η περιοχή DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της υπερικογένειας και διαθέτει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου τα οποία αναγνωρίζουν και δένουν σε αλληλουχίες των DNA-στόχων, τις αποκαλούμενες GREs.

Η NTD περιοχή διαθέτει μία ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-1) η οποία προσδένεται σε διάφορους συν-ρυθμιστές και συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Αλληλουχίες στην περιοχή NTD είναι πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πυρηνική τοποθέτηση του υποδοχέα, στην έξοδο από τον πυρήνα, ή/και στη διατήρηση του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα.

Η περιοχή LBD αποτελείται από 12 α-έλικες και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, δημιουργώντας ένα υδροφοβικό θυλάκιο για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών (Bledsoe et al., 2002). Μια δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης (AF-2) η οποία αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές κατά ένα προσδετο-εξαρτώμενο τρόπο εντοπίζεται στην περιοχή LBD. Δύο σήματα πυρηνικής τοποθέτησης, τα NL1 και NL2, βρίσκονται στο μεταίχμιο της σύνδεσης των περιοχών DBD/hinge και εντός του LBD αντίστοιχα.

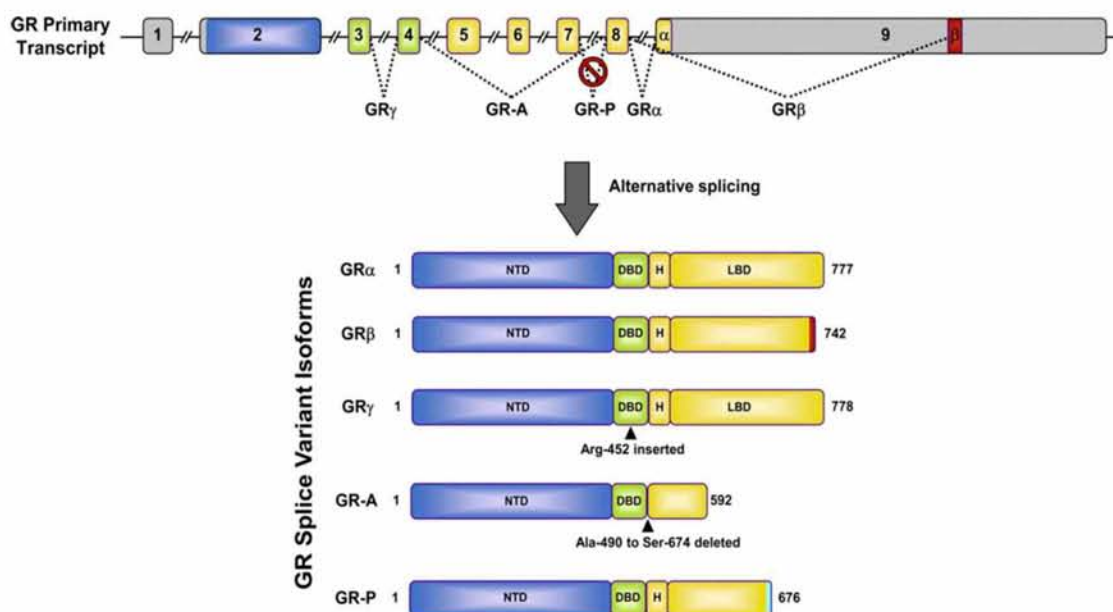
1.4. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

1.4.1. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα

Οι περισσότερες λειτουργίες των γλυκοκορτικοειδών ορμονών πραγματοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Το γονίδιο για τον GR κωδικοποιεί πρωταρχικά μια πρωτεΐνη των 777 αα σε μήκος, ωστόσο είναι δυνατό να υπόκειται και σε εναλλακτική επεξεργασία ματίσματος με αποτέλεσμα να προκύπτουν λειτουργικά διακριτοί υπότυποι του GR (ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος). Οι ισομορφές του υποδοχέα μπορούν να επιδέχονται με τη σειρά τους μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω την ενεργότητα των υποδοχέων.

Το πρότυπο έκφρασης του GR δείχνει ότι ο υποδοχέας διανέμεται ευρέως σε όλα τα όργανα, αλλά είναι πιο επικρατής στο ήπαρ, στο νευρικό σύστημα και στους μυϊκούς ιστούς. Βέβαια, ανεξάρτητα από την ευρεία έκφραση του GR, η κυτταρική ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή είναι πολυσύνθετη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (Oakley and Cidlowski, 2011). Η ευαισθησία και η ειδικότητα της απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να προσδιοριστεί στο σύνολό της με ένα συνδυασμό της συμπληρωματικής έκφρασης και της σύνθετης δράσης κάθε ισομορφής του GR.

Η ικανότητα του κυττάρου να δημιουργεί τόσες πολλές isoμορφές του GR, με την καθεμία να ελέγχει κατά εξειδικευμένο τρόπο διαφορετικές ομάδες γονιδίων ή/και να ρυθμίζει διαφορεικά κοινές ομάδες γονιδίων προσδίδει τεράστιο δυναμικό για ποικίλη σηματοδότηση. Επιπλέον, η δυνατότητα των isoμορφών αυτών να ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους και να επικοινωνούν με άλλα σηματοδοτικά μόρια συνεισφέρει περαιτέρω στις ιστο- και κυτταρο-ειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα 1.6. Isoμορφές του GR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.

Το κύριο μετάγραφο του ανθρώπινου GR αποτελείται από συνολικά 9 εξόνια, με το εξόνιο 2 να κωδικοποιεί τις αμινοτελικές περιοχές (NTD), τα εξόνια 3 και 4 να κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και τα εξόνια 5-9 να κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης (H) και την περιοχή σύνδεσης προσδέτη (LBD).

Η πρωτεΐνη του κλασσικού GRα προκύπτει από το μάτισμα του εξονίου 8 στην αρχή του εξονίου 9. Ο GRβ προκύπτει από ένα εναλλακτικό μάτισμα, όπου το τελικό τμήμα του εξονίου 8 συρράπτεται με καθοδικές αλληλουχίες του εξονίου 9 και διαθέτει μια μοναδική περιοχή 15 αμινοξέων στο C-τελικό του άκρο (θέσεις 728-742).

Οι ειδικές αλληλουχίες για τον GRα (αμινοξέα 726-777) κωδικοποιούν για τις έλικες 11 και 12 του LBD, μία κρίσιμη περιοχή όχι μόνο για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών, αλλά και για τη στρατολόγηση συν-ρυθμιστών στην περιοχή AF2.

Ο GRγ χαρακτηρίζεται από μια ένθεση αμινοξέος αργινίνης (Arg452) ανάμεσα στους δύο δάκτυλους ψευδαργύρου της περιοχής DBD.

Ο GR-A παράγεται από ένα εναλλακτικό μάτισμα που συρράπτει το εξόνιο 4 με το εξόνιο 8, διαγράφοντας περίπου 185 αμινοξέα της περιοχής LBD (Ala490-Ser674) που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 5-7. Ο GR-P σχηματίζεται από την αποτυχία συρραφής του εξονίου 7 στο εξόνιο 8. Οι ιντρονικές αλληλουχίες που παραμένουν εισαγάγουν ένα κωδικόνιο τερματισμού, οδηγώντας σε ένα μεταλλαγμένο υποδοχέα που υπολείπεται το ακραίο μισό της περιοχής LBD.

(Oakley and Cidlowski, 2011).

1.4.2. GR β ισομορφή-προϊόν εναλλακτικού ματίσματος

Όπως προαναφέρθηκε, το ανθρώπινο γονίδιο του GR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q31–32 και αποτελείται από 9 εξόνια (Bamberger et al., 1995; Oakley et al., 1996). Εναλλακτικό μάτισμα κοντά στην ακρινή περιοχή του πρωτογενούς μεταγράφου δημιουργεί τις δύο κύριες ισομορφές του υποδοχέα, τις GRα και GRβ, οι οποίες διαφέρουν στο C-τελικό τους άκρο (Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006; Kino et al., 2009). Η GRβ ισομορφή είναι μεταγραφικά μη ενεργή. Η βιολογική της δράση δεν είναι έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι δρα ανταγωνιστικά έναντι της GRα ισομορφής μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερών GRα/GRβ (Oakley and Cidlowski, 2011; Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006).

1.4.3. Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GRα-A

Η κλασσική πρωτεΐνη του GRα προέρχεται από την ένωση του τελικού άκρου του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9.

Όπως προαναφέρθηκε, βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 έδειξαν ότι ο GRα, όπως και οι περισσότεροι NRs, είναι οργανωμένος σε δομικές μονάδες και αποτελείται από τρεις κύριες δομικές περιοχές (Giguère et al., 1986; Carlstedt-Duke et al., 1987; Picard & Yamamoto, 1987). Κάθε μία από αυτές τις περιοχές εκτελεί μια ξεχωριστή λειτουργία σχετικά με τη ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων και σε ό,τι αφορά τις μεταγραφικές δραστηριότητες του GRα.

Έτσι και στην περίπτωση του GRα, η NH₂-τελική περιοχή των GRs (κατά προσέγγιση τα αμινοξέα 1-417) διαθέτει τη λειτουργία 1 ενεργοποίησης (AF-1), δραστηριότητα που διέπει ένα σημαντικό μεταγραφικό ρόλο και αποτελεί στόχο διάφορων πρωτεϊνών αλληλεπίδρασης και κινασών (Hittelman et al., 1999).

Τα αμινοξέα 418-487 αποτελούν την DNA προσδένουσα περιοχή (DBD) του GRα. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι αναδιπλώνεται σε μια διαμόρφωση τύπου δακτύλων ψευδαργύρου που χρησιμεύει στην άμεση ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA (Luisi et al., 1991). Επιπλέον,

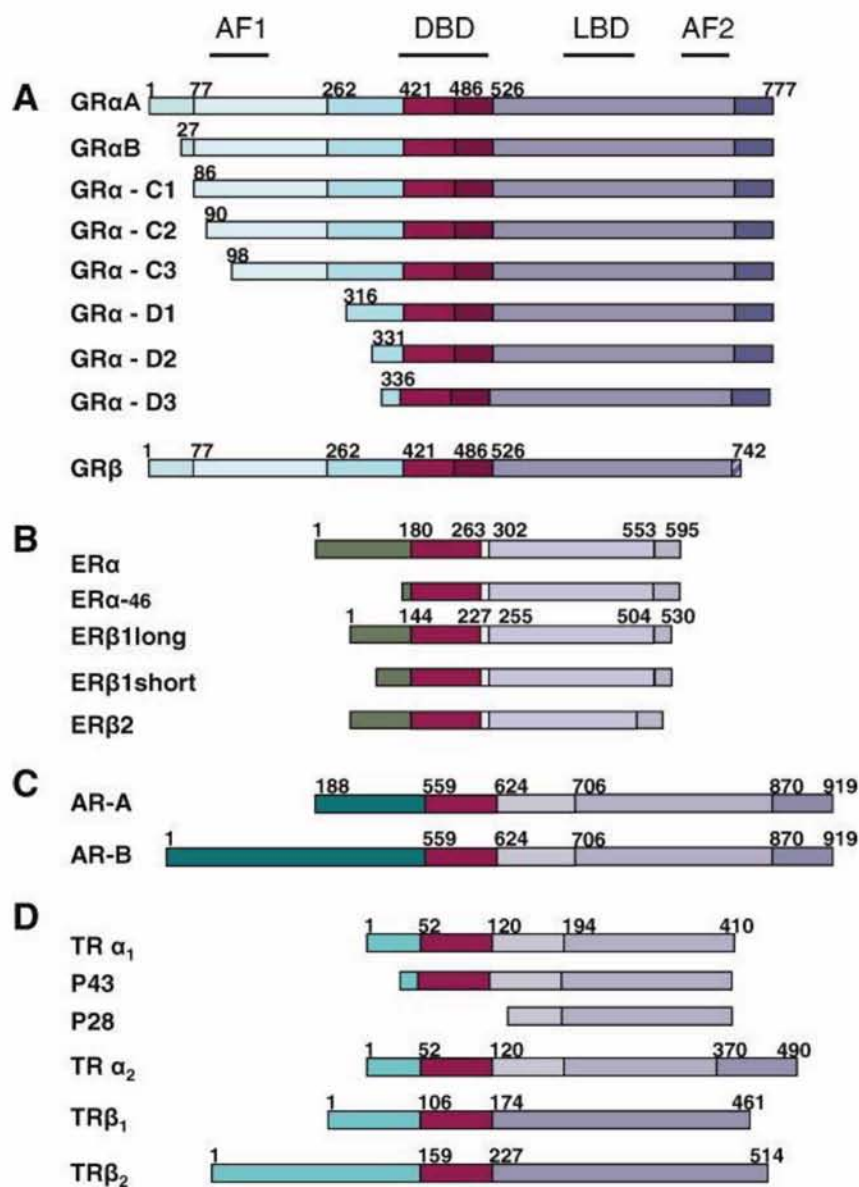
διαμορφώνεται μια καλά καθορισμένη μεσόφαση διμερούς, δεδομένου ότι δύο υπομονάδες DBD δεσμεύουν την έλικα του DNA στις παρακείμενες μείζονες αύλακες.

Μετά από μια σύντομη έκταση της ακολουθίας (κατά προσέγγιση τα αμινοξέα 488-520) γνωστή ως περιοχή “αρθρώσεων”, το C-τελικό άκρο του GRα (αμινοξέα 521-777) περιέχει μια αναδιπλωμένη μονάδα που διατηρεί την ικανότητα να δεσμεύει τα προσδεδεμένα μόρια. Αυτή η περιοχή αναφέρεται ως περιοχή δεσμεύσεως του προσδέτη (LBD).

Εκτός από τα προκείμενα τρία σημαντικά δομικά μοτίβα, προσδιορίζονται επίσης τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού NLS, τα οποία εγκλείονται στις δύο περιοχές DBD και LBD.

1.4.4. Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ως προϊόντα εναλλακτικής έναρξης της μεταγραφής

Ο κατάλογος των ισομορφών του υποδοχέα αυξάνεται με την προσθήκη των μορίων υποδοχέα που παράγονται από το εναλλακτικό σημείο έναρξης της μετάφρασης του μηνύματος (Lu et al., 2005; Russcher et al., 2007) (Σχήμα 1) και με την μετα-μεταφραστική τροποποίηση των πρωτεϊνών φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, ουβικιτινίωσης, και με SUMΟλίωσης (Small Ubiquitin-like Modifier ή SUMO) (Faus and Haendler, 2006; Leader et al., 2006). Ο ρόλος αυτών των διαφόρων ισομορφών αρχίζει τώρα να αποκαλύπτεται σε σχέση με την αύξηση των δυνατοτήτων ρύθμισης και της εξειδίκευσης της μεταγραφής (Lu and Cidlowski, 2006). Στο σχήμα 1^A απεικονίζονται οι δύο κύριες ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ο GRα και ο GRβ, οι οποίοι όπως προαναφέρθηκε έχουν ανιχνευθεί ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος (Bamberger et al., 1995; Duma et al., 2006) (Σχ.1 A). Ο GRα ή ο GRβ mRNA παράγει επιπλέον ισομορφές με εναλλακτικά σημεία έναρξης σε επτά εσωτερικές θέσεις AUG (Lu et al., 2005). Οι οκτώ GRα ισομορφές έχουν ανιχνευθεί. Όλοι είναι λειτουργικοί υποδοχείς, καθώς διαθέτουν ανέπαφη την LBD περιοχή και καταδεικνύουν τις διαφορές στα χαρακτηριστικά της LBD, στην κατανομή ιστού και στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 1.7. Δομικά χαρακτηριστικά των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (A), των οιστρογόνων (B), των ανδρογόνων (C) και της θυρεοειδούς ορμόνης (D). (Kino et al., 2005; Scheller et al., 2003; Lu et al., 2005; Russcher et al., 2007; Bamberger et al., 1995; Duma et al., 2006, Heldring et al., 2007; Dehm et al., 2007; Jagla et al., 2007; Lazar, 1993; Brent, 1994; Wrutniak et al., 1995)

1.5. Μηχανισμοί δράσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών

Η αλληλεπίδραση του GR με το DNA είναι ιδιαίτερα δυναμική. Μία κυκλική διαδικασία μεταξύ του δεσμευμένου GR και του μη δεσμευμένου που διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα (McNally et al., 2000).

Μόλις συνδεθεί με τα GRE, ο υποδοχέας υφίσταται πρόσθετες αλλαγές διαμόρφωσης που οδηγούν στην πρόσληψη χρωματίνης και στη δημιουργία αναδιαμορφωμένου συμπλόκου που καθορίζει τη μεταγραφή γονιδίου με βάση τη δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II (Jenkins et al., 2001; Lonard and O'Malley, 2005; Rosenfeld and Glass, 2001). Στη συνέχεια περιγράφονται οι μηχανισμοί δράσης των γλυκοκορτικοειδών, που μεσολαβούνται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους:

A) Η πρόσδεση του GR με τα GRE μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση είτε σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων στόχων.

B) Οι GR μπορούν επίσης να ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων με φυσική αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες μεταγραφής.

Η αλληλεπίδραση του GR με συγκεκριμένα μέλη του καταρράκτη μεταγωγής σήματος και του μηχανισμού ενεργοποίησης της μεταγραφής, είτε χωρίς πρόσδεση ή σε συνδυασμό με πρόσδεση σε GRE, έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη μεταγραφή των ανταποκρινόμενων γονιδίων (Rogatsky and Ivashkiv, 2006).

Η αλληλεπίδραση του GR με τους προφλεγμονώδεις παράγοντες μεταγραφής, της activator protein 1 (AP1) και πυρηνικού παράγοντα kB (NF-kB) ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα τους και θεωρείται ότι είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή. Ο GR συνδέεται άμεσα με την υπομονάδα Jun του AP1 και την υπομονάδα p65 του NF-kB και παρεμβαίνει στην καταστολή της από τους μεταγραφικούς παράγοντες επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφής (Nissen and Yamamoto 2000; Yang-Yen et al., 1990).

Έτσι για ορισμένα γονίδια, η καταστολή επιτυγχάνεται από την ίδια την πρόσδεση του GR στις πρωτεΐνες δέσμευσης του DNA, χωρίς ο ίδιος να αλληλεπιδρά

άμεσα με το DNA. Για άλλα γονίδια, ωστόσο, οι λειτουργίες του GR είναι περίπλοκες, για παράδειγμα είναι άμεσα δεσμευμένος σε ένα GRE και συνδέεται με AP1 ή NF-κB σε μία γειτονική τοποθεσία στο DNA. Η GR-εξαρτώμενη πρόσληψη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών αλληλεπιδρώντας με την protein 1, ένας μεταγραφικός συνεργός ρυθμιστής της οικογένειας P160, είναι σημαντική για την παρούσα αναστολή (Chinenov et al., 2012).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη έρευνα, σύμφωνα με την οποία οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαφέρουν κατά φύλο. Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν ένα μεγάλο αριθμό φλεγμονωδών γονιδίων και προκαλούν μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη απόκριση στους αρσενικούς σε σύγκριση με τους θηλυκούς αρουραίους. Το φυλο-ειδικό προφίλ έκφρασης των συν-ρυθμιστικών μορίων μπορεί να αποτελεί τη βάση του σεξουαλικού διμορφισμού, διαφοροποιώντας την κατασταλτική δράση του GR στο AP1 και NF-κB. Οι φυλο-ειδικές διαφορές στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών δεν παρέχουν μόνο μια βάση για την προδιάθεση των θηλυκών σε αυτοάνοσες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος, αλλά δείχνουν ότι οι θεραπευτικές δόσεις γλυκοκορτικοειδών θα πρέπει να είναι ρυθμίζονται ανάλογα με το φύλο του ασθενούς (Duma et al., 2010).

Γ) Μη γενωμικές – γρήγορες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Παρά το γεγονός ότι οι κύριες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών επιτελούνται σε λίγα λεπτά έως ώρες, μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες αρκετά στοιχεία δείχνουν ότι οι GR υποδοχείς μπορούν επίσης να ενεργούν μέσω μη γονιδιωματικών μηχανισμών και πραγματοποιούνται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα έως λεπτά, χωρίς να απαιτούνται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων (Groeneweg et al., 2012; Samarasinghe et al., 2012).

Πολύπλοκοι μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτά τα γεγονότα σηματοδότησης που τελικά φαίνονται να συνομιλούν με την ενεργοποίηση διαφόρων κινασών, όπως κινάσης του 3-φωσφοϊνοσιτιδίου, Akt1, και mitogen-activated protein κινάση (MAPKs). Για παράδειγμα, η από γλυκοκορτικοειδή εξαρτώμενη απελευθέρωση των βοηθητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με ασύνδετο GR στο κυτταρόπλασμα, όπως η nonreceptor κινάση της τυροσίνης c-Src, μπορεί να

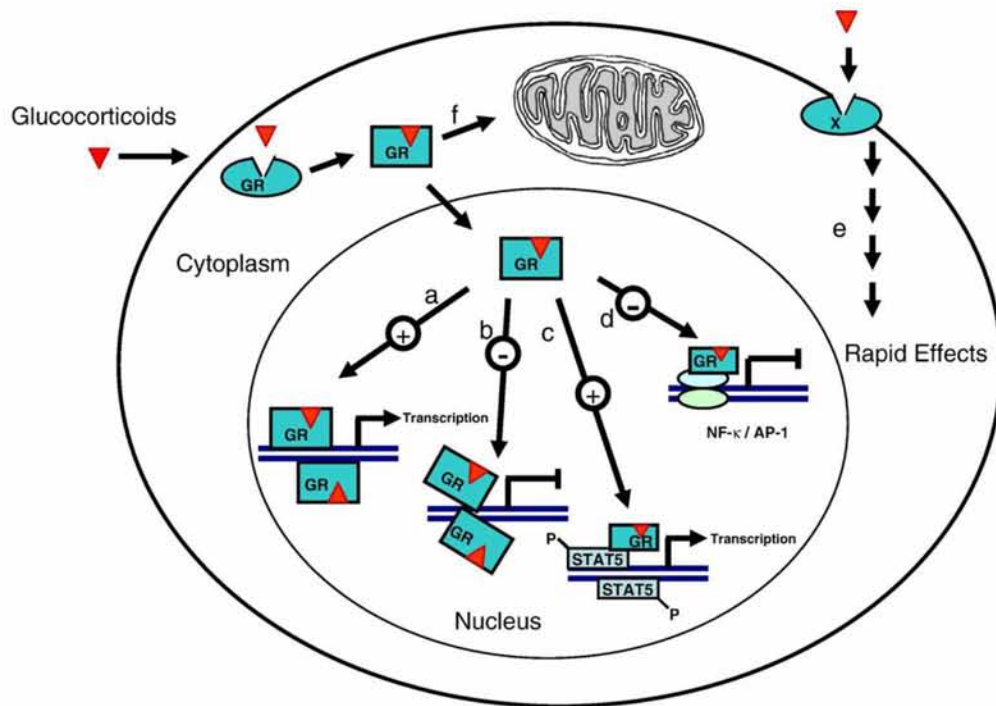
μεσολαβήσει σε μη γονιδιωματικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Όταν απελευθερώνεται από το σύμπλοκο GR, η c-Src κινάση ενεργοποιεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων που οδηγεί στην φωσφορυλίωση της αννεξίνης 1, την αναστολή της δραστηριότητας της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A2 και στη μειωμένη απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (Croxtall et al., 2000; Solito et al., 2003).

Ο υποδοχέας GR έχει επίσης αναφερθεί να εντοπίζεται στη μεμβράνη πλάσματος σε μικροσπηλαία μέσω μιας αλληλεπίδρασης με caveolin 1 (Matthews et al., 2008).

Η από γλυκοκορτικοειδή ενεργοποίηση του μεμβρανικού GR ρυθμίζει την επικοινωνία εξωκυτταρικών σημάτων με τον μεσοκυττάριο χώρο όπως του πολλαπλασιασμού των νευρικών προγονικών κυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που απαιτεί δραστηριότητα c-Src και ταχεία MAPK-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης συνδέτη -43 (Samarasinghe et al., 2011)

Η ύπαρξη μη γονιδιωματικών σηματοδοτήσεων, προσθέτει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία στα γλυκοκορτικοειδή και στις βιολογικές τους δράσεις καθώς αυξάνεται η πιθανότητα, οι επιλεκτικοί ρυθμιστές του γονιδιωματικού ή μη GR-εξαρτώμενου υποδοχέα, να είναι θεραπευτικά επωφελείς.

Δ) Εντόπιση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια. Μιτοχονδριακές δράσεις. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από διάφορες ερευνητικές ομάδες αποδεικνύουν την παρουσία υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια διαφόρων τύπων ζωικών κυττάρων (Psarra et al., 2006). Η ύπαρξη των υποδοχέων στα μιτοχόνδρια σχετίζεται με τον έλεγχο μιτοχονδριακών λειτουργιών όπως α) ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, δρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες, με μηχανισμό όμοιο με αυτόν στον πυρήνα, β) απόπτωση και οξειδωτικό στρες (Psarra et al., 2005, 2009, 2011, Sionov et al., 2006).



Εικόνα 1.8. Μηχανισμοί δράσεις υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (Psarra & Sekeris, 2008).

1.6. Πολυμορφισμοί GR

Η ικανότητα του υποδοχέα GR να λειτουργεί ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας επηρεάζεται από διάφορους πολυμορφισμούς στο γονίδιο GR που μεταβάλλουν την αλληλουχία αμινοξέων του κωδικοποιημένου υποδοχέα. Ο πολυμορφισμός ER22/23EK GR εμφανίζεται στο 3% περίπου του πληθυσμού και καταλήγει σε μία αλλαγή αργινίνης σε λυσίνη στη θέση 23 εντός του NTD (Gross and Cidlowski, 2008; Van Rossum and Lamberts, 2004).

Οι GR υποδοχείς με τα παράγωγα του πολυμορφισμού του ER22/23EK έχουν μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα και στις δύο αποκρίσεις και σε γλυκοκορτικοειδή ανταπόκριση και ενδογενών γονιδίων και έχει συσχετιστεί με την αντοχή σε γλυκοκορτικοειδή. Άτομα με τον πολυμορφισμό ER22/23EK έχουν μικρότερη τάση να έχουν διαταραγμένη αντοχή στη γλυκόζη, του διαβήτη τύπου 2, και καρδιαγγειακή νόσο, υποδεικνύοντας την σχετική αντίσταση των ER22/23EK ενδογενών μεταφορέων των γλυκοκορτικοειδών να μπορεί να οδηγήσει σε ευνοϊκότερο μεταβολικό προφίλ. Ο πολυμορφισμός N363S εμφανίζεται στο 4%

περίπου του πληθυσμού με αποτέλεσμα στην θέση υποκατάστασης της ασπαραγίνης με σερίνη στο NTD του GR (Gross and Cidlowski, 2008).

Σε αντίθεση στο ER22/23EK, η παρουσία του πολυμορφισμού N363S, ενισχύει τη μεταγραφική δραστικότητα του GR και συνδέεται με γλυκοκορτικοειδή υπερευαισθησίας. Επιπλέον μία ευρεία ανάλυση μικροσυστοιχιών του γονιδιώματος αποκάλυψε ένα μοναδικό πρότυπο της γονιδιακής ρύθμισης για τον N363S πολυμορφισμό (Jewell CM and Cidlowski, 2007). N363S φορείς έχουν αναφερθεί να έχουν αυξημένο δείκτη μάζας σώματος και μια τάση προς μειωμένη οστική πυκνότητα. (Van Rossum and Lamberts, 2004)

Οι πολυμορφισμοί αυτοί του GR μπορούν να αιτιολογήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, τη μεταβλητότητα στην ανταπόκριση των γλυκοκορτικοειδών που παρατηρήθηκε μεταξύ των ατόμων που έλαβαν θεραπεία με αυτά τα στεροειδή.

1.7. Τα γλυκοκορτικοειδή

Οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες ανακαλύφθηκαν και ονομάστηκαν «γλυκοκορτικοειδή» περί το 1930. Ο όρος είναι σύνθετος: *απαρτίζεται από το πρώτο συνθετικό «γλυκο-», βάσει της παρατήρησης πως οι ουσίες αυτές διεγείρουν την ηπατική και τη νεφρική γλυκονογένεση και από το δεύτερο συνθετικό «-κορτικοειδή», μια και οι ορμόνες αυτές παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων (Long et al., 1940).*

Σε ένα ζωντανό οργανισμό (in vivo), οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων, οι περισσότερες από τις οποίες καταλύονται από ένζυμα P450 του κυτοχρώματος κωδικοποιούμενα από γονίδια όπως το γονίδιο CYP11B1 (11-β-υδροξυλάση) (Nomura et al., 1993), οι ορμόνες παραδίδονται στους ιστούς στόχους τους με μεταφορικές πρωτεΐνες (McKay and Cidlowski, 1999).

Η σύνθεση και η έκκριση της πεπτιδικής ορμόνης κορτιζόλης, της κύριας γλυκοκορτικοειδούς ορμόνης στον άνθρωπο, ρυθμίζεται από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και τις αντίστοιχες ορμόνες αυτών. Υπό τον έλεγχο της απελευθερωτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης CRH (που εκκρίνεται από τον

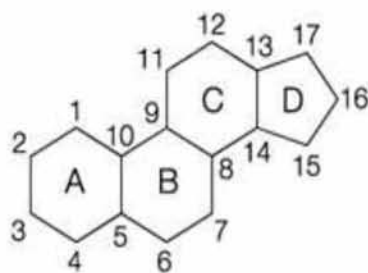
υποθάλαμο κατά τη διάρκεια στρες) εκκρίνεται (από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης) η ορμόνη κορτικοτροπίνη ACTH με έναν παλμικό και κίρκαδικό τρόπο, με την ACTH να ελέγχει με τη σειρά της την έκκριση της κορτιζόλης η οποία με μηχανισμό ανάδρομης ρύθμισης ελέγχει την έκκριση των προαναφερθέντων ορμονών (Reichardt and Schütz, 1998; Balsalobre et al., 2000; McKay and Cidlowski, 2000).

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) μεσολαβούν σε πληθώρα αποκρίσεων στις οποίες γίνεται αναλυτική αναφορά σε επόμενες παραγράφους. Ενδεικτικά αναφέρεται ο ρόλος τους στην ανάπτυξη (Bolt et al., 2001), στη διατήρηση της πίεσης του αίματος (Grünfeld, 1990), στη ρύθμιση του στρες (Sapolsky et al., 1986), στις ανοσοαπαντήσεις (Morand and Leech, 1999) κ.ά.. Τα GCs επιτυγχάνουν τις πολλαπλές δράσεις τους με την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Όπως προαναφέρθηκε ο GR ανήκει στην υπερκοικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR), οι οποίοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους σε απόκριση προς τους ειδικούς τους υποκαταστάτες (Kumar and Thompson, 2005).

1.7.1. Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών

Οι δομές των γλυκοκορτικοειδών ορμονών, όπως και όλων των στεροειδών ορμονών, βασίζονται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων (Εικόνα 1.9). Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ και Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από τον δακτύλιο Α. Οι τρεις εξαμελείς δακτύλιοι, Α, Β και Γ, υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανάκλιντρου. Λόγω της δύσκαμπτης γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή δακτυλίων των κυκλοεξανίων.

Συνήθως φέρουν μία μεθυλική ομάδα στους άνθρακες C-10 και C-13 και μία αλκυλική πλευρική αλυσίδα στον άνθρακα C-17. Η περαιτέρω διαφοροποίησή τους επιτυγχάνεται από τη σύσταση των πλευρικών τους αλυσίδων, τον αριθμό των επιπρόσθετων μεθυλικών ομάδων και από τις λειτουργικές ομάδες που είναι προσδεδεμένες στους δακτυλίους.

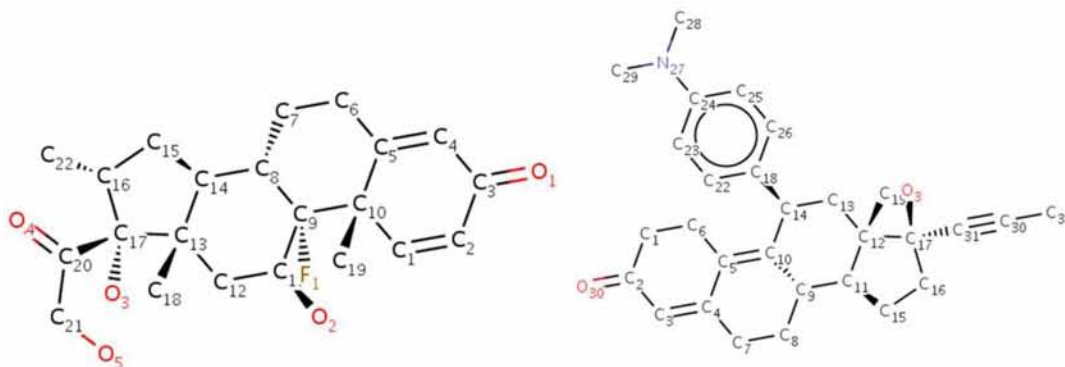


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 1.9. Αναπαρίσταται ο βασικός σκελετός ενός κοινού στεροειδούς (Lösel & Wehling, 2003).

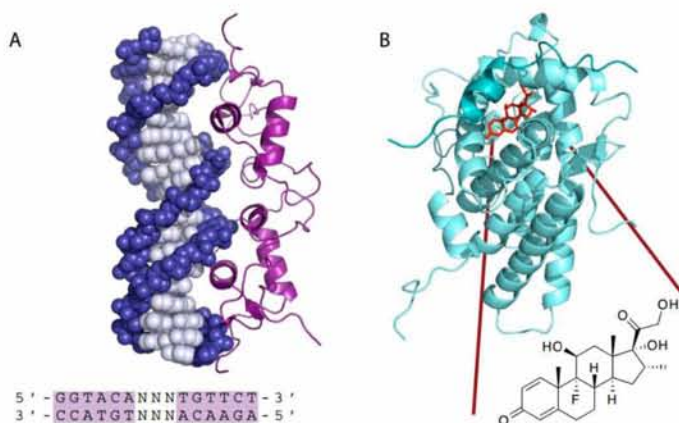
Εκτός από τις γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες που έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, χιλιάδες άλλες έχουν συντεθεί στα διάφορα φαρμακευτικά εργαστήρια, στα πλαίσια ερευνών για νέα φάρμακα. Η ερευνητική διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως τροποποίηση της δομής του μορίου μιας φυσικής ορμόνης με χημικές μεθόδους και στη συνέχεια έλεγχο των βιολογικών ιδιοτήτων του τροποποιημένου γλυκοκορτικοειδούς.

Στις πιο γνωστές συνθετικές μορφές γλυκοκορτικοειδών συγκαταλλέγονται οι ενώσεις δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX) και μifeπριστόνη (mifepristone ή RU-486). Η ουσία DEX (Εικόνα 1.10) είναι αγωνιστής του GR με 25 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον GR από ό,τι η κορτιζόλη και χαρακτηρίζεται για τις ισχυρά αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές της ιδιότητες. Η ουσία RU486 (Εικόνα 1.10) είναι μερικός ανταγωνιστής του GR και δρα ανασταλτικά στη δράση του.



Εικόνα 1.10. Αναπαρίστανται τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεξαμεθαζόνη (αριστερά) και RU486 ή μifeπριστόνη (δεξιά) (Schreiber, 2011).

Με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έχουν προσδιοριστεί οι δομές της περιοχής πρόσδεσης LBD του GR συμπλοκοποιημένης με τον αγωνιστή δεξαμεθαζόνη (Εικόνα 1.11.B) (Bledsoe et al., 2002; Kauppi et al., 2003) και με τον ανταγωνιστή RU486 (Kauppi et al., 2003). Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (Frego and Davidson, 2006).

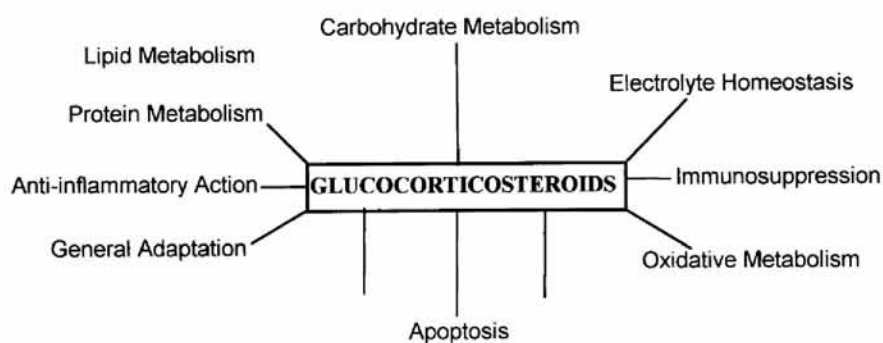


Εικόνα 1.11. Κρυσταλλογραφικές δομές DNA και LBD του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

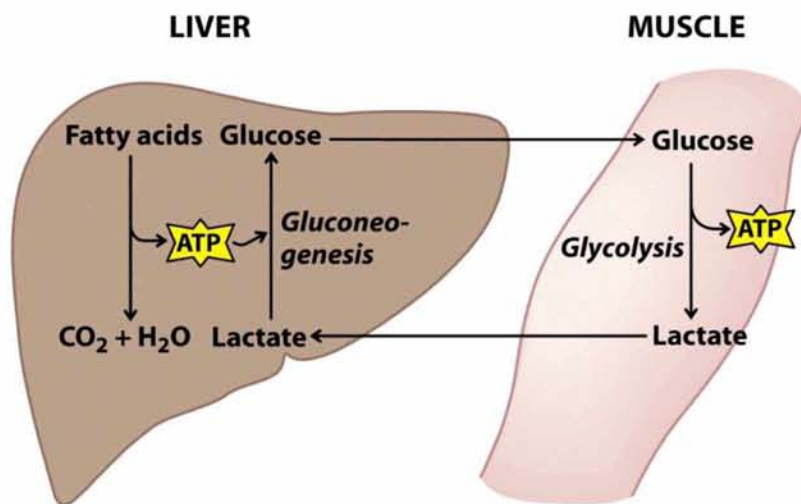
A) Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA του υποδοχέα συνδεδεμένη στο DNA (PDB 1R4O) με τη συναινετική θέση DBD να προβλέπεται. **B)** Η περιοχή σύνδεσης του προσδέματος (LBD)

1.7.2. Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών

Τα κορτικοστεροειδή είναι απαραίτητα στον οργανισμό των θηλαστικών κυρίως για την ομοιόσταση, με τα γλυκοκορτικοειδή να ασκούν επιρροές σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και συστήματα οργάνων (Gupta and Lalchhandama, 2002).



Εικόνα 1.12. Σημαντικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στα θηλαστικά (Gupta Lalchhandama, 2002).



Εικόνα 1.13. Διάγραμμα γλυκονεογένεσης και γλυκόλυσης σε μυϊκά κύτταρα και κύτταρα ήπατος (Nelson et al., 2008).

Τα GCs είναι σημαντικά για την προστασία του σώματος ενάντια στο στρες, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης και της πίεσης του αίματος (Grünfeld and Eloy, 1987). Επιπλέον, εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Macfarlane et al., 2008) και την εναπόθεση του γλυκογόνου στο ήπαρ (Mersmann and Segal, 1969; Stalmans and Laloux, 1979), καθώς επίσης επηρεάζουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών (You et al., 2009), την οστική αναρρόφηση (Reid, 1998), την καρδιαγγειακή λειτουργία (Qi et al., 2007; Sainte-Marie et al., 2007) και τη λειτουργία των νεφρών (Mangos et al., 2003).

Εκτός από τις μεταβολικές δράσεις έχουν περιγραφεί και επιρροές των GCs σε σχέση με τη συμπεριφορά και τη λειτουργία του εγκεφάλου, τη διατήρηση του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού (HPA) άξονα και τον έλεγχο της απόκρισης στο στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι τα τελικά προϊόντα του άξονα HPA και έχουν κεντρικό ρόλο στην απόκριση στο στρες. Κατά τη διάρκεια της οξείας απόκρισης στο στρες, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν βραχυπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως είναι η κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων. Επίσης, εμπλέκονται στις μακροπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως η διαμόρφωση και η ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

Η υπερπαραγωγή των γλυκοκορτικοειδών συνδέεται γενικώς με σημαντική διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας (Daban et al., 2005), ενώ η έλλειψη γλυκοκορτικοειδούς σε πειραματόζωο συνοδεύεται από την ανικανότητά του να αντεπεξέλθει στο στρες, με συχνή κατάληξη την αποβίωση του.

Επιπλέον, τα GCs επηρεάζουν την ανάπτυξη οργάνων, την ωρίμανση ιστών, την επούλωση πληγών και την επαναρρόφηση του ασβεστίου.

Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των GCs στη δυναμική διαμόρφωση των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτό περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη επικοινωνία με τους μεταγραφικούς παράγοντες και τα μονοπάτια σηματοδότησης, τις επιδράσεις στην έκφραση του υποδοχέα των κυτοκινών, τη ρύθμιση σε ό,τι αφορά στην επιβίωση, στην επιλογή και στις λειτουργίες των θυμοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και στη συμβολή τους στην ηωσινοποίηση ή ερυθροποίηση (De Bosscher et al., 2003).

Οι εξαρτώμενες από GCs λειτουργίες συμβάλλουν στην αντιμετώπιση μολύνσεων, στην επούλωση πληγών ή άλλων σχετικών ανοσολογικών στρεσογόνων παραγόντων. Μολαταύτα, η διάσπαση ή η δυσλειτουργία των δυναμικών αυτών αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε μια μοιραία έκβαση της οξείας φλεγμονής ή μπορεί να προδιαθέσει για αυτοάνοσες ή έκτοπες αντιδράσεις (De Bosscher et al., 2003). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ευεργετική, αντιφλεγμονώδης δυνατότητα του GR ανήκει πρώτιστα στη δυνατότητά του να ρυθμίζει αρνητικά τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, ενώ οι συνακόλουθες παρενέργειες είναι κυρίως η συνέπεια των trans-ενεργοποιητικών ικανοτήτων του (Reichardt et al., 2000; De Bosscher et al., 2003).

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της αρθρίτιδας, της ρευματικής καρδίτιδας, των αλλεργιών, καθώς και για τη θεραπεία της ανεπάρκειας των επινεφριδίων. Ωστόσο, αρκετά από τα αποτελέσματα από θεραπείες όπου χορηγούνται γλυκοκορτικοειδή είναι πράγματι ανησυχητικά (Belvisi et al., 2001; Miner 2002; Schäcke et al., 2002) και εφίστανται ενδελεχούς μελέτης.

1.8. Τερπένια και τα τριτερπενοειδή

Τερπένια και τερπενοειδή, αλκαλοειδή και φαινολικές ενώσεις είναι οι τρεις ευρείες κατηγορίες των φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Τα τερπένια ή ισοπρένια είναι τα πιο πολυάριθμα δομικά συστατικά διαφορετικών φυτικών προϊόντων. Με βάση την αφθονία και την ποικιλία, τα τερπένια μπορούν να αξιοποιηθούν σε μια σειρά από βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές (Croteau et al., 2000). Η κατανομή των τερπενίων στη φύση έχει μελετηθεί διεξοδικά. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις τερπενίων ανιχνεύθηκαν στο εγκάρδιο και οι χαμηλότερες στην εξωτερική σομφό του πεύκου (*Pinus taeda*). Επίσης, ανιχνεύτηκαν μέτρια επίπεδα τερπενίων στο εσωτερικό σομφόξυλο (Tompson et al., 2006). Δεν έχει αποδειχθεί ακόμα, ότι τα λουλούδια μπορούν να εκπέμπουν τερπενοειδή για να προσελκύσουν έντομα επικονίασης (Maimone & Baran, 2007), αλλά υπάρχουν αναφορές σε έρευνες, ότι υπάρχουν σαρκοφάγα φυτά, οι όνες, που παράγουν τερπένια για να προσελκύσουν τα ωφέλιμα για αυτά έντομα (Kappers et al., 2005). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα φυτοφάγα έντομα μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση των εκκρίσεων των τερπενίων των φυτών και των μορίων σηματοδότησης αυτών, που έχουν σαν αποτέλεσμα να προσελκύουν αρπακτικά είδη. Ένας από τους ρόλους των τερπενίων πάνω και κάτω από το έδαφος είναι η προσέλκυση θηρευτών, κατά την επίθεση τους από φυτοφάγους οργανισμούς. Επιπλέον, τα τερπένια δρουν ως χημικοί αγγελιοφόροι που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας των φυτών ή ακόμα και την επιρροή της έκφρασης γονιδίου από γειτονικά φυτά (Cheng et al., 2007).



Εικόνα 1.14. Οι όνες, που παράγουν τερπένια για να προσελκύσουν τα ωφέλιμα για αυτά έντομα (Kappers et al., 2005)

Εκτός από τη συμβολή τους στην κατάσταση των φυτών, τα τερπένια χρησιμοποιούνται στον τομέα της ιατρικής και της βιομηχανίας. Στη φαρμακοβιομηχανία έχουν αξιοποιηθεί για τις δυνατότητές τους και την αποτελεσματικότητά τους ως φάρμακα. Στη βιομηχανία τροφίμων έχουν αξιοποιηθεί ως ενισχυτικά γεύσης. Ίσως το πιο ευρέως γνωστό τερπένιο είναι το φυσικό καουτσούκ, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς από τον άνθρωπο. Άλλο σημαντικό τερπένιο είναι η μενθόλη που χρησιμοποιείται εύρεως για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες. Από το φυτό Cape Ash (*Ekebergia capensis*) που βρίσκεται στην Αφρική, και συγκεκριμένα από το φλοιό του κορμού του, εξάγονται πολλές ενώσεις. Δέκα από αυτές ήταν τριτερπένια, δείχνοντας ελπιδοφόρα εφαρμογή προς ένα νεότερο και πιο αποτελεσματικό φάρμακο κατά του *Plasmodium falciparum*, που είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ελονοσίας (Murata et al., 2008). Η Αρτεμισινίνη είναι ένα sesquiterpene, (μια κατηγορία τερπενίων που αποτελούνται από τρεις μονάδες ισοπρενίου και έχουν τον μοριακό τύπο $C_{15}H_{24}$), προέρχεται αρχικά από *Artemisia annua* και χρησιμοποιείται σε συνδυασμένη θεραπεία για την ελονοσία (Ro et al., 2006; Ansari et al., 2013). Η ταξόλη (paclitaxel) είναι ένα διτερπενοειδές που χρησιμοποιείται ενάντια σε πολυάριθμους καρκίνους (Vanisree et al., 2004).

Τα τριτερπένια είναι μια σημαντική υποομάδα της υπεροικογένειας τερπενίων (Xu et al., 2004), μετρώντας περισσότερα από 20.000 μέλη με διαφορετικές χημικές δομές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, τα τριτερπένια αποτελούν απαραίτητες πρόδρομες ουσίες για τις κυτταρικές μεμβράνες και των στεροειδών ορμονών (Nes and Heftmann, 1981; Benveniste, 2004; Suzuki et al., 2006). Επιπλέον, έχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών από παθογόνες καταστάσεις (Phillips et al., 2006) και συμμετέχουν στην προστασία έναντι στις διεγέρσεις των αντιβιοτικών (Wang et al., 2010).

Οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες τους, όπως η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδη, οι αντιοξειδωτικές τους δραστηριότητες (Waller & Yamasaki, 1996; Oliveira et al., 2005; Shai et al., 2008; Augustin et al., 2011; Osbourn et al., 2011), καθώς και οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων, καθιστούν τα τριτερπενοειδή ως μια πολύ σημαντική ομάδα φυσικών προϊόντων.

Τα τριτερπένια συντίθενται από το μεβαλονικό οξύ μέσω ενός ενδιάμεσου 30-άνθρακα, 2,3-οξειδοσκουαλένιο (2,3-OS). Η βιοσυνθετική ενδιάμεσος 2,3-OS είναι η περιοχή που κυκλοποιείται με διάφορες συνθετάσες 2,3-OS ή κυκλάσες (OSCS), προκαλώντας είτε τετρακυκλικές στερόλες ή πεντακυκλικά τριτερπένια, όπως η α-και β-αμυρίνη και λουπεόλη (Abe et al., 1993; Abe, 2007; Xu et al., 2004).

Τα απλά μόρια τριτερπενίων μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω και να συσσωρεύονται σαν γλυκοζίτες τριτερπενίου (τριτερπενοειδείς σαπωνίνες). Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες εμπλέκονται στην άμυνα των σιτηρών φυτών (Papadopoulou et al., 1999). Τα όσπρια επίσης παράγουν μια μεγάλη σειρά από δευτερογενείς ενώσεις και συμπεριλαμβάνονται σε αυτά τα τριτερπένια α-και β-αμυρίνη και λουπεόλη (Phillips et al., 2006).

1.8.1. Οι λειτουργίες των στερολών και τριτερπενίων

Είναι γνωστό ότι στα φυτά συσσωρεύεται ένα ευρύ φάσμα των στερολών και τριτερπενίων, γεγονός που εγείρει το ερώτημα γιατί μπορεί να χρειάζονται όλες αυτές οι παραλλαγές. Μέχρι το 1995 θεωρούνταν ότι οι στερόλες χρησιμεύουν ως δομικά συστατικά των μεμβρανών, ως πρόδρομοι των στεροειδών ορμονών, τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα και ότι ο ρόλος τους αφορά στην τροποποίηση της ρευστότητας της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας (Chappell, 2002). Το 1996 αυτή η άποψη του μεταβολισμού της στερόλης άλλαξε και έρευνες έχουν δείξει την ύπαρξη σημάτων των μορίων των στερολών που είναι ικανά να ελέγχουν την ανάπτυξη (Li et al., 1996; Szekeres et al., 1996; Schrick et al., 2000; Jang et al., 2000).

Αντίθετα, οι βιολογικές λειτουργίες των φυτικών τριτερπενίων είναι λιγότερο κατανοητές (Lindsey et al., 2003). Τα απλά τριτερπένια, όπως α-και β-αμυρίνη, έχει αποδειχθεί ότι είναι τα δομικά συστατικά των μεμβρανών κατά την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των οσπρίων, ενώ η σύνθεσή τους είναι ρυθμιστής της δημιουργίας της συμβίωσης του ενδομυκορριζικού και της ρίζας (Baisted, 1971; Hernandez and Cooke, 1996; Grandmougin- Ferjani et al., 1999; Iturbe-Ormaetxe et al., 2003).

Οι σαπωνίνες που χρησιμοποιούνται εμπορικά προέρχονται κυρίως από τα φυτά *Yucca schidigera* και *Quillaja saponaria*. Το όνομά τους προέρχεται από την

ιδιότητά τους να αφρίζουν με το νερό. Βιολογικά, οι σαπωνίνες των φυτών θεωρούνται αμυντικές ενώσεις έναντι παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων (Osbourne, 1996; Papadopoulou et al., 1999). Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες έχουν προσελκύσει τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω των στοιχείων που δείχνουν σε ποικίλες βιολογικές τους δραστηριότητες και στις ευεργετικές τους ιδιότητες στην υγεία του ανθρώπου, οι οποίες περιλαμβάνουν αντιμυκητιακές, αντιϊκές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Suzuki et al., 2002; Sparg et al., 2004; Huhman et al., 2005). Εκτός από τα φάρμακα, οι σαπωνίνες χρησιμοποιούνται σαν πρόσθετα τροφίμων, ως παράγοντες αφρισμού, ως γλυκαντικές ουσίες και ως τροποποιητές γεύσης, αλλά και στη βιομηχανία καλλυντικών (Osbourne, 2003).

1.9. Το Ολεανολικό οξύ και το Ουρσολικό οξύ

Το Ολεανολικό οξύ, ένα φυσικό συστατικό πολλών φυτικών τροφίμων και φαρμακευτικών φυτών (Πίνακες 1.1,1.2,1.3). Έχει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων και οι θεραπευτικές ιδιότητες έχουν αξιοποιηθεί μέχρι τώρα εν μέρει (Tsai et al., 2008).

Names of the plant	Biological activity	References
<i>Aralia chinensis</i> L. var <i>nuda</i> Nakai (Araliaceae)	Hepatoprotection	Wang and Jiang, 1992; Liu et al., 1994b
<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i> L. (Chenopodiaceae)	Hepatoprotection	Yabuchi et al., 1988
<i>Calendula officinalis</i> L. (Compositae)	Antifungal activity	Favel et al., 1993
<i>Eugenia jambolana</i> Lam. (Myrtaceae)	Inhibition of lipid peroxidation and protection against adriamycin toxicity Antifertility activity	alanehru and Nagarajan, 1991; 1992 Rajasekaran et al., 1988
<i>Ganoderma lucidum</i> Karst. (Labiatae)	Anticariogenic activity Inhibition of azoxymethane-induced carcinogenesis in rats Antitumor promotion	Hada et al., 1990 Yoshimi et al., 1992 Ohigashi et al., 1986; Tokuda et al., 1986
<i>Ligustrum lucidum</i> Ait. (Oleaceae)	Antiinflammation Antihyperglucemia Inhibition of mutagenicity by B[a]P	Dai et al., 1988, 1989 Liu et al., 1994 Niikawa et al., 1993
<i>Luffa cylindrica</i> Roem. (Cucurbitaceae)	Antiinflammation and inhibition of C3-convertase of the complement pathway	Singh et al., 1992; Kapil et al., 1994.
<i>Oleandra nerifolia</i> L. (Araliaceae)	Antiinflammation	Gupta et al., 1969
<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer (Araliaceae)	Hepatoprotection, tonic effects etc.	Shibata, 1977
<i>Sapindus mukorossi</i> Gaertn (Sapindaceae)	Antiinflammation	Takagi et al., 1980
<i>Swertia mileensis</i> He et Shi (Gentianaceae)	Hepatoprotection	Human Med Inst, 1975, 1977; Ma et al., 1982
<i>Swertia japonica</i> Makino (Gentianaceae)	Hepatoprotection	Hikino et al., 1984b
<i>Tetrapanax papyriferum</i> L. (Araliaceae)	Hepatoprotection	Hikino et al., 1984a
<i>Tinospora sagittata</i> G. (Menispermaceae)	Antihyperglucemia	Hao, 1991

Πίνακας 1.1. Φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν ολεανολικό οξύ ως δραστική ουσία (Liu, 1995).

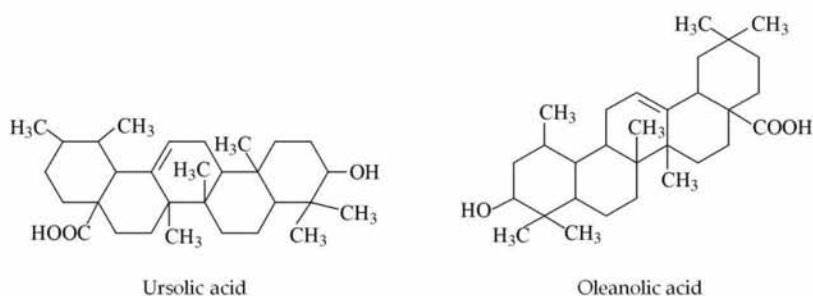
Names of the plant	Biological activity	References
<i>Calluna vulgaris</i> (Ericaceae)	Inhibition of lipoxygenase and cyclooxygenase in HL60 leukemic cells	Simon et al., 1992; Najid et al., 1992
<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl. (Rosaceae)	Inhibition of mutagenesis in bacteria	Young et al., 1994
<i>Eucalyptus</i> hybrid (Myrtaceae)	Hepatoprotection	Shukla et al., 1992
<i>Glechoma hederacea</i> L. (Labiatae)	Antitumor-promotion	Ohigashi et al., 1986; Tokuda et al., 1986
<i>Melaleuca leucadendron</i> L. (Myrtaceae)	Inhibition of histamine release	Tsuruga et al., 1991
<i>Ocimum sanctum</i> L. (Labiatae)	Inhibition of lipid peroxidation and protection against adriamycin toxicity	Balanehru and Nagarajan, 1991; 1992
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Labiatae)	Antimicrobial activity Inhibition of mouse skin tumorigenesis	Collins and Charles, 1987
<i>Pyrola rotundifolia</i> (Pyrolaceae)	Antiinflammation Antiinflammation	Huang et al., 1994 Kosuge et al., 1985
<i>Psychotria serpens</i> L. (Rubiaceae)	Cytotoxic to leukemia cells	Lee et al., 1988
<i>Sambucus chinensis</i> Lindl (Caprifoliaceae)	Hepatoprotection	Ma et al., 1986
<i>Solanum incanum</i> L. (Solanaceae)	Hepatoprotection	Lin et al., 1987
<i>Tripterospermum taiwanense</i> (Gentianaceae)	Hepatoprotection	Gan and Lin, 1988

Πίνακας 1.2. Φαρμακευτικά φυτά που περιέχουν ουρσολικό οξύ ως δραστική ουσία (Liu, 1995).

Πηγές Ολεανολικού και Ουρσολικού οξέος.	
Ολεανολικό οξύ	Σταφίδες, Μαστίχα Χίου, Γαρούφαλλο, Γκι, Ελιά, Σκόρδο και Μήλα.
Ουρσολικό οξύ	Μαστίχα Χίου, Δεντρολίβανο, Μήλα, Κράνα, Αχλάδια, Δαμάσκηνα, Μούσμουλα, Βασιλικός, Φασκόμηλο, Βατόμουρο, Λεβάντα, Ρίγανη, Θυμάρι και Μέντα.

Πίνακας 1.3. Πηγές Ολεανολικού και Ουρσολικού οξέος. (Marner et al., 1991; Bozorgi et al., 2013; Lanzotti, 2006; Wu, 2009; Ovesná et al., 2006; Frighetto et al., 2008; Baricevic et al., 2001; Horiuchi et al., 2007; Liu, 1995; Pathak et al., 2007).

Το Ολεανολικό οξύ (3β-Hydroxyolean-12-en-28-oic acid) και το ισομερές του, ουρσολικό οξύ ((3β)-3-Hydroxyurs-12-en-28-oic acid) (Εικόνα 1.16), είναι τριτερπενοειδείς ενώσεις, που υπάρχουν ευρέως στα φυτά στην μορφή του ελεύθερου οξέος ή σαν σαπωνίνες. (Price et al., 1987; Mahato et al., 1988; Wang and Jiang, 1992). Οι σαπωνίνες χημικώς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν έχοντας χαρακτηριστική δομή, που αποτελείται από μία στεροειδή αγλυκόνη που συνδέεται με μία ή περισσότερες αλυσίδες σακχάρων. Υπάρχουν δύο ομάδες σαπωνίνων, η μία περιέχει μια στεροειδή αγλυκόνη, και η άλλη περιέχει ένα άγλυκο τριτερπένιο. Το σκουαλένιο θεωρείται ως κοινός πρόδρομος για τη βιοσύνθεση και των δύο (Price et al., 1987). Τα τριτερπένια έχουν πολλές βιολογικές επιδράσεις ανάλογες με τα στεροειδή, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το ενδιαφέρον για αυτά να είναι υψηλό (Price et al., 1987; Mahato et al., 1988.). Το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ έχουν πολλές κοινές φαρμακολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 1.16. Δομή Ουρσολικού οξέος (αριστερά) και Ολεανολικού οξέος (δεξιά) (Price et al., 1987).

Το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ είναι τριτερπενοειδείς ενώσεις που υπάρχουν ευρέως σε τρόφιμα, φαρμακευτικά βότανα και άλλα φυτά. Τόσο το ολεανολικό οξύ όσο και το ουρσολικό οξύ είναι αποτελεσματικά στην προστασία έναντι χημικώς προκαλούμενης βλάβης του ήπατος σε πειραματόζωα. Το ολεανολικό οξύ διατίθεται στην Κίνα ως ένα δια του στόματος φάρμακο ηπατικές διαταραχές σε ανθρώπους. Ο μηχανισμός προστασίας του ήπατος αυτών των δύο ενώσεων μπορεί να εμπλέκεται στην αναστολή της ενεργοποίησης τοξικής ουσίας και στην ενίσχυση των συστημάτων άμυνας του οργανισμού (Jie Liu, 1995).

Το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ έχουν επίσης αντιφλεγμονώδεις και αντιυπερλιπιδαιμικές ιδιότητες στα πειραματόζωα. Η έρευνα κρίνεται απαραίτητη για την ανάπτυξη μιας θεραπείας και για τους ανθρώπους. Πρόσφατα, οι δύο ενώσεις έχουν αναφερθεί και την δράση τους κατά των καρκινικών όγκων. Το Ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ είναι σχετικώς μη τοξικά, και χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά και σε προϊόντα υγείας (Jie Liu, 1995).

Σε άλλη έρευνα εξετάστηκαν *in vitro* οι επιδράσεις του ολεανολικού οξέος και του ουρσολικού οξέος σε κύτταρα PC12. Με βάση τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι αποτελούν ισχυρούς παράγοντες εναντίω στη νευροεκφυλιστική διαταραχή. Οι δύο αυτές ουσίες έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Castellano et al., 2013).

Η νεφρική διάμεση ίνωση είναι μια κοινή τελική παθολογική διαδικασία στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου. Αυτό οφείλεται κυρίως στο οξειδωτικό στρες, που συμβάλλει στην νεφρική φλεγμονή και ίνωση. Ο Nuclear factor-erythroid-2-related

factor 2 (Nrf2), είναι γνωστό ότι συντονίζει, την επαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα. Ερευνήθηκαν οι επιπτώσεις του ολεανολικού οξέος, ενός γνωστού Nrf2 ενεργοποιητή, στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από νεφρική φλεγμονή και ίνωση. Το ολεανολικό οξύ μπορεί να ασκήσει ευεργετικές επιδράσεις στη νεφρική ίνωση αυξάνοντας την πυρηνική μετατόπιση της Nrf2 και στη συνέχεια να μειώσει το οξειδωτικό στρες των νεφρών. Το Ολεανολικό οξύ αύξησε την έκφραση του πυρηνικού υποδοχέα Nrf2, της οξυγενάσης αίμης-1, της NAD(P)H: κινόνης οξειδο-ρεδοκυτάσης 1 και της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70, και μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το ολεανολικό οξύ ενισχύει την πυρηνική μετατόπιση του Nrf2 (Chung et al., 2014).

Ο διαβήτης τύπου 2 επηρεάζει 220 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Ο αριθμός αυτός θα διπλασιαστεί μέχρι το 2030, χωρίς συγκεκριμένη πολιτική. Η κατάσταση αυτή οφείλεται στη γήρανση του πληθυσμού, σε κοινωνικοοικονομικές καταστάσεις και στον τρόπο ζωής όπου υπάρχει έλλειψη σωματικής άσκησης και στην παχυσαρκία. Είναι σαφές ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη παίζει ένα σημαντικό ρόλο στον πρώιμο διαβήτη. Πρόκειται για μία παθολογία που βασίζεται στην αποτυχία έκκρισης της ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β-κύτταρα που είναι καθοριστική στην εξέλιξη της υπεργλυκαιμίας. Η διαχείριση του διαβήτη απαιτεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που θα περιλαμβάνει την έγκαιρη παρέμβαση για να αποτρέψει ή και να καθυστερήσει την εμφάνισή του και τη χρήση των συνδυασμένων θεραπειών για τον έλεγχο της γλυκόζης αίματος και της λιπιδαιμίας στα τελικά στάδια. Παρά το γεγονός ότι πολλά φάρμακα με διαφορετικούς τρόπους δράσης είναι διαθέσιμα, ένα νέος φυσικός αντιδιαβητικός παράγοντας με δράση ευαισθητοποίησης της ινσουλίνης και προληπτικές ενέργειες είναι ιδιαίτερα επιθυμητός. Στόχος είναι όχι μόνο η μείωση της υπεργλυκαιμίας, αλλά και για την αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου ως σύνολο (Tsai et al., 2008).

Με ένα πολύπλοκο και σύνθετο μηχανισμό το ολεανολικό οξύ ασκεί ευεργετικά αποτελέσματα κατά του διαβήτη και του μεταβολικού συνδρόμου. Βελτιώνει την απόκριση της ινσουλίνης, διατηρεί τη λειτουργικότητα και την επιβίωση των β-κυττάρων, και προστατεύει κατά των επιπλοκών του διαβήτη. Το Ολεανολικό οξύ, διαμορφώνει άμεσα ένζυμα που συνδέονται με τη βιοσύνθεση, την έκκριση, και τη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Η σημαντική αυτή συνεισφορά του φαίνεται να προέρχεται από την αλληλεπίδραση σε σημαντικές οδούς μεταγωγής, και

πολλά από τα αποτελέσματά του που φαίνονται είναι σταθερά σχετίζονται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής του πυρηνικού υποδοχέα Nrf2 (Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2).

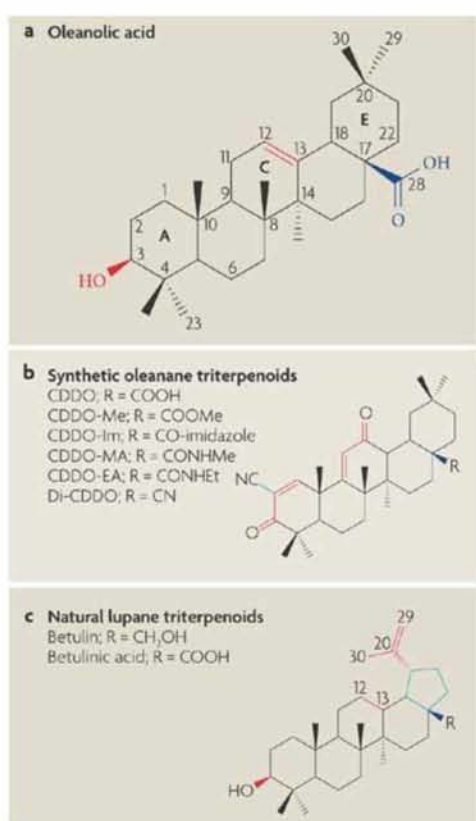
Με βάση τα παραπάνω το Ολεανολικό Οξύ επάγει την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων και φάσης II των γονιδίων απόκρισης και καταστέλλει την υπερλιπιδαιμία (Tsai et al., 2008).

Η διαχείριση του διαβήτη τύπου 2 απαιτεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει την έγκαιρη παρέμβαση για την πρόληψη ή την καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου, καθώς και τη χρήση των θεραπειών για τον έλεγχο της γλυκόζης αίματος και της λιπιδαιμίας στα τελικά της στάδια. Υπό την έννοια αυτή η χρήση λειτουργικών τροφίμων ή φαρμάκων που περιέχουν Ολεανολικό οξύ είναι σημαντική (Tsai et al., 2008).

Το ολεανολικό οξύ, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια τριτερπενοειδή ουσία γνωστή για τις αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές της ιδιότητες. Σε μελέτη για τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις του ολεανολικού οξέος έναντι των προφλεγμονωδών αποκρίσεων του μεσολαβητή λιποπολυσακχαρίτη (LPS) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα επικυρώνεται η χρησιμότητά του σαν ένας θεραπευτικός παράγοντας για αγγειακές φλεγμονώδεις νόσους. Το ολεανολικό οξύ έχει αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις με την αναστολή της υπέρ-διαπερατότητας, μεταβάλλοντας την έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης CAMs, επάγοντας τη διάσπαση του φραγμού, και μεταβάλλοντας την προσκόλληση του ενδοθηλίου και την μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Κατέστειλε επίσης την έκκριση οξικού οξέος που προκαλείται *in vivo*. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι το ολεανολικό οξύ κατέστειλε την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων-α και την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα-κΒ με LPS. Συλλογικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την αντικαρκινική του δράση (Lee et al., 2013).

Τέλος, σε μελέτες σε προϊόντα που παράγονται στη χώρα μας έχουν βρεθεί σημαντικές δράσεις του ουρσολικού και ολεανολικού οξέος. Η αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντική, αντικαρκινική, ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδης, αντιελκώδης και αντιυπερλιπιδεμική δράση της Μαστίχας Χίου οφείλεται σε αυτά (Marner et al., 1991; Papageorgiou et al., 1997; Kaliora et al., 2004; Andrikopoulos et al., 2003; Bozorgi et al., 2013).

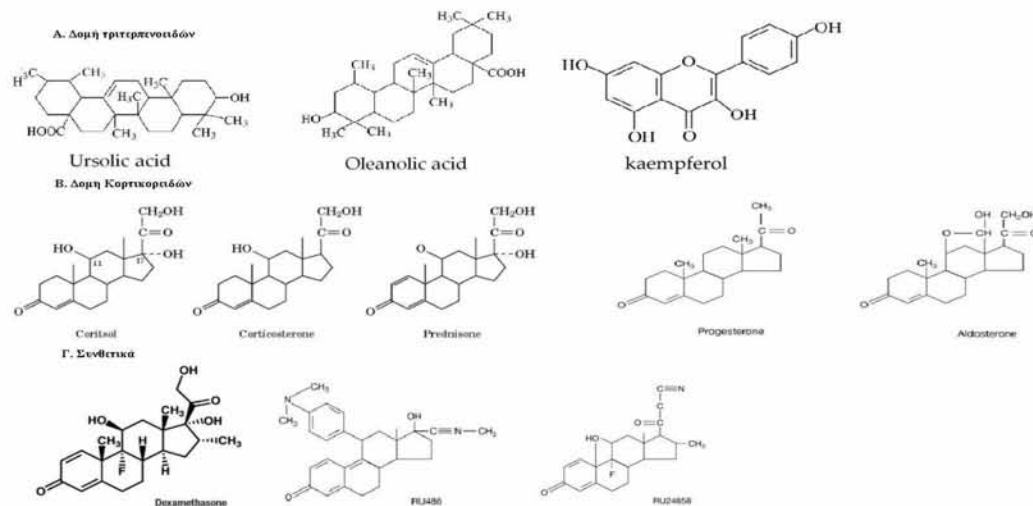
Επίσης, στις σταφίδες, αναγνωρίστηκαν πέντε γνωστές φυτοχημικές ουσίες οι οποίες έχουν αντιοξειδωτική και αντιβακτηριδιακή δράση. Από τις ουσίες αυτές την ισχυρότερη έχει το ολεανολικό οξύ. Οι φυτοχημικές ουσίες των σταφίδων και ιδιαίτερα το ολεανολικό οξύ, καταστέλλουν την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των βακτηρίων αλλά παράλληλα και την προσκόλληση τους στα δόντια, που είναι πολύ σημαντική για τη δημιουργία της οδοντικής πλάκας. Η οδοντική πλάκα είναι το υπόβαθρο στο οποίο ζουν και αναπτύσσονται τα βακτήρια στο στόμα και στα δόντια (Wu, 2009).



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 1.17. Δομή Τριτερπενίων: α.Ολεανολικού οξέος β.Συνθετικού oleanene τριτερπενίου γ.Φυσιικού lupane τριτερπενίου. (Liby et al., 2007).

Τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους με τα τριτερπενοειδή: (Εικόνα 1.17) Α) Δομή Τριτερπενοειδών και Β) Δομή Γλυκοκορτικοειδών και Γ) Δομή Συνθετικών Ουσιών οι οποίες υποδηλώνουν πιθανές ομοιότητες και στη βιολογική τους δράση.

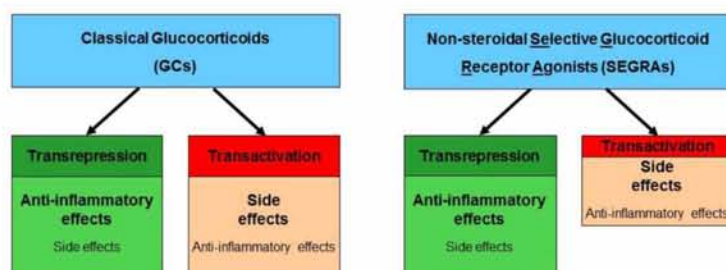


Εικόνα 1.18. Α) Δομή Τριτερπενοειδών και Β) Δομή Στεροειδών - Γλυκοκορτικοειδών και Γ) Δομή Συνθετικών στεροειδών οι οποίες υποδηλώνουν πιθανές ομοιότητες και στη βιολογική τους δράση.

1.10. Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA)

“Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRA)”

Οι γονιδιωματικές δράσεις του GCs μπορούν να διαχωριστούν σε δύο διαδικασίες: Την "Μετενεργοποίηση ή trans-ενεργοποίηση», η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις ανεπιθύμητες ενέργειες (Schacke et al., 2002), και την "μετακαταστολή, trans-καταστολή», η οποία θεωρείται ότι μεσολαβεί σε πολυάριθμα επιθυμητά αντιφλεγμονώδη και ανοσορυθμιστικά αποτελέσματα (Schacke et al., 2004).



Εικόνα 1.19. Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA) (Stock, 2013).

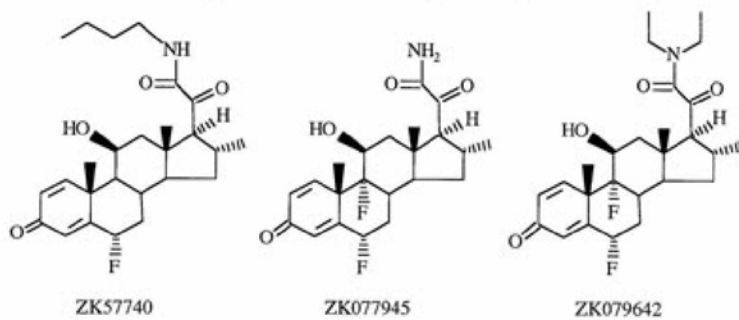
Ως εκ τούτου οι ανταγωνιστές σύνδεσης γλυκοκορτικοειδών ή οι λεγόμενοι “selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRA’s) είναι στο στάδιο της ανάπτυξης. Πρόκειται για φάρμακα που προκαλούν μια διαμόρφωση του υποδοχέα προτιμώντας αλληλεπίδραση GCR/πρωτεΐνης αντί για τη δέσμευση GCR/DNA. Κατά συνέπεια, το πλεονέκτημα αυτών των καινοτόμων στεροειδών ή μη στεροειδών μορίων είναι ότι είναι ικανά να επάγουν τις διαδικασίες μετακαταστολής ενώ η επαγωγή της μετα-ενεργοποίησης είναι αμελητέα. Τα πρώτα αποτελέσματα με στεροειδείς ενώσεις (Roussel Uclaf currently Sanofi Aventis, Paris, France), συμπεριλαμβανομένων RU 24782, RU 24858 και 40066 RU, ήταν ικανοποιητικά in vitro, αλλά δυστυχώς δεν ήταν in vivo (Belvisi et al., 2001; Vayssiere et al., 1997).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει περιγραφεί ένας αυξανόμενος αριθμός SEGRA’S. Μια πολύ ενδιαφέρουσα ουσία είναι για παράδειγμα η A276575 και τα τέσσερα εναντιομερή της (Schacke et al., 2004), όπου όλα τα προσδέματά της προσδέονται με την ίδια συγγένεια προς το cGCR όπως ενεργεί και η δεξαμεθαζόνη. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι η A276575 και τα τέσσερα εναντιομερή της δρουν 5% λιγότερο σε σχέση με την ικανότητα της δεξαμεθαζόνης, όσον αφορά στις ιδιότητες μετα-ενεργοποίησης.

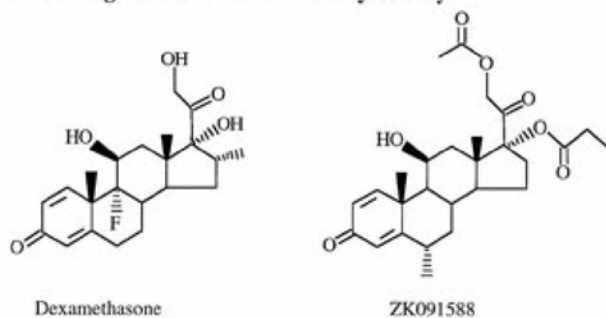
Συμπερασματικά, αυτές οι νέες ουσίες μπορούν να εισαχθούν σε κλινική ιατρική στο κοντινό μέλλον, αλλά επίσης και για αυτά τα φάρμακα απαιτούνται in vivo μελέτες για να καθοριστεί η αναλογία οφέλους-κινδύνου στον άνθρωπο.

Τέλος, δεδομένου ότι μερικά από τα θετικά αποτελέσματα GC που προκύπτουν μέσω της μετα-ενεργοποίησης (δηλ. την επαγωγή των αντιφλεγμονωδών μορίων) μπορεί να γίνει η υπόθεση ότι η δράση (σχεδόν αποκλειστικά) των SEGRA’s μέσω μετακαταστολής ενδεχομένως δεν μπορεί να φτάσει την συνολική in vivo ανοσοκατασταλτική της δράσης της συμβατικής GC (Stahn et al., 2007).

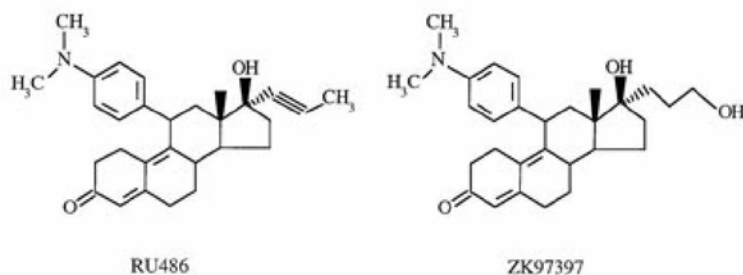
Glucocorticoid analogs: no anti-inflammatory activity



Glucocorticoid analogs: with anti-inflammatory activity



Glucocorticoid antagonists: no anti-inflammatory activity



Εικόνα 1.20. Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA) (Heck et al., 1997).

2. Σκοπός

Η χρήση ουσιών φυτικής προέλευσης για την πρόληψη αλλά και την ίαση των ασθενειών πάντοτε αποτελούσε πρόκληση. Επιπλέον, η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας έχει συντελέσει στην με μεγάλη ακρίβεια και εξειδίκευση μελέτη και ανίχνευση των επιδράσεων των φυτικών ουσιών. Από την άλλη, η αναζήτηση ουσιών με θετικές - επιθυμητές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε συνδυασμό με τη μείωση ή ακόμα και την αποφυγή ανεπιθύμητων παρενεργειών, οδηγούν πολλούς επιστήμονες στη μελέτη των ουσιών που φαίνεται ότι έχουν αντιφλεγμονώδη και προστατευτική δράση στα φυτά. Η πρόληψη αλλά και το χαμηλότερο κόστος αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες για τη μελέτη αυτών των ουσιών.

Το ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των σαπωνίνων και στην υποομάδα των πεντακυκλικών τριτερπενίων. Και τα δύο οξέα υπάρχουν σε ένα πλήθος φυτών κυρίως υπό μορφή κηρώδους επικάλυψης των καρπών και των φύλλων.

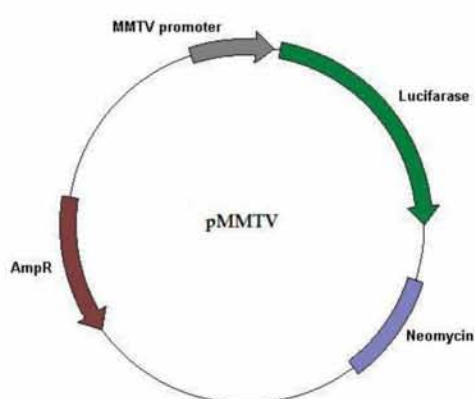
Από τα προαναφερόμενα διαπιστώνουμε ότι ένα μεγάλο ποσοστό από τα φυτά αυτά ευδοκιμούν στην Ελλάδα, είτε ως αυτοφυή, είτε ως καλλιεργήσιμα. Από πλήθος μελετών που πραγματοποιηθήκαν επί της θεραπευτικής επίδρασης που ασκούν στον οργανισμό, διαπιστώθηκε η δράση αυτών στην υγεία. Στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας ότι τόσο το ουρσολικό όσο και το ολεανολικό οξύ ενεργοποιούν την υποκυτταρική μετακίνηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα και κατά συνέπεια την εν δυνάμει ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητάς του, γεγονός που φαίνεται να επαληθεύεται, στην περίπτωση του ολεανολικού οξέος, με δοκιμασίες έλεγχου δραστηριότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τη μέθοδο της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι τόσο το ουρσολικό οξύ όσο και το ολεανολικό οξύ μπορούν να μελετηθούν και στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως εν δυνάμει εκλεκτικοί ρυθμιστές της δράσης των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών, αξιοποιούμενα για τις θεραπευτικές φαρμακευτικές δράσεις τους στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

3. Υλικά και Μέθοδοι

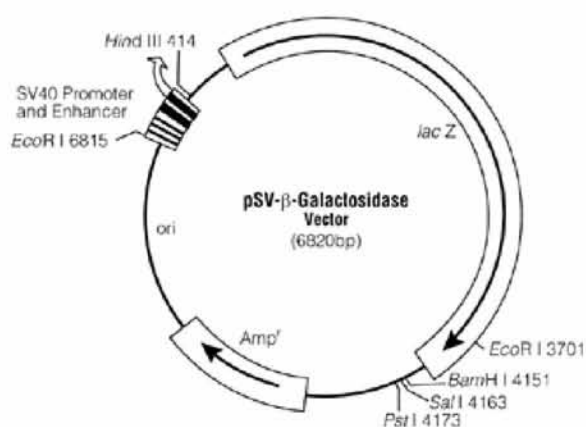
3.1. Υλικά

3.1.1. Πλασμιδιακοί φορείς

Στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pMMTV-GRE-Luc, pSV40-β-Gal



Εικόνα 3.1. Αναπαρίστανται οι μοριακές κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων mN(εuro)2A.
A) Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-Luc, με τον υποκινητή να φέρει GREs αλληλουχίες.
B) Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της β-Gal.



3.1.2. Διαλύματα

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):
Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 μL PMSF 20 mM (20 °C) και 2 μL DTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:

Αποτελείται από 91 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ και 1500 mM NaCl.
Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH₂PO₄ 0.2 M και διβασικού Na₂HPO₄ 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H₂O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

3.1.3. Οργανολογία

Τα όργανα και μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα από το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του ΤΒΒ, καθώς επίσης και από το δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών του Τμήματος. Αναφέρονται τα βασικότερα εξ αυτών:

Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (LEICA DM 2000), το οποίο φέρει ειδική ψηφιακή κάμερα (DFC420C-234422307) συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας (Leica Application Suite).

Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (KRÜSS)

Αυτόματοι πιπιεταδόροι τύπου Gilson (0.2-10 μL , 1-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL)

Επωαστικός κλίβανος CO₂ (Galaxy 170S, New Brunswick)

Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood) μικροβιολογικής ασφάλειας επιπέδου II (TELSTAR AV-30/70)

Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Nuova, Thermolyne)

Κυκλομείκτες (vortex)

Λουμινόμετρο-Μηχάνημα μέτρησης χημειοφωταύγειας (Lumat 3 LB 9508, Berthold Technology)

Ξηρός κλίβανος (WTB binder)

Υδατόλουτρο

Φυγόκεντροι (Centrifiger-BL II, eppendorf Centrifuge 5810 R, eppendorf microcentrifuge 5415 D)

Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός (Spectronic® 20 GENESYS™)

Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους φωτός (U-1500 UV/Vis Spectrophotometer, Hitachi)

3.1.4. Αναλώσιμα

Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks) (μεγέθοι T25, T75)
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)
Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
Πιπέττες Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
Ρύγχοι (0.2-10 μ L, 20-200 μ L και 100-1000 μ L)
Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6 \times και 24 \times wells
Καλυπτρίδες coverslips
Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (3.5, 6.0, 9.0, 10.0 και 15.0 cm)
Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* στελέχους XL-1 blue τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε 30-40 % γλυκερόλη στους -80 °C με τη μέθοδο θερμικού σοκ (heat-shock). Σε πλαστικό σωληνάριο erpendorf (1.5 mL) που περιέχει 80 μ L *E. coli* XL-1 blue κυττάρων προστίθεται 1 μ L του επιθυμητού πλασμιδίου (stock, -20 °C), δουλεύοντας στον πάγο. Αφήνονται προς επώαση στους 4 °C για ≥ 30 min. Ακολούθως το erpendorf μεταφέρεται για 1 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42 °C. Έπειτα τοποθετείται στους 4 °C για 2 min και ακολουθεί η προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου LB. Στη συνέχεια τοποθετούνται στους 37 °C για 1 h και κατόπιν γίνεται επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τριβλίο με LB-άγαρ το οποίο είναι επιστρωμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη amp ή καναμυκίνη kan, σε συγκέντρωση 100 μ g/mL ή 50 μ g/mL, αντίστοιχα. Υπό στείρες συνθήκες εφαρμόζεται η μέθοδος της διασποράς με γυάλινο διανομέα και η επώαση των βακτηριακών κυττάρων γίνεται στους 37 °C για ~16 h.

3.2.2. Απομόνωση pDNA από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

Έγινε απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN χρησιμοποιώντας το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλών αντιγράφων [QIAGEN®, 2012].

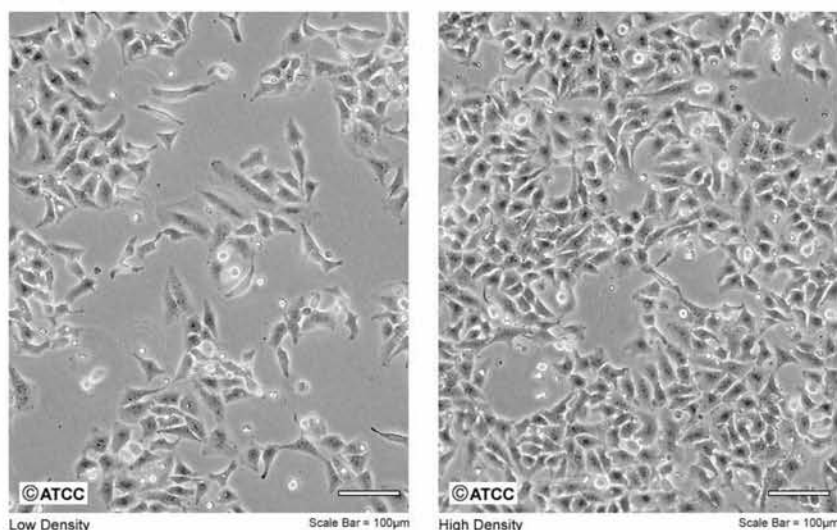
Απομονώθηκαν τα πλασμίδια: pSV40- β Gal και pMMTV-GRE-Luc για την κλωνοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* στελέχους XL-1 blue. Τα stock διαλύματα πλασμιδιακού DNA ελέγχονται για την καθαρότητά τους και ποσοτικοποιείται η περιεκτικότητά τους σε pDNA με φασματοφωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1:200. Αποθηκεύονται στους -20 °C.

3.2.3. Διαχείριση Κυτταροκαλλιέργειών

Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa

Τα κύτταρα HeLa / h i : l a : / , αποτελούν την παλαιότερη και την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη σειρά ανθρώπινων κυττάρων. Το πλήρες γονιδίωμα των κυττάρων HeLa και η αλληλουχία τους δημοσιεύθηκε τον Μάρτιο του 1953. Ήταν επίσης τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα που κλωνοποιήθηκαν με επιτυχία το 1955. Τα καρκινικά κύτταρα ελήφθησαν από την Henrietta Lacks και ονομάστηκαν HeLa από το όνομα της. Τα κύτταρα HeLa είναι επιθηλιακά, ονομάζονται «αθάνατα» με την έννοια ότι μπορεί να διαιρέσει έναν απεριόριστο αριθμό φορών σε μία πλάκα καλλιέργειας κυττάρων εργαστήριο όσο πληρούνται ως θεμελιώδεις συνθήκες κυτταρικής επιβίωσης (δηλαδή να διατηρηθεί και να διατηρηθεί σε ένα κατάλληλο περιβάλλον). Υπάρχουν πολλά στελέχη κυττάρων HeLa, καθώς συνεχίζουν να μεταλλάσσονται σε κυτταρικές καλλιέργειες, αλλά όλα τα κύτταρα HeLa προέρχονται από τα ίδια καρκινικά κύτταρα (Callaway, 2013; Landry et al., 2013; Sharrer, 2006; Rahbari, 2009).

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



Εικόνα 3.2.Κύτταρα της καρκινικής σειράς HeLa, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε μικρό (αριστερά) και σε μεγάλο (δεξιά) ποσοστό πληρότητας. Από την επίσημη ιστοσελίδα του ATCC].

3.2.4. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέσα σε ειδικά φιαλίδια (cryovials ή cryotubes). Τοποθετούνται σε υδατόλουτρο ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) όπου πραγματοποιείται η απόψυξή τους και αφού γίνει εξωτερικός καθαρισμός του cryovial με 70 % EtOH (70 : 30 EtOH : dH₂O), αυτό εισάγεται εντός του απαγωγού καθέτου νηματικής ροής. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα falcon (15 mL) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, σε θερμοκρασία $\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (R.T.) για 5 min. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με αναρρόφηση και το ίζημα επαναδιαλύεται σε όγκο 5 mL θρεπτικού μέσου DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης, χαμηλής περιεκτικότητας (1 mg/mL) σε γλυκόζη (στο εξής θα αναφέρεται ως: DMEM w/ P.R., L.G) εμπλουτισμένου με 1 % v/v 200 mM L-γλουταμίνη (L-Glut), 1 % v/v πενικιλίνη-στρεπταμυκίνη (Pen/Strept) και 10 v/v % FBS, για flask των 25 cm² ή σε όγκο 15 mL θρεπτικού μέσου για T75 flask. Τα κύτταρα αφήνονται προς επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ με συνθήκες υγρασίας 5 % CO₂. Αναπτύσσονται σε μονόστοιβη καλλιέργεια και η προσκόλλησή τους στο ταπήτιο της πλαστικής φλάσκας απαιτεί $\geq 24\text{ h}$.

3.2.5. Καλλιέργεια κυττάρων HeLa

Για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο DMEM w/ P.R. H.G. εμπλουτισμένο με 10 % v/v FBS, 1 % v/v 200 mM L-Glut και 1 % v/v Pen/Strept (πλήρες θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ και ποσοστό CO₂ ίσο με 5 %.

Στα πειραματικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν έγινε επίσης χρήση θρεπτικού μέσου DMEM w/o P.R., H.G. (φωτοευαίσθητο) και DMEM w/o P.R., H.G. εμπλουτισμένο με 10 % FBS το οποίο έχει απενεργοποιηθεί μετά από κατεργασία με ζωάνθρακα (cis-DMEM) (φωτοευαίσθητο).

Πραγματοποιείται καθημερινή παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, για αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων, με έλεγχο της φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων και της πληρότητας (confluency) της φλάσκας σε πληθυσμό κυττάρων.

3.2.6. Θρυψινοποίηση κυττάρων

Όταν το ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων καλύψει το ~80 % της χρησιμοποιούμενης φλάσκας πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με χρήση διαλύματος πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά απομακρύνεται με αναρρόφηση από τη φλάσκα το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25 %, όπου αφήνεται να δράσει στους 37 °C. Παρατηρείται η αποκόλληση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και ακολουθεί αδρανοποίηση της θρυψίνης (ως επακόλουθο της αλλαγής της τιμής του pH) με προσθήκη όγκου θρεπτικού υλικού (σε αναλογία όγκων ~5:1 θρεπτικό υλικό:διάλυμα θρυψίνης). Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 1000 rpm, 22 °C για 5 min και ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται (με καλό πιπεττάρισμα) στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM w/ P.R., H.G.) και επιστρέφεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/10 για T25 και 1/5 για T75) στη φλάσκα, με προσθήκη κατάλληλου όγκου θρεπτικού μέσου (5 mL για T25 και 15 mL για T75). Τα κύτταρα διασπείρονται ομοιόμορφα εντός της φλάσκας και αφήνονται προς επώαση στον ειδικό κλίβανο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (37 °C, 5 % CO₂).

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται περίπου 3 φορές ανά εβδομάδα, ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Σε κάθε ανακαλλιέργεια ο αριθμός του περάσματος (passage) των κυττάρων αυξάνεται κατά +1 την φορά και είναι δείκτης της γήρανσης των κυττάρων.

3.2.7. Ψύξη κυττάρων

Έπεται της θρυψινοποίησης. Αφού γίνει φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, 22 °C για 5 min, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο FBS. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε cryovials με αναλογία FBS : DMSO 9:1, ανακινείται και αποθηκεύεται εν τάχει στους -80 °C. Το DMSO χρησιμεύει ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας.

3.2.8. Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer).

Πρακτικά πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων, σταμάτημα της πρωτεολυτικής αντίδρασης με προσθήκη θρεπτικού μέσου, φυγοκέντρηση (στις 1000 rpm, ~22 °C, για 5 min) του εναιωρήματος των κυττάρων, απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και αναδιάλυση του ιζήματος σε όγκο θρεπτικού υλικού.

Γίνεται η μεταφορά 10 μ L εναιωρήματος σε αιμοκυττόμετρο Neubauer και μετρίεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στα 4 τεταρτημόρια. Αφού υπολογιστεί ο μέσος όρος του αριθμού των κυττάρων στα 10 μ L, ακολουθεί η αναγωγή του σε αριθμό κυττάρων ανά mL. Ακολούθως υπολογίζεται μαθηματικά ο όγκος του εναιωρήματος κυττάρων που απαιτείται να χρησιμοποιηθεί, ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ανά well, λαμβάνοντας υπ' όψιν και το συνολικό αριθμό των wells προς χρήση.

Ο υπολογισθέντας όγκος αναδιαλύεται στο θρεπτικό μέσο στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα και αφού γίνει καλό pipetting, το εναιώρημα των κυττάρων διαμοιράζεται στα πηγάδια-κελιά (wells) της πλάκας ανάπτυξης των κυττάρων (plate).

3.2.9. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa.

Τα κύτταρα υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με εξωγενές γενετικό υλικό εφαρμόζοντας τη μέθοδο των λιποσωμάτων.

Εντός των λιποσωμάτων εσωκλείεται κατάλληλο πλασμιδιακό DNA και δεδομένης της λιπιδικής φύσεως της κυτταρικής μεμβράνης, συντήκονται με αυτή απελευθερώνοντας εντός της το περιεχόμενό τους. Επίσης, τα λιποσώματα είναι δυνατό να διεισδύσουν στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική διάχυση ή ακόμη και να εισαχθούν με διαδικασίες ενδοκυττάρωσης κ.ά.

Επίσης έγινε χρήση του χλωριούχου ασβεστίου CaCl_2 παρουσία φωσφορικών, όσον αφορά στα κύτταρα HeLa. Γενικότερα ο χρησιμοποιούμενος λόγος συγκεντρώσεων υφίσταται τροποποιήσεις, για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της διαμόλυνσης.

Εργαστηριακό Πρωτόκολλο διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa:

Ημέρα 0: Σε 24 κελιά ενός 24× wells-plate προστίθενται 30.000 κύτταρα HeLa ανά well σε θρεπτικό υλικό DMEMwP.R., H.G., +FBS, +L-G, -P/S και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂.

Ημέρα 1: Ελέγχεται η πληρότητα των κελιών (wells) της πλάκας ανάπτυξης (plate) σε κύτταρα. Έφτασε το ~80 %, ποσοστό ικανό για διαμόλυνση, οπότε προχώρησε το εργαστηριακό πρωτόκολλο.

Σε πρώτο βήμα, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων με 300 μL/well αντιδραστηρίου DMEMw/oP.R., H.G. (δεν διαθέτει αντιμυκητοκικά-αντιβιοτικά ούτε FBS), τοποθετώντας το τουλάχιστον μισή ώρα προτού ξεκινήσει η διαμόλυνση των κυττάρων. Δημιουργούμε διάλυμα CaCl₂ με συγκέντρωση 2M και διάλυμα HBSx2 που αποτελείται από 50 mM Hepes, 1,5 mM Na₂HPO₄ και 280 mM NaCl. Στη συνέχεια, αποθηκεύονται και φυλάγονται στους -20 C.

Ακολούθως ετοιμάζονται τέσσερα διαλύματα (MIXIAIB και MIXIIA και IIB): Τα μείγματα IA ΚΑΙ IB αποτελούνται από CaCl₂, pDNA (ERα και ERβ αντίστοιχα) και ddH₂O. Τα μείγματα IIA και IIB αποτελούνται από HBSx2 το οποίο τοποθετείται σταγόνα – σταγόνα (drop-wise) στο Eppendorf.

Στον Πίνακα 3.1. αναγράφονται οι συστάσεις των μειγμάτων που περιγράφηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1.

ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ HeLa

<u>Mix IA:</u>
pSV40-βGal: 0.15 μg/well
TK-GRE-Luc: 0.15 μg/well
CaCl ₂ : 6,5 μL/well
ddH ₂ O
<u>Mix IIA:</u>
HBSx2

Τα επιμέρους μείγματα αφήνονται προς επώαση για 10 min (R.T., σκοτάδι). Ακολούθως αναμειγνύονται και επωάζονται για 30 min στο σκοτάδι, σε R.T. Το ολικό μείγμα διαμοιράζεται με σταδιακή ροή στα wells (+30 $\mu\text{L}/\text{well}$) ώστε να αποτελεί το 1/10 του όγκου στο τρυβλίο διαμόλυνσης των κυττάρων και τα κύτταρα αφήνονται προς επώαση στον επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5 % CO_2). Έπειτα, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαθίσταται με πλήρες θρεπτικό υλικό cisDMEMw/oP.R., H.G. μετά από 12 h (και λιγότερο από 16 h) ώστε να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση και αφήνονται στον κλίβανο για 24 h.

Αντίστοιχα, έγινε χρήση του εμπορικού αντδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000, όσον αφορά τα HeLa κύτταρα. Η αναλογία του λόγου γ pDNA : λ χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη ήταν 1 : 0,5.

Στον Πίνακα 3.2. αναγράφονται οι συστάσεις των μειγμάτων που περιγράφηκαν.

Πίνακας 3.2.

Mix I:
pSV40- β Gal: 0.15 $\mu\text{g}/\text{well}$
TK-GRE-Luc: 0.15 $\mu\text{g}/\text{well}$
OptiMEM: 25 $\mu\text{L}/\text{well}$
Mix II:
Lipofectamine: 0.2 $\mu\text{L}/\text{well}$
OptiMEM: 25 $\mu\text{L}/\text{well}$

3.2.10. Λύση κυττάρων

Στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης τα κύτταρα λύνονται σε Lysis Buffer 1 \times . Αρχικά πραγματοποιείται έκπλυση των wells με PBS 1 \times (παγωμένο, αποστειρωμένο). Ακολούθως προστίθενται 70 μL L.B./well και το plate τοποθετείται προς επώαση στους 4 °C υπό ήπια ανακίνηση για 30 min ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση. Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των wells γίνεται με απόξεση

(scraping) με το ρύγχος της πιπέτας και ο όγκος που προκύπτει μεταφέρεται σε erpendorfs (1.5 mL). Τα erpendorfs φυγοκεντρώνονται στις 13.000 rpm, 4 °C για 30 min και το υπερκείμενο διάλυμα συλλέγεται σε νέα erpendorfs (1.5 mL) όπου και αποθηκεύεται στους -80 °C.

3.2.11. Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS

Για την απενεργοποίηση του FBS προς παρασκευή cis-FBS εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή [Sigma, n.d.].

Ο ενεργός άνθρακας έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε λιποφιλικά μόρια κι ως εκ τούτου να αφαιρεί ορμόνες (ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδά τους) όπως ανδρογόνα, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, T3 και T4 από το FBS. Οι συγκεκριμένες λιπιδικές ορμόνες του ορού είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασης τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη.

3.2.12. Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

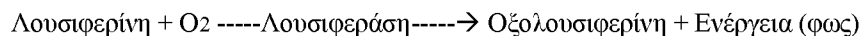
Συνίσταται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες: τη δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης και αυτή της β-γαλακτοσιδάσης. Βάσει των αποτελεσμάτων και των δύο δοκιμασιών, εξάγονται οι τιμές σε κανονικοποιημένη μορφή.

A) Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR, καθώς βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες GRE αλληλουχίες. Χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες που αφορούν τη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος στηρίζεται στην ανίχνευση φωτός που παράγεται από την οξείδωση της χρωστικής λουσιφερίνη, σύμφωνα με την αντίδραση χημειοφωταύγειας:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια και καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση, παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή τα Ca^{2+} . Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Πειραματική διαδικασία:

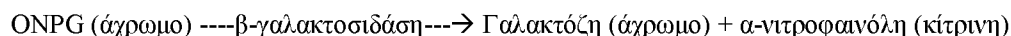
Έπεται της διαδικασίας της διαμόλυνσεως (βλέπε § 3.2.3.8 «Παροδική διαμόλυνση κυττάρων»). Όγκος 20 μL από το κυτταρικό εκχύλισμα κάθε δείγματος αναμειγνύεται με 100 μL διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης είναι φωτοευαίσθητο και συνίσταται από 470 μM λουσιφερίνη, 530 μM ATP, 270 μM συνενζύμου A, 20 mM Tris pH 8.0, 2.67 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, και dH_2O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου.

B) Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν υπόκειται σε έλεγχο μεταγραφής από τον GR. Προσδιορίζεται η ενεργότητά της ούτως ώστε να είναι εφικτή η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου της GRE-λουσιφεράσης.

Αρχή της μεθόδου:

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



Η αντίδραση καταστέλλεται με προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση απενεργοποιείται και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος [Miller, 1972].

Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm.

Πειραματική διαδικασία:

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Bengs και Leonhardt [2000] και έπεται της μεθόδου της διαμόλυνσης (βλέπε § 3.2.3.8 «Παροδική διαμόλυνση κυττάρων»). Όγκος 20 μL κυτταρικού εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα αναμειγνύεται με 0.3 μL διαλύματος ιόντων Mg^{2+} 100 \times και 201 μL διαλύματος sodium phosphate, δουλεύοντας στην εστία. Το διάλυμα ιόντων Mg^{2+} αποτελείται από 31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v MgCl_2 και 58.5 % v/v ddH₂O. Τελευταίο προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, όγκου 66 μL . Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος (30 min – O/N). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μL διαλύματος Na_2CO_3 1 M. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm, αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του μηχανήματος με τον τυφλό σωλήνα. Ο τυφλός σωλήνας περιέχει ό,τι και τα υπόλοιπα διαλύματα με τη διαφορά πως αντί για δείγμα έχουν προστεθεί 20 μL από το χρησιμοποιηθέν Lysis Buffer.

3.2.13. Ανοσοκυτταροχημεία – Ανοσοιστοχημεία

Με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας γίνεται ο προσδιορισμός βιολογικών μορίων σε καλλιέργειες κυττάρων. Στηρίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος.

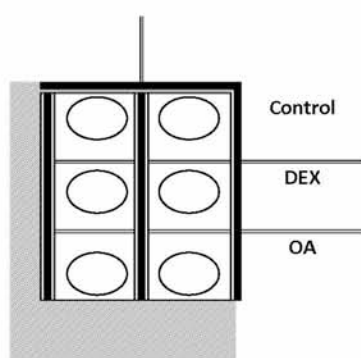
Πειραματική διαδικασία:

Σε 6 wells ενός 24×wells-plate τοποθετούνται καλυπτρίδες coverslips (1 coverslip / well) και το well αποστειρώνεται με $2 \times$ εκπλύσεις με EtOH 70% (χημική απολύμανση) και έκθεση σε UVακτινοβολία για 30 min (αποστείρωση με ακτινοβολία). Η πλάκα ανάπτυξης κυττάρων (plate)τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου (37 °C, 5 % CO₂) μέχρι την ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου.

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Ημέρα 0: Σε κάθε well της πλάκας ανάπτυξης τοποθετούνται 5×10^4 (10×10^4 cells/mL) κύτταρα HeLa σε εμπλουτισμένο (με FBS, L-Glut και P/S) θρεπτικό μέσο DMEMw/ P.R., H.G. και αφήνονται προς ανάπτυξη για 48 h στον κλίβανο (37 °C, 5 % CO₂).

Ημέρα 2: Γίνεται επώαση των HeLa με τις ουσίες DEX(1μM) και το μείγμα ουσιών DEX(1μM)και OA(10μM), σε πλήρες θρεπτικό υλικό cis DMEMw/oP.R., H.G. για ≥ 48 h.



Εικόνα 3.3. Τα κύτταρα HeLa αναπτύσσονται επάνω σε καλυπτρίδες coverslips. Τα πηγάδια (wells) στην πλάκα ανάπτυξης διαχωρίζονται ανάλογα με την κατεργασία που θα υποστούν τα κύτταρα. Χωρίζονται ανά ζεύγη σε κύτταρα Control, κύτταρα που εκτέθηκαν σε DEX 1μM και σε κύτταρα που εκτέθηκαν στο OA 10 μM, αντίστοιχα.

Ημέρα5: Τα κύτταρα επωάζονται για 30 min στους 37 °C με 200 nM ζωτικής χρωστικής CMX(1:5000), η οποία ενσωματώνεται μόνο από βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων κι έπειτα εφαρμόζεται το πρωτόκολλο μονιμοποίησης. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS κι ακολουθεί η μονιμοποίησή τους με έκθεση σε μεθανόλη (MeOH) στους -20 °C για 10 min. Κατόπιν, γίνεται επώαση με ακετόνη για 2 min στους -20 °C κι ακολουθούν 2× εκπλύσεις με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS.

Σε επόμενο βήμα, πραγματοποιείται επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR (30 µL/well)σε αναλογία 1:50 με PBS-T (1×, σε ddH₂O) για 1 h, σε R.T., απουσία φωτός.

Γίνονται 2× εκπλύσεις σε PBS για 5 min σε R.T., στο σκοτάδι και έπεται επώαση (1 h, R.T., απουσία φωτός) με τα δευτερογενή αντισώματα anti-rabbitAlexa 488σε αναλογία 1:500 με PBS-T (1×, σε ddH₂O) και Hoechst33342 σε τελική συγκέντρωση 1 µg/mLμετά από αραίωση 1:1000 αρχικού διαλύματος 1 mg/mL.

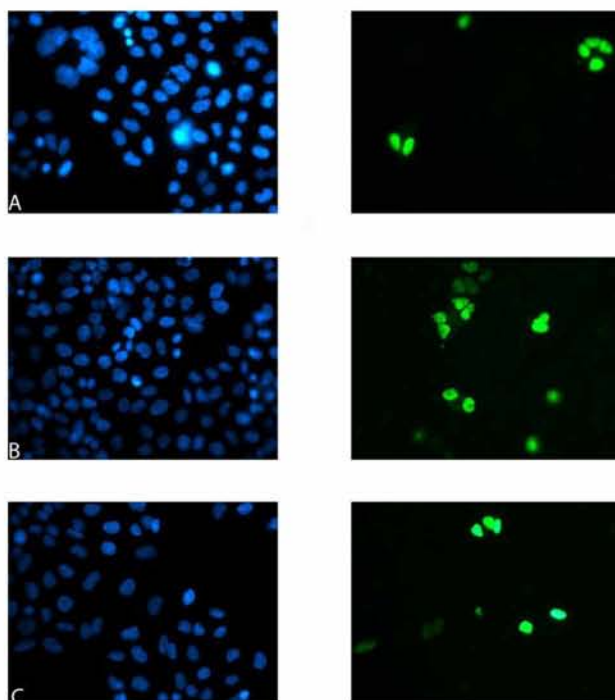
Πραγματοποιούνται 2× εκπλύσεις σε PBSγια 5 min σε R.T., στο σκοτάδι και ακολούθως τα coverslipsκαλύπτονται με το διάλυμα PVA και μεταφέρονται σε καλυπτρίδα όπου και μονιμοποιούνται. Οι καλυπτρίδες φυλάγονται στους 4 °C απουσία φωτός.

Σε μετέπειτα χρόνο τα δείγματα αναλύονται σε διάφορες μεγεθύνσεις με μικροσκόπιο φθορισμού DM 2000 της εταιρείας LEICA, εξοπλισμένο με κάμεραDFC420C-234422307 και 2°/3°-φθάλμιους φακούς 11501500 PhototubeHCL1T 4/5/7 Manual-Tube (1-POS), προσοφθάλμιο φακό 11507807 EyepieceHCPLAN 10×/22 Br. MVISUAL και αντικειμενικούς φακούς NPLAN.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλογή συνθηκών διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων HeLa.

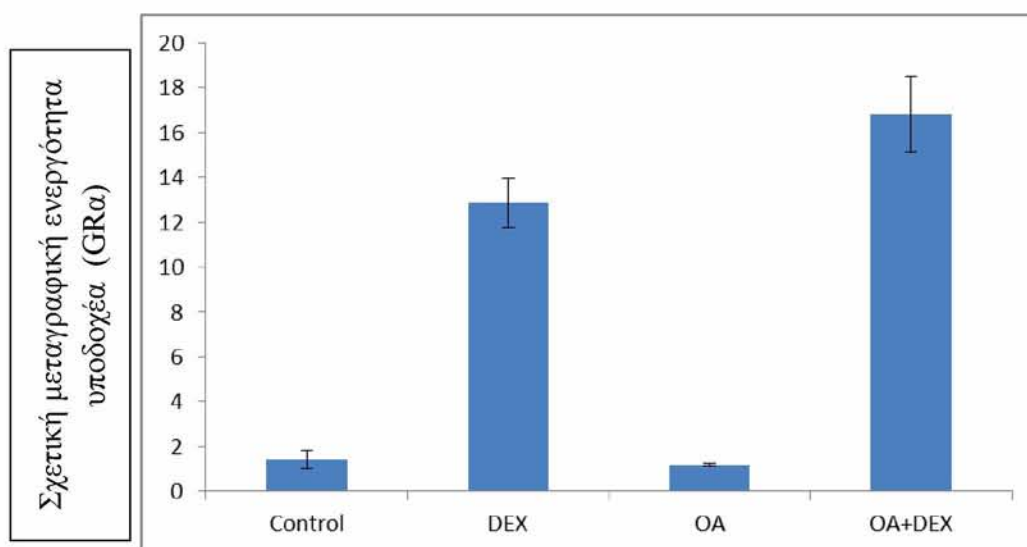
Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων HeLa, αναπτύξαμε κύτταρα σε καλυπτρίδες τοποθετημένα σε wells από 24xwell plate (Τρυβλίο ανάπτυξης κυττάρων είκοσι τεσσάρων θέσεων). Για τη διαμόλυνση των καρκινικών κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες αναλογίες CaCl_2 : pDNA, και εναλλακτικά αυξανόμενες αναλογίες λιποφεκταμίνης: pDNA. Το pDNA που χρησιμοποιήσαμε ήταν το pEGFP2 ώστε να είναι δυνατή η γρήγορη ταυτοποίηση του ποσοστού διαμόλυνσης με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού και για τη σήμανση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Hoechst (χαρακτηριστικό κυανό χρώμα). Για την παροδική διαμόλυνση των HeLa επιλέχθηκε η διαμόλυνση με CaCl_2 (αναλογίας CaCl_2 : pDNA 3:1).



Εικόνα 4.1. Έλεγχος αποτελεσματικότητας δοκιμασιών βελτιστοποίησης μετασηματισμού καρκινικών κυττάρων HeLa με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Στην εικόνα A παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της διαμόλυνσης καρκινικών κυττάρων HeLa με CaCl_2 σε αναλογία CaCl_2 : pDNA (1:1). Ομοίως, στην εικόνα B παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της διαμόλυνσης καρκινικών κυττάρων HeLa με CaCl_2 σε αναλογία CaCl_2 : pDNA (3:1) και στην εικόνα C παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της διαμόλυνσης καρκινικών κυττάρων HeLa με lipofectamine σε αναλογία lipofectamine: pDNA (0,5:1).

4.2. Επίδραση του Ολεανολικού οξέος (OA) στη ρύθμιση της δραστηριότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) σε HeLa κύτταρα.

HeLa κύτταρα, τα οποία διαμολύνθηκαν παροδικά με κατάλληλα πλασμίδια ώστε να φέρουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν την έκφραση της βήτα γαλακτοσιδάσης και γονιδίου αναφοράς λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο υποκινητή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, επώαστηκαν 72 ώρες με υλικό ανάπτυξης απουσία του δείκτη κόκκινο της φαινόλης και εμπλουτισμένου με 10% FBS κατάλληλα κατεργασμένου για την απομάκρυνση στεροειδών ορμονών. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες με υλικό ανάπτυξης στο οποίο είχε προστεθεί 1μM DEX, 12 μM oleanolic Acid, όπως και 1/500 DMSO και 1/1000 EtOH ως τυφλό δείγμα (δείγμα αναφοράς). Μετά τη συλλογή και λύση των κυττάρων ακολούθησε προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας λουσιφεράσης και βήτα γαλακτοσιδάσης για τον προσδιορισμό της γλυκοκορτικοειδικής δράσης του OA στον ενδογενή υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών των κυττάρων HeLa. Η δραστηριότητα της βήτα γαλακτοσιδάσης αξιολογείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού ενεργότητας της λουσιφεράσης.



Εικόνα 4.2. Επίδραση του ολεανολικού οξέος (OA) στην ενεργότητα του GRα σε HeLa κύτταρα. Όπως αναμενόταν παρατηρούμε στατιστικώς σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του GRα παρουσία DEX και ενίσχυση αυτής της δραστηριότητας παρουσία και του ολεανολικού οξέος.

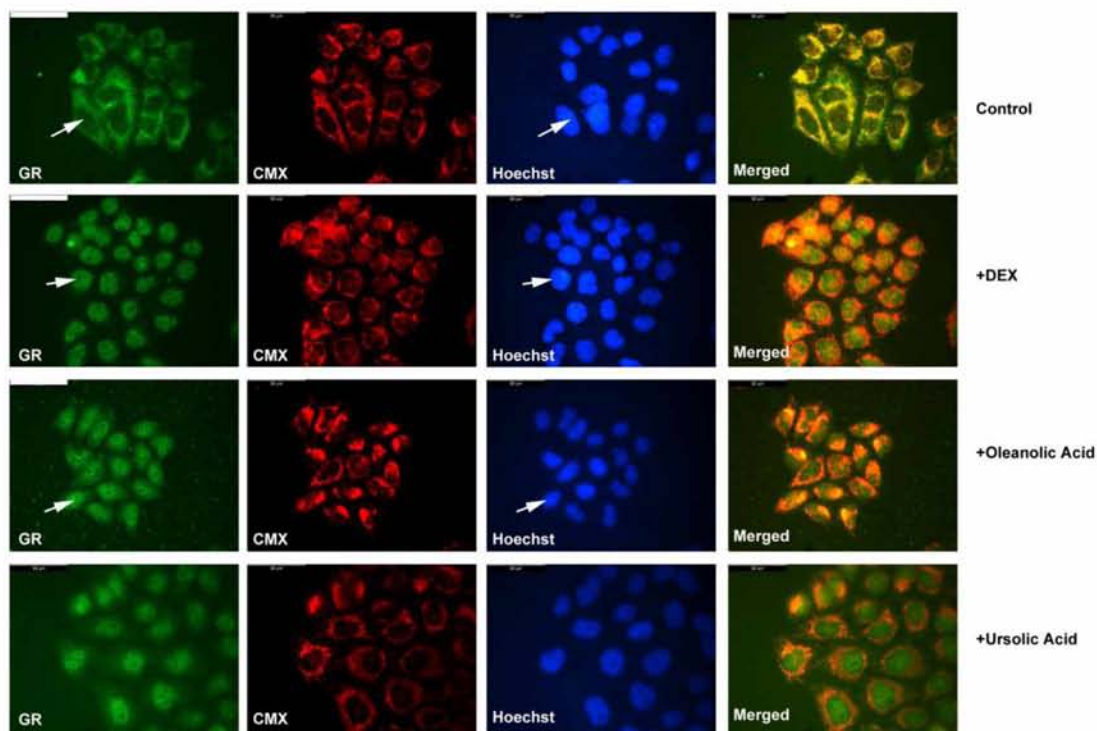
Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε βλέπουμε από την παραπάνω εικόνα ότι δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας

του GR παρουσία του Ολεανολικού οξέως. Ταυτόχρονη παρουσία όμως του ολεανολικού οξέως και δεξαμεθαζόνης, οδήγησε σε ενίσχυση της από δεξαμεθαζόνη επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής ενεργότητας του GR. Όπως αναμενόταν επώαση των κυττάρων με DEX οδήγησε σε ενεργοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, κατά περίπου 10 φορές.

4.3. Έλεγχος της επίδρασης του ολεανολικού οξέος (OA) και ουρσολικού οξέος στην ενεργοποίηση της υποκυτταρικής μετακίνησης του υποδοχέα GR με τη μέθοδο ανοσοκυτταροχημείας.

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν επάνω σε καλυπτρίδες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ερυθρό της φαινόλης και από ζωάνθρακα απενεργοποιημένο ορό (cis-FBS) για ~48 h. Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις ουσιών DEX και OA για 2 ώρες .

Αφού επώαστηκαν με την κόκκινη χρωστική CMXRos, η οποία ενσωματώνεται μόνο σε ενεργά μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με MeOH-Acetone και ακολούθως επώαστηκαν με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν τα δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (πράσινο) και Hoechst 33342 (μπλε χρωστική για τη σήμανση του πυρήνα) για την ανίχνευση και εντοπισμό πρώτου αντισώματος και πυρήνων, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.3. Μελέτη υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών υπό την επίδραση 1 μ M DEX και 12 μ M OA και 12 μ M ουρσολικού οξέος σε κυττάρα HeLa. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε καλλιεργητικό υλικό απουσία ορμονών για 48 hrs και στην συνέχεια επώαστηκαν με τις υπό εξέταση ουσίες για 2 hrs παρουσία της χρωστικής CMXRos. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε MeOH-Acetone και επώαστηκαν σε πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR, με επακόλουθη επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG και Hoechst 33342. Κόκκινη χρώση των μιτοχονδρίων (CMX). Πράσινη χρώση του GR. Μπλε χρώση του πυρήνα (Hoechst).

Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε βλέπουμε από την παραπάνω εικόνα ότι υπάρχει διαφοροποίηση στην εμφάνιση των κυττάρων.

Σε ανερέθιστα κύτταρα μάρτυρες (Control), τα οποία αναπτύσσονται σε κατάλληλα κατεργασμένο υλικό ανάπτυξης, απουσία ορμόνης παρατηρούμε, όπως αναμενόταν, απουσία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από τον πυρήνα και παρουσία του στο κυτταρόπλασμα, σε ανενεργή μορφή. Παρουσία DEX, που είναι συνθετικό γλυκοκορτικοειδές με ανάλογες δράσεις με τα GCs και χαμηλό κόστος παρατηρούμε, όπως αναμενόταν, ενεργοποίηση του υποδοχέα και μετακίνησή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Στα κύτταρα που επωάζονται παρουσία του ολεανολικού οξέος, με δομή ανάλογη αυτήν της DEX, παρατηρούμε ότι επάγεται μετακίνηση του GR από το κυτταρόπλασμα στους πυρήνες. Παρότι το ποσοστό του υποδοχέα στον πυρήνα είναι μικρότερο αυτού των κυττάρων που έχουν επωαστεί με DEX, η μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα παρουσία ολεανολικού οξέως

υποδηλώνει ενεργοποίηση της δράσης του. Όμοια και μάλιστα πιο αποτελεσματική είναι και η επίδραση του ουρσολικού οξέος στην υποκυταρική μετακίνηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε HeLa κύτταρα (Εικόνα 4.3).

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GRs) ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα στους υποδοχείς στερεοειδών ορμονών. Από τις δύο μορφές του υποδοχέα GRάλφα και GRβήτα μόνο η άλφα μορφή είναι μεταγραφικά ενεργή (GR). Ο τρόπος δράσης του GR, είναι τόσο ως μεταγραφικός παράγοντας (γενωμική οδός) αλληλεπιδρώντας απευθείας με γονίδια-στόχους στον πυρήνα ή και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όσο και μη γενωμικός, σηματοδοτώντας τη μεταγωγή γρήγορων κυτταρικών αποκρίσεων που δεν διαμεσολαβούνται μέσω των πυρηνικών υποδοχέων. Έτσι, ο GR είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση μιας πληθώρας ζωτικών διεργασιών, όπως της γλυκονεογένεσης, του μεταβολισμού των πρωτεϊνών και των λιπιδίων, της απόπτωσης, της φλεγμονής και πολλών άλλων διεργασιών. Ο GR ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοειδή καθώς και από επιλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), οι οποίοι αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μορίων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην φαρμακευτική/κλινική λόγω της επιλεκτικής επίδρασής τους στον GR. Έτσι, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση και η ταυτοποίηση της δράσης νέων SEGRAs. Με βάση αυτό τον προσανατολισμό, η έρευνα έχει στραφεί και στη μελέτη φυτικής προέλευσης ουσιών, καθώς διάφορες οικογένειες αυτών, όπως τα τερπένια και οι στερόλες εμφανίζουν αξιοσημείωτη επίδραση στους υποδοχείς στερεοειδών. Έτσι, μελέτες απέδειξαν ότι δυο τριτερπενοειδή, το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ, εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Επίσης, ρυθμίζουν διάφορα μεταβολικά σύνδρομα όπως υπερλιπιδαιμίες και έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση. Έτσι, στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση του ολεανολικού οξέως και του ουρσολικού οξέως στη ρύθμιση της δραστηριότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ώστε να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως εν δυνάμει εκλεκτικοί ρυθμιστές της δράσης των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών, αξιοποιούμενα για τις θεραπευτικές φαρμακευτικές δράσεις τους στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

Για όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν επιλέχθηκαν τα καρκινικά κύτταρα HeLa, καθώς ενδογενώς εμπεριέχουν υψηλά επίπεδα GR και έτσι ενδείκνυται για τη μελέτη εν δυνάμει SEGRA. Αρχικά, βελτιστοποιήθηκε η διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων HeLa και ο έλεγχος

της αποτελεσματικότητας των διαφόρων δοκιμασιών επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκε η διαμόλυνση με τη χρήση λιποσωμάτων και με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου παρουσία φωσφορικών και τελικά επιλέχθηκε η τελευταία, λόγω του υψηλότερου ποσοστού κυττάρων που ανταποκρίθηκαν θετικά στις συνθήκες αυτές διαμόλυνσης. Οι συνθήκες αυτές διαμόλυνσης εφαρμόστηκαν για τον έλεγχο της πιθανής ενεργοποίησης της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα υπό την επίδραση ολεανολικού οξέως. Έτσι, σε *in vivo* πειράματα με τη χρήση του συστήματος ελέγχου ενεργοποίησης της μεταγραφής χρησιμοποιώντας σαν γονίδιο αναφοράς το γονίδιο λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ορμονοεξαρτώμενων αλληλουχιών και γονίδιο β-γαλακτοσιδάσης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επαγωγή της μεταγραφικής ενεργότητας του GR παρουσία του ολεανολικού οξέως (συγκέντρωσης 12μM). Ταυτόχρονη παρουσία όμως του ολεανολικού οξέως και δεξαμεθαζόνης, οδήγησε σε ενίσχυση της από δεξαμεθαζόνη επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, φαινόμενο το οποίο εμφανίζεται και σε άλλους εν δυνάμει ρυθμιστές του GR, όπως στην Ενδιανδρίνη A (Kuntzsch D, et al. 2013). Επίσης, μελετήθηκε η μετακίνηση (translocation) του GR υποκυτταρικά, με τη χρήση μεθόδου ανοσοκυτταροχημείας, παρουσία τόσο του ολεανολικού όσο και του ουρσολικού οξέως. Κατά την έκθεση των κυττάρων HeLa τόσο σε ολεανολικό όσο και σε ουρσολικό οξύ, ο GR μετακινήθηκε από το κυτταρόπλασμα (όπου βρίσκεται στην ανενεργή του κατάσταση) προς τον πυρήνα, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση του GR και την πιθανή ενεργοποίηση της γενωμικής οδού του GR από τα δυο τριτερπενοειδή. Έτσι, αναδεικνύεται η δράση των τερπενοειδών στην ενεργοποίηση και τη δραστηριότητα του GR, καθιστώντας τα πιθανώς αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Φυσικά, εκκρεμεί η περαιτέρω διερεύνηση των μορίων αυτών και συγκεκριμένα η διερεύνηση τη ακριβή μοριακού μηχανισμού δράσης τους και ο χαρακτηρισμός της εκλεκτικής ή μη ενεργοποίησης των βιοχημικών οδών στόχων που επηρεάζονται κατά αναλογία από τις στεροειδής ορμόνες.

Βιβλιογραφία

- Abe I. (2007). Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1311-1331.
- Abe I., Rohmer M., Prestwich G.D. (1993). Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem. Rev.*, 93, 2189-2206.
- Alberts, Bray, Hopkins, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. (2006). Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. 2η έκδοση. BROKEN HILL PUBLISHERS LTD.
- Andrikopoulos N.K., Kaliora A.C., Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P. (2003). Biological activity of naturally occurring resins, gums and pigments against the in vitro LDL oxidation. *Phytother Res.* 17: 501-507.
- Aranda A., Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, 81(3), 1269-1304.
- Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72, 435–457.
- Baisted D.J. (1971). Sterol and Triterpene Synthesis in the Developing and Germinating Pea Seed. *Biochem. J.* 124, 375-383.
- Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H.M., Schibler U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289(5488), 2344-2347.
- Bamberger C.M., Bamberger A.M., de Castro M., Chrousos G.P. (1995). Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* ;95:2435-41.

Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 17(3):245-61.

Baricevic D., Sosa S., Della Loggia R., Tubaro A., Simonovska B., Krasna A., Zupancic A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2), 125-132.

Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56, 335–344.

Benveniste P. (2004). Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 429-457.

Belvisi M.G., Wicks S.L., Battram C.H., Bottoms S.E., Redford J.E., Woodman P., Brown T.J., Webber S.E., Foster M.L. (2001). Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *J Immunol.* 166(3): 1975-82.

Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Consler T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M. et al., (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 110: 93–105.

Bolt R.J., Van Weissenbruch M.M., Lafeber H.N., Delemarre-van de Waal H.A. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol.* 32(1):76-91.

Bourguet W., Germain P., Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: threedimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, *Trends Pharmacol Sci.* 21, 381-388.

Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Salehi Surmaghi M.H., Shams-Ardekani M.R., Rahimi R. (2013). Five Pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): A Review of Their Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal*.

Brent G.A. (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *N. Engl. J. Med.* 331, 847–853.

Breslin M.B., Geng C.-D., Vedeckis V.W. (2001). Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology*. 15:1381-1395.

Callaway E. (2013). Most popular human cell in science gets sequenced. *Nature*. doi:10.1038/nature.2013.12609.

Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.A., Poellinger L, Okret S., Wikström A.C., Brönnegård M., Cintra A. (1987). Biochemistry, molecular biology, and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine reviews*. 8(2), 185.

Castellano J.M., Guinda A., Delgado T., Rada M., Cayuela J.A. (2013). Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62:1791–1799

Chappell J. (2002) The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 151-157.

Chawla A., Repa J. J., Evans R. M., and Mangelsdorf D. J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files, *Science*. 294, 1866-1870.

Cheng A., Lou Y., Mao Y., Lu S., Wang L., Chen X. (2007). Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J. Integrative Plant Biol.* 49, 179-186.

Chinenov Y., Gupte R., Dobrovolna J., Flammer J.R., Liu B., Michelassi F.E. (2012). Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci*;109:11776-81.

Chung S., Yoon H.E., Kim S.J., Kim S.J., Koh E.S., Hong Y.A., Park C.W., Chang Y.S., Shin S.J. (2014). Oleanolic acid attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction via facilitating nuclear translocation of Nrf2. *Nutrition & metabolism* 11.1: 2.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B., Grissem W., Jones R. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of the plants*. Rockville M.D. American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1318.

Croxtall J., Choudhury Q., Flower R.J. (2000). Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol*;130:289-98.

Daban C., Vieta E., Mackin P., Young A.H. (2005). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 28(2):469-80.

De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* 24:488–522.

Dehm S.M., Tindall D.J. (2007). Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol. Endocrinol.* 21, 2855–2863.

Duma D., Collins J.B., Chou J.W., Cidlowski J.A. (2010). Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence. *Sci Signal*;3:ra74.

Duma D., Jewell C.M., Cidlowski J.A. (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 11–21.

Faus H., Haendler B. (2006). Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed. Pharmacother.* 60, 520–528.

Frego L., Davidson W. (2006). Conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the location of cofactor binding sites determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Science*. Volume 15, Issue 4: 722-730.

Frighetto R.T., Welendorf R.M., Nigro E.N., Frighetto N., Siani A.C. (2008). Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 106(2), 767-771.

Gehring U., Segnitz B., Foellmer B., Francke U. (1985). Assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor to chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:3751–3755.

Giguère V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor *Cell*. Volume 46, Issue 5; 645-652

Gilbert S.F. (2003). Developmental biology. <http://en.wikipedia.org>

Grandmougin-Ferjani A., Dalpe Y., Hartmann M.A., Laruelle F., Sancholle M. (1999). Sterol distribution in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* 50, 1027-1031.

Groeneweg F.L., Karst H., de Kloet E.R., Joels M. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*;350:299-309.

- Gross K.L., Cidlowski J.A. (2008). Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab*;19(9):331-9.
- Grünfeld J.P., Eloy L. (1987a). Role of glucocorticoids in the regulation of blood pressure [Article in French]. *Presse Med.* 16 (28): 1365-7.
- Grünfeld J.P., Eloy L. (1987b). Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Journal Hypertension.* 10(6):608-18.
- Grünfeld J.P. (1990). Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Hormone Research in Paediatrics*, 34(3-4), 111-113.
- Gupta P.B.B., Lalchandama K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current Science.* Vol. 83, No. 9, 1103-1111.
- Heck S., Bender K., Kullmann M., Göttlicher M., Herrlich P., Cato A.C. (1997). I κ B α -independent downregulation of NF- κ B activity by glucocorticoid receptor. *The EMBO journal*, 16(15), 4698-4707.
- Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Strom A., Treuter E., Warner M., and Gustafsson J.A., (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931.
- Hernandez L.E., Cooke D.T. (1996). Lipid composition of symbiosomes from pea root nodules. *Phytochemistry* 42, 341-346.
- Hittelman A.B., Rogatsky I., Pearce D., Garabedian M.J. (1999). Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Molecular and cellular biology.* 19(7), 5036-5049.
- Hollenberg S.M., Weinberger C., Ong E.S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E.B., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1985). Primary structure and expression fo a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 318:635–641.

- Horiuchi K., Shiota S., Hatano T., Yoshida T., Kuroda T., Tsuchiya T. (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1147-1149.
- Huhman D.V., Berhow M.A., Sumner L.W. (2005). Quantification of Saponins in Aerial and Subterranean Tissues of *Medicago truncatula*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1914-1920.
- Iturbe-Ormaetxe I., Haralampidis K., Papadopoulou K., Osbourn A.E. (2003). Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology* 51, 731–743.
- Jagla M., Feve M., Kessler P., Lapouge G., Erdmann E., Serra S., Bergerat J.P., Ceraline J. (2007). A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology* 148, 4334–4343.
- Jakob M., Kolodziejczyk R., Orlowski M., Krzywda S., Kowalska A., Dutko-Gwozdz J., Gwozdz T., Kochman M., Jaskolski M., Ozyhar A. (2007). Novel DNA-binding element within the C-terminal extension of the nuclear receptor DNA-binding domain *Nucleic Acids Research*, 1 -14 doi:10.1093/nar/gkm162.
- Jang J. C., Fujioka S., Tasaka M., Seto H., Takatsuto S., Ishii A., Aida M., Yoshida S., Sheen J. (2000). A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 14:1485-1497.
- Jenkins B.D., Pullen C.B., Darimont B.D., (2001). Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*;12:122-6.
- Jewell C.M., Cidlowski J.A. (2007). Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*;92:3268-77.

Jones K.A., Kadonaga J.T. (2000). Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes Dev.* 14(16):1992-1996.

Juven-Gershon T., Hsu J.Y., Theisen J.W., Kadonaga J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 20(3):253-259

Kaliora A.C., Mylona A., Chiou A., Petsios D.G., Andrikopoulos N.K. (2004). Detection and identification of simple phenolics in *Pistacia lentiscus* resin. *J. Liq. Chromatogr & Rel Technol.* 27: 289-300.

Kappers I.F., Aharoni A., Van Herpen T., Luckerhoff L., Dicke M., Bouwmeester H.J. (2005). Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science* 309, 2070-2072.

Kauppi B., Jakob C., Färnegårdh M., Yang J., Ahola H., Alarcon M., Calles K., Engström O., Harlan J., Muchmore S., Ramqvist A.K., Thorell S., Ohman L., Greer J., Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Carlquist M. (2003). The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem.* 278(25):22748-22754.

Kino T., Manoli I., Kelkar S., Wang Y., Su Y.A., Chrousos G. P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 671–675.

Kino T., Su Y.A., Chrousos G.P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3435–3448.

Kino T., Tiulpakov A., Ichijo T., Chheng L., Kozasa T., Chrousos G. P. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J. Cell Biol.* 169, 885–896.

- Kobayashi S., Shibata H., Kurihara I., Saito I., Saruta T. (2002). CIP-1 is a novel corepressor for nuclear receptor COUP-TF: a potential negative regulator in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res.* 28(4):579.
- Kumar R., Thompson E.B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 383–394.
- Kuntzsch D., Bergann T., Dames P., Fromm A., Fromm M., Melzig M.F., Schulzke J.D. (2013). The plant-derived glucocorticoid receptor agonist Endiandrin A acts as co-stimulator of colonic epithelial sodium channels (ENaC) via SGK-1 and MAPKs, *Journal.pone.0049426*.
- Landry J.J., Pyl P.T., Rausch T., Zichner T., Tekkedil M.M., Stütz A.M., Jauch A., Aiyar R.S., Pau G., Delhomme N., Gagneur J., Korbel J.O., Huber W., Steinmetz L.M. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* 3 (8): 1213–24.
- Lanzotti V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 3-22.
- Lazar M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 14, 184–193.
- Leader J.E., Wang C., Fu M., Pestell R.G. (2006). Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1589–1596.
- Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. (2013). Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Inflammation* 36.1: 94-102.
- Lewin (2004). Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. *Genes VIII*.
- Lewis-Tuffin L.J., Cidlowski J.A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1069:1-9.

- Li J.M., Nagpal P., Virtal V., McMorris T.C., Chory J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272, 398-401.
- Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.F. (2003). Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signaling. *Trends Plant Science* 8, 521-525.
- Liby K.T., Yore M.M., Sporn M.B. (2007). Triterpenoids and retinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(5), 357-369.
- Liu J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of ethnopharmacology* 49.2: 57-68.
- Lonard D.M., O'Malley B.W. (2005). Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci*;30:126-32.
- Long C.N.H., Katzin B., Fry E.G. (1940). The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinol.* 26: 309-344.
- Lösel R., Wehling M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 46-55.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* Jun;16(6):301-7.
- Lu N.Z., Cidlowski J.A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell.* 18, 331–342.
- Luisi B.F., Xu W., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Sigler P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA.

Macfarlane D.P., Forbes S., Walker B.R. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 197(2):189-204.

Mahato S.B., Sarkar S.K., Poddar G. (1988). Triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 27, 3037-3067.

Maimone T.J., Baran P.S. (2007). Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nat. Chem. Biol.* 3, 396-407.

Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A., Evans R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature.* 345;224-229.

Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *PubMed.* Dec. 15;83(6):835-9

Mangos J.G., Whitworth A.J., Williamson M.P., Kelly J.J. (2003). Glucocorticoids and the kidney. *Nephrology.* 8: 267-273.

Marner F.J., Freyer A., Lex J. (1991). Triterpenoids from mastic, the resin of *Pistacia lentiscus*. *Phytochemistry* 30: 3709-3712.

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. *Mol Endocrinol*;22:1320-30.

McKay L.I., Cidlowski J.A. (2000). CBP (CREB binding protein) integrates NF- κ B (nuclear factor- κ B) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol. Endocrinol.* 14,1222–1234.

McKay L.I., Cidlowski J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine reviews*, 20(4), 435-459.

- McNally J.G., Muller W.G., Walker D., Wolford R., Hager G.L. (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*;287:1262-5.
- Melvin V.S., Harrell C., Adelman J.S., Kraus W.L., Churchill M., Edwards D.P. (2004). The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. *J. Biol.Chem.* 279, 14763- 14771.
- Melvin V.S., Roemer S.C., Churchill M.E., Edwards D.P. (2002). The C-terminal extension (CTE) of the nuclear hormone receptor DNA binding domain determines interactions and functional response to the HMGB-1/-2 co-regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 277:25115-25124.
- Mersmann H.J., Segal H. L. (1969). Control Mechanisms and Biochemical Genetics: Glucocorticoid Control of the Liver Glycogen Synthetase-activating System. *J. Biol. Chem.* 244:1701-1704.
- Miner J.N. (2002). Designer glucocorticoids. *Biochemical pharmacology*, 64(3), 355-361.
- Morand E.F., Leech M. (1999). Glucocorticoid regulation of inflammation: the plot thickens. *Inflamm Res.* 48(11):557-60.
- Murata T., Miyase T., Muregi F.W., Naoshima-Ishibashi Y., Umehara K., Warashina T., Kanou S., Mkoji G.M., Terada M., Ishin A. (2008). Antiplasmodial terpenoid from *Ekebergia capensis*. *J. Plant Nat. Prod.* 71, 167-174.
- Narlikar G.J., Fan H.Y., Kingston R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* 108(4):475-487.
- Nelson D.L., Lehninger A.L., Cox M.M. (2008). Principles of biochemistry. WH Freeman Publishers.

- Nes W.D., Heftmann E. (1981). A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *J. Nat. Prod.* 44, 377-400.
- Nissen R.M., Yamamoto K.R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyterminal domain. *Genes Dev*;14:2314-29.
- Nomura M., Morohashi K., Kirita S., Nonaka Y., Okamoto M., Nawata H., Omura T. (1993). Three forms of rat CYP11B genes: 11 beta-hydroxylase gene, aldosterone synthase gene, and a novel gene. *J Biochem.* 113(2):144-52.
- Oakley R.H., Cidlowski J.A. (2011). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry.* 286, 3177-3184.
- Oakley R.H., Sar M., Cidlowski J.A. (1996). The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J. Biol. Chem.* ;271:9550-9.
- Oliveira F.A., Chaves M.H., Almeida F.R.C., Lima R.C.P., Silva R.M., Maia J.L., Brito G.A.A.C., Santos F.A., Rao V.S. (2005). Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Ethnopharmacol.* 98, 103-108.
- Osborn A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.
- Osborn A.E. (2003). Saponins in cereals. *Phytochemistry* 62, 1-4.
- Osborn A.E. Goss R.J.M., Field R.A. (2011). The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1261-1268.

- Otte K., Kranz H., Kober I., Thompson P., Hoefler M., Haubold B. (2003). Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* 23(3):864-72.
- Ovesná Z., Kozics K., Slameňová D. (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 131-137.
- Papageorgiou V.P., Bakola-Christianopoulou M.N., Apazidou K.K., Psarros E.E. (1997). Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J. Chromatogr. A.* 769: 263-273.
- Papadopoulou K.K., Melton R.E., Leggett M., Daniels M.J., Osbourn A.E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* 96, 12923–12928.
- Pathak A.K., Bhutani M., Nair A.S., Ahn K.S., Chakraborty A., Kadara H., Guha S., Sethi G., Aggarwal B.B. (2007). Ursolic acid inhibits STAT3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Research*, 5(9), 943-955.
- Phillips D.R., Rasbery L.M., Bartel B., Matsuda S.P.T. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 305–314.
- Picard D., Yamamoto K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO journal.* 6(11), 3333.
- Price K.R., Johnson L.T, Fenwick G.R. (1987). The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. *CRC Critical Review Food Science and Nutrition* 26, 27-135.
- Psarra A.M.G., Sekeris C.E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB life*, 60(4), 210-223.

Psarra A.M.G., Sekeris C.E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(1), 1-11.

Psarra A.M.G., Solakidi S., Sekeris C.E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and cellular endocrinology* 246.1: 21-33.

Psarra A.M.G., Solakidi S., Trougakos I.P., Margaritis L.H., Spyrou G., Sekeris C.E. (2005). Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(12), 2544-2558.

Psarra A.M.G., Sekeris C.E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(5), 431-436.

Psarra A.M.G., Sekeris C.E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(10), 1814-1821.

Stahn C., Lowenberg M., Hommes D.W., Buttgerit F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists, *Molecular and Cellular Endocrinology*, doi:10.1016/j.mce.2007.05.019

Qi D., Rodrigues B. (2007). Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(3), E654-E667.

Rahbari R., Sheahan T., Modes V., Collier P., Macfarlane C., Badge R.M. (2009). A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line Identification. *BioTechniques* 46 (4): 277-84.

Rastinejad F., Perlmann T., Evans R.M., Sigler P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*. 375:203-211.

Reichardt M.H., Schütz G. (1998). Glucocorticoid signalling—multiple variations of a common theme. *Molecular and cellular endocrinology*, 146(1), 1-6.

Reichardt M.H., Tuckermann P.J., Bauer A., Schütz G. (2000). Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Zeitschrift für Rheumatologie*. Volume 59, Issue 2 Supplement, pp S1-S5.

Reid I.R. (1998). Glucocorticoid Effects on Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 83 no. 6: 1860-1862.

Ro D.K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Keasling J.D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440(7086), 940-943.

Robinson-Rechavi M., Escriva Garcia H., Laudet V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci*. 116(Pt 4):585-586.

Rosenfeld M.G., Glass C.K. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*;276:36865-8.

Rogatsky I., Ivashkiv L.B. (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens*;68:1-12.

Russcher H., Dalm V.A., de Jong F.H., Brinkmann A.G., Hofland L.J., Lamberts S.W., and Koper J.W. (2007), Associations between promoter usage and alternative splicing of the glucocorticoid receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 91–98.

Sainte-Marie Y., Cat A.N.D., Perrier R., Mangin L., Soukaseum C., Peuchmaur M., Jaisser F. (2007). Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block. *The FASEB Journal*,21(12), 3133-3141.

Samarasinghe R.A., Di Maio R., Volonte D., Galbiati F., Lewis M., Romero G. (2011). Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*;108:16657-62.

Samarasinghe R.A., Witchell S.F., DeFranco D.B. (2012). Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell Cycle*;11:2819-27.

Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 7(3):284-301.

Schäcke H., Döcke W.D., Asadullah K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96(1):23-43.

Schacke H., Schottelius A., Docke W.D., Strehlke P., Jaroch S., Schmees N., Rehwinkel H., Hennekes H., Asadullah K. (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 227-32.

Scheller K., Seibel P., Sekeris, C.E. (2003). Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 222, 1–61.

Schoneveld O.J., Gaemers I.C., Lamers W.H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 114–128.

Schreiber A.M. (2011). Visualizing and quantifying the suppressive effects of glucocorticoids on the tadpole immune system in vivo. *Advances in physiology education*, 35(4), 445-453.

Schrick K., Mayer U., Horrichs A., Kuhnt C., Bellini C., Dangl J., Schmidt J., Jurgens G. (2000). FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 14:1471-1484.

Shai L., McGaw L., Aderogba M., Mdee L., Eloff J. (2008). Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) CA Sm leaves. *J. Ethnopharmacol.* 119, 238-244.

Shan G., Walthall W.W. (2008). Copulation in *C. elegans* males requires a nuclear hormone receptor. *Dev Biol.* 322:11-20.

Sharrer T. (2006). "HeLa" Herself. *The Scientist* 20 (7): 22.

Sionov R.V., Cohen O., Kfir S., Zilberman Y., Yefenof E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 203(1), 189-201.

Smirnov A.N. (2002). Nuclear receptors: nomenclature, ligands, mechanisms of their effects on gene expression, *Biochemistry (Mosc)*. 67, 957-977.

Solito E., Mulla A., Morris J.F., Christian H.C., Flower R.J., Buckingham J.C. (2003). Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin I in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*;144:1164-74.

Sparg S.G., Light M.E., Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 219–243.

Stalmans W., Laloux M. (1978). Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monographs on endocrinology*, 12, 517-533.

Stock, C. (2013). The non-steroidal SEGRA, BAY1155975, in contrast to classical glucocorticoids, inhibits anti-CD28-costimulated T cell activation (Doctoral dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I).

Suzuki H., Achnine L., Xu R., Matsuda S., Dixon R.A. (2002). A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 32, 1033–1048.

Suzuki M., Xiang T., Ohyama K., Seki H., Saito K., Muranaka T., Hayashi H., Katsube Y., Kushiro T., Shibuya M., Ebizuka Y. (2006). Lanosterol Synthase in Dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 47, 576-571.

Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kalman Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Redei G. P., Nagy F., Schehell J., Koncz C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85, 171-182.

Tayyab Ansari M., Saeed Saify Z., Sultana N., Ahmad I., Saeed-Ul-Hassan S., Tariq I., Khanum, M. (2013). Malaria and artemisinin derivatives: an updated review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(13), 1879-1902.

Theriault A., Boyd E., Harrap B.S., Hollenberg M.S., Connor M.J. (1989). Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Human Genetics*. Volume 83, Issue 3, pp 289-291.

Tompson A., Cooper J., Ingram L.L. (2006). Distribution of terpenes in heartwood and sapwood of loblolly pine. *Forest Prod. J.* 56, 7-8.

Tsai M., O'Malley B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry* 63, no. 1: 451-486.

Tsai M., Shih J., Yin M.C. (2008). Antioxidative and Anti-Inflammatory Protection of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in PC12 Cells. *Journal of food science* 73.7: H174-H178.

Van Rossum E.F., Lamberts S.W. (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*;59:333-57.+

Vanden Heuvel J.P. (2009). Research Article Nuclear Hormone Receptors: A Brief Overview INDIGO Nuclear Receptor Resource Biosciences Inc. State College PA.

Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Manohar S., Lin C.H., Tsay S.H. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 1-22.

Vayssiere B.M., Dupont S., Choquart A., Petit F., Garcia T., Marchandeu C., Gronemeyer H., Resche-Rigon M. (1997). Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endocrinol* 11, 1245-55.

Walker R.P., Chen Z.H., Acheson R.M., and Leegood R.C. (2002). Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C4 plant Guinea grass. *Plant Physiol.* 128, 165-172.

Waller G.R., Yamasaki K. (1996). Saponins used in traditional and modern medicine. *Advance in Experimental Medicine and Biology* 404, New York, NY: Plenum Press.

Wang B., Jiang Z.H. (1992). Studies on oleanolic acid. *Chinese Pharmaceutical Journal* 27, 393-397.

Wang Y.F., Ni Z.Y., Dong M., Cong B., Shi Q.W., Gu Y.C., Kiyota H. (2010). Secondary metabolites of plants from the genus saussurea: chemistry and biological activity. *Chem. Biodivers.* 7, 2623-2659.

Wrutniak C., Cassar-Malek I., Marchal S., Rascle A., Heusser S., Keller J.M., Flechon J., Dauca M., Samarut J., Ghysdael J., Cabello G., (1995). A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* 270, 16347-16354.

Wu C.D. (2009). Grape products and oral health. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1818S-1823S.

Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D., Gronemeyer H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol.* Jan;3(1):87-94.

Xu R., Fazio G.C., Matsuda S. (2004). On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65(3), 261-291.

Yang-Yen H.F., Chambard J.C., Sun Y.L., Smeal T., Schmidt T.J., Drouin J. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*;62: 1205-15.

You Y.N., Short R.K., Jourdan M., Klaus A.K., Walrand S., Sreekumaran K.S. (2009). The Effect of High Glucocorticoid Administration and Food Restriction on Rodent Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Protein Metabolism. *PLoS ONE*. 4(4): e5283. doi:10.1371/journal.pone.0005283.