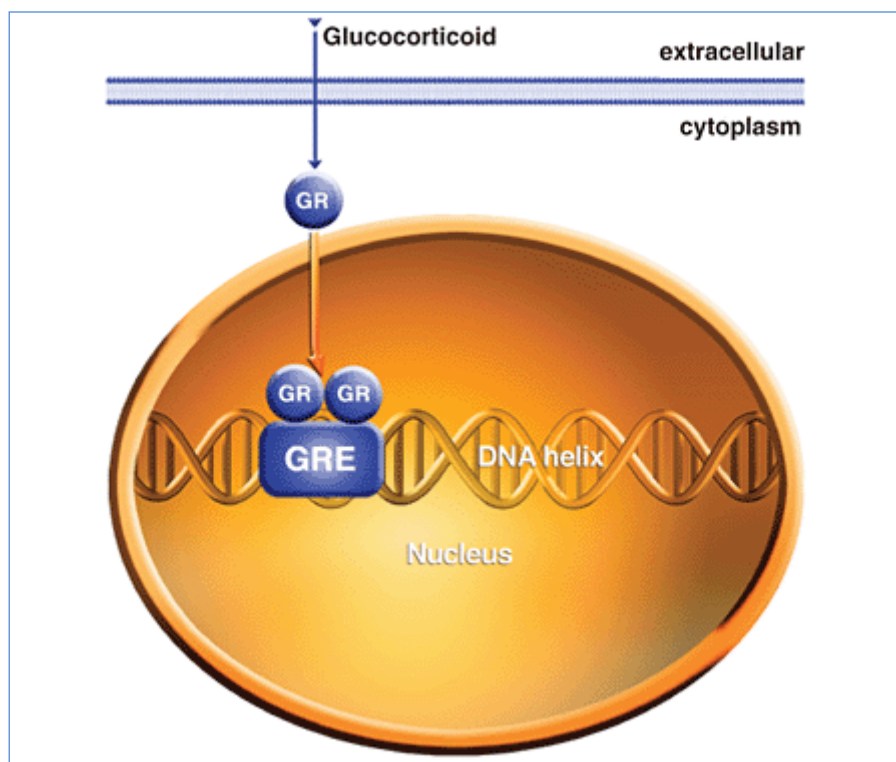




ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από το μεταγραφικό παράγοντα Prox1.



Επιμέλεια εργασίας: Κωδούνης Μιχάλης

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Άννα-Μαρία Ψαρρά

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Λέκτορας Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Λέκτορας Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.



Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.



Πολίτης Παναγιώτης, Ερευνητής Βαθμίδος Δ' στο ΙΒΕΑΑ.



Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την καθηγήτρια μου, κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόησή της, τον κύριο Δημήτριο Λεωνίδα που μου επέτρεψε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και τον κύριο Παναγιώτη Πολίτη για τη σημαντική βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα την προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Χαραλάμπους και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαλαματένια Παπαδοπούλου για τη βοήθειά τους καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας για την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, ένα ευχαριστώ αξίζει η οικογένεια μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσφέρουν.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	6
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς	6
1.1.1 Γενικά.....	6
1.1.2 Τρόπος δράσης των πυρηνικών υποδοχέων	6
1.1.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων.....	7
1.2 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (<i>Glucocorticoid Receptor-GR</i>)	9
1.2.1 Γενικά.....	9
1.2.2 Τα γλυκοκορτικοειδή	10
1.2.3 Η δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών-Ισομορφές	10
1.2.4 Λειτουργικές περιοχές Υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών	12
1.3 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	16
1.3.1 Γενικά.....	16
1.3.2 Μετακίνηση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα	17
1.3.3 Σύνδεση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στο DNA και ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης.....	17
1.3.4 Ρύθμιση της μεταγραφής: Θετική ρύθμιση της μεταγραφής.....	19
1.3.5 Ρύθμιση της μεταγραφής: Αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής	19
1.4 Βιολογικές διεργασίες που ελέγχονται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	20
1.4.1 Γενικά.....	20
1.4.2 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια: Ρόλος στη μιτοχονδριακή μεταγραφή-Παραγωγή ενέργειας.....	21
1.4.3 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης.....	23
1.4.4 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στη διαφοροποίηση σκελετικών μυϊκών και οστικών κυττάρων.....	24
1.5 Ο <i>homeobox</i> μεταγραφικός παράγοντας <i>Prox1</i> (<i>prospero-related homeobox 1</i>)	25
1.5.1 Γενικά.....	25
1.5.2 Η δομή του <i>Prox1</i>	25
1.5.3 Βιολογικός ρόλος του <i>Prox1</i> -Αναπτυξιακός ρόλος	27
1.5.4 Δράση του <i>Prox1</i> στον έλεγχο ενεργειακού μεταβολισμού.....	28

2. Σκοπός	29
3. Υλικά και Μέθοδοι	30
3.1 Υλικά	30
3.1.1 Διαλύματα	30
3.1.2 Χημικά.....	31
3.1.3 Αντισώματα.....	32
3.1.4 Κυτταρικές σειρές	33
3.1.5 Όργανα.....	33
3.2 Μέθοδοι	33
3.2.1 Διαδικασίες για καλλιέργεια κυττάρων HepG2 / HeLa	33
3.2.2 Διαμόλυνση κυττάρων HeLa με λιποφεκταμίνη	35
3.2.3 Μέθοδος λουσιφεράσης /β-γαλακτοζιδάσης	39
3.2.4 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford ...	41
3.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	42
3.2.6 Ανοσοαποτόπωση Western (Western Blot)	44
3.2.7 Ανοσοκατακρήμνιση [Immunoprecipitation (IP)] σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση protein-A beads	47
4. Αποτελέσματα	49
4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford	49
4.2 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης υποδοχέα GR και Prox1 σε HepG2 και HeLa κότταρα με ανοσοαποτόπωση	50
4.3 Διερεύνηση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στον έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR	50
4.3.1 Έλεγχος της κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR.....	51
4.3.2 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής ΔDBD στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR.....	52
4.3.3 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής PolyQ στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR.....	53
4.3.4 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής ΔNR στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR	54
4.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1	55
5. Συζήτηση	56
6. Βιβλιογραφία	60

Περίληψη

Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της βιολογικής δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας, δεδομένου του πρωταρχικού ρόλου του GR στη ρύθμιση βασικών βιολογικών διεργασιών. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη δράση του GR και η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο αυτή επιτυγχάνεται. Για τον σκοπό αυτό ελέγχθηκε η επίδραση της παρουσίας του Prox1, καθώς και ελλειμματικών περιοχών αυτού στην εκδήλωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, παρουσία ή απουσία ειδικών αγωνιστών (δεξαμεθαζόνη-DEX) και ανταγωνιστών αυτού (μπεριριστόνη-RU486), σε κύτταρα HeLa. Τα αποτελέσματα αυτής μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι ο Prox1 ασκεί κατασταλτική δράση στην έκφραση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Καμία από τις ελλειμματικές μορφές του Prox1 που μελετήθηκαν δεν παρουσίασε αναστολή της κατασταλτικής δράσης του Prox1. Οι περιοχές των οποίων η επίδραση ελέγχθηκε ήταν α) η περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA (DBD), β) η περιοχή που ευθύνεται για την κατασταλτική δράση του Prox1 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (PolyQ) και γ) η περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς (NR). Τέλος, μελετήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των μορίων GR και Prox1 με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης. Το προϊόν της ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι του GR δεν έδωσε σήμα στην ανοσοαποτύπωση Western με αντίσωμα έναντι του Prox1, υποδηλώνοντας μη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των δύο μορίων υπό τις συνθήκες του πειράματος. Παρόλα αυτά δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο έμμεσης αλληλεπίδρασης των μορίων και σχηματισμού μοριακών συμπλόκων, όπου η ευαισθησία της μεθόδου και οι συνθήκες του πειράματος να μην επιτρέπουν την ανίχνευση μικρών συγκεντρώσεων μορίου Prox1 στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης.

Ο παρατηρούμενος έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1 αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα δεδομένου ότι για πρώτη φορά παρουσιάζονται δεδομένα που υποδηλώνουν ρυθμιστική δράση του Prox1 στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μόριο με ιδιαίτερα σημαντική βιολογική δράση.

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

1.1.1 Γενικά

Κατά την εξέλιξη των οργανισμών επικράτησαν εκείνοι οι οποίοι μπόρεσαν να αναπτύξουν μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στις διαδικασίες μεταβολισμού. Αυτή η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων ήταν στην ουσία ένα πρωτόγονο ορμονικό σύστημα ελέγχου και μεταγωγής σήματος, που λειτουργούσε με σκοπό την ανάπτυξη και επιβίωση των οργανισμών. Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων διαδραματίζουν και οι πυρηνικοί υποδοχείς. Συγκεκριμένα, ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ως απόκριση στη δέσμευση μικρών λιπόφιλων μορίων και μ' αυτόν τον τρόπο εμπλέκονται στον έλεγχο μιας μεγάλης ποικιλίας κυτταρικών διαδικασιών. Ένας από τους πυρηνικούς υποδοχείς είναι και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR).

1.1.2 Τρόπος δράσης των πυρηνικών υποδοχέων

Είναι γενικά παραδεκτό ότι οι ορμόνες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση των περισσότερων φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών των θηλαστικών. Οι ορμόνες είναι χημικοί διαβιβαστές που μεταβιβάζουν το σήμα τους στα κύτταρα μέσω ειδικών μεμβρανικών και πυρηνικών υποδοχέων. Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι εξελικτικά νεότεροι από τους μεμβρανικούς γιατί περιορίζονται στα μετάζωα. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς δρουν μέσω πολύπλοκων μηχανισμών μεταγωγής σήματος που συμπεριλαμβάνουν G-πρωτεΐνες, μόρια που αποτελούν δευτέρους διαβιβαστές ή/και αρκετές κινάσες (Calberg, 2004). Αντίθετα, οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων λειτουργώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες, που ενεργοποιούνται στις περισσότερες περιπτώσεις από προσδέτες και συνιστούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, την επονομαζόμενη υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (NHR-Nuclear Hormone Receptors). Επιπλέον, όπως και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, έχουν ενεργό ρόλο στην αναδιάταξη της χρωματίνης και λειτουργούν είτε μόνοι τους, είτε σε συνεργασία με συνενεργοποιητές και

συγκαταστολεις για την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, αντίστοιχα. Ακόμα, είναι γεγονός ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς εμπλέκονται στον έλεγχο μιας μεγάλης ποικιλίας κυτταρικών διαδικασιών. Επίσης, αρκετές ορμόνες, βιοενεργά λιπίδια και άλλα μικρά φυσικά ή συνθετικά οργανικά μόρια μπορούν να αποτελέσουν προσδέτες αυτών των υποδοχέων, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση στο κυτταρόπλασμα ή στο εσωτερικό του πυρήνα (Glass and Rosenfeld, 2000). Με τη σύνδεση σε συγγενή στοιχεία του DNA ο συνδεδεμένος με τον προσδέτη υποδοχέας ενεργοποιεί γονίδια στόχους και έτσι μεταφέρει το ορμονικό μήνυμα με την αλλαγή στην έκφραση γονιδίων.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων σε σχέση με τη θέση που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο. Υπάρχουν οι πυρηνικοί υποδοχείς των οποίων η μετατόπιση στον πυρήνα προϋποθέτει την παρουσία προσδετών και αυτοί οι οποίοι είναι μόνιμα τοποθετημένοι στον πυρήνα, ανεξάρτητα από την παρουσία προσδετών.

1.1.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς απαρτίζονται από κοινές λειτουργικές περιοχές, που τους έχουν δοθεί οι ονομασίες από A έως F (**Εικόνα 1**). Η περιοχή A/B καταλαμβάνει το αμινοτελικό τους άκρο και είναι η λιγότερο συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στα μέλη της υπερικογένειας, με ποικίλο μέγεθος και με μια αυτόνομη περιοχή ενεργοποίησης την AF-1 (Activation-Function 1). Η περιοχή A/B αποτελεί συχνά αντικείμενο εναλλακτικού ματίσματος και εναλλακτικής χρησιμοποίησης προαγωγέων. Ακόμα, πολλές φορές διαφοροποιείται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως φωσφορυλίωση, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο για τη μεταγραφική δραστηριότητα της AF-1 περιοχής (Shao and Lazar, 1999).

Η δέσμευση των πυρηνικών υποδοχέων στο DNA πραγματοποιείται από τις δύο εξελικτικά συντηρημένες περιοχές τους, που λειτουργούν ανεξάρτητα για να ρυθμίσουν τις αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης ρυθμίζονται από την C ή DBD (DNA-binding domain) περιοχή. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, απαραίτητες για το σχηματισμό ομοδιμερών ή/και ετεροδιμερών, ρυθμίζονται από μια εκτεταμένη καρβοξυτελική επιφάνεια διμερισμού που περιέχει στην E ή LBD

(Ligand-Binding Domain) περιοχή. Αναφορικά, η συντηρημένη DBD περιοχή κατευθύνει τους υποδοχείς προς το αποκρινόμενο στοιχείο τους. Το αποκρινόμενο στοιχείο των ορμονών (HRE-Hormone Response Element) είναι μια ειδική ακολουθία DNA στον υποκινητή των γονιδίων που αναγνωρίζουν οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς. Η D περιοχή, είναι λιγότερο εξελικτικά συντηρημένη από τις γειτονικές περιοχές DBD και LBD και λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος τους. Περιέχει ένα σήμα για την πυρηνική τοποθέτηση των υποδοχέων (NLS-nuclear localization signal) ή τουλάχιστον κάποια στοιχεία του λειτουργικού NLS (Guiochon-Mantel et al., 1994).

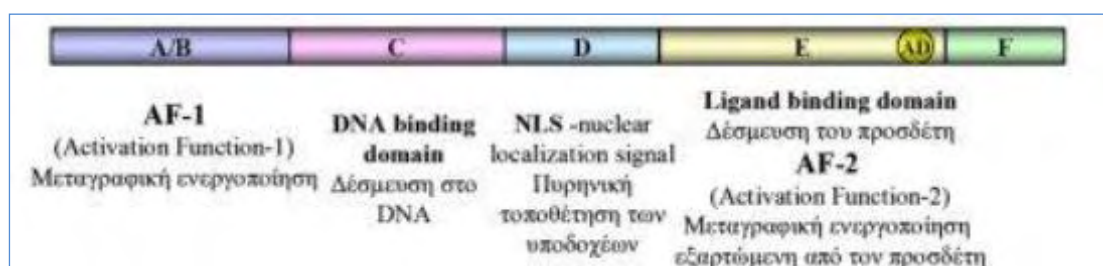
Η LBD περιοχή αποτελεί το βασικό γνώρισμα των πυρηνικών υποδοχέων. Είναι υπεύθυνη για πολλές και διαφορετικές λειτουργίες, οι περισσότερες από τις οποίες πραγματοποιούνται εξαρτώμενες από την παρουσία προσδέτη. Έτσι, στην LBD περιοχή αποδίδεται η μεταγραφική δραστηριότητα των υποδοχέων που εξαρτάται από τους προσδέτες (AF2, Activation Function-2) και εντοπίζεται μια πολύ βασική επιφάνεια διμερισμού (Gronemeyer and Laudet, 1995; Chambon, 1996; Moras and Gronemeyer, 1998).

Μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να λειτουργήσουν και ως καταστολείς της μεταγραφής γονιδίων, όταν είναι συνδεδεμένοι στο DNA. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει κατά την απουσία ανταγωνιστών και σχετίζεται με τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών συγκαταστολέων. Οι συγκαταστολείς συνδέονται πάντα στην επιφάνεια της LBD περιοχής των υποδοχέων, όταν δεν υπάρχει συνδεδεμένος προσδέτης, με παρόμοιο τρόπο με αυτό των συνενεργοποιητών, αναγνωρίζοντας ένα μοτίβο CoRNR box (CoRepressor Nuclear Receptor box) (Hu and Lazar, 1999; Nagy et al., 1999). Με τη δέσμευση του προσδέτη αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση της LBD περιοχής, απομακρύνονται οι συγκαταστολείς και στρατολογούνται οι συνενεργοποιητές. Ξεκινούν αλληλεπιδράσεις με μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων μέσω των οποίων μεταβιβάζεται το σήμα στο βασικό σύμπλοκο της μεταγραφής, επάγοντας τη μεταγραφή του γονιδίου.

Μερικοί υποδοχείς διαθέτουν στο καρβοξυτελικό άκρο της LBD περιοχής τους μια επιπλέον περιοχή, την F, η οποία διαφοροποιείται ανάμεσα στους υποδοχείς και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά, ούτε κάποια γνωστή λειτουργία. Μερικοί υποθέτουν ότι μπορεί να συμμετέχει στη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών στην LBD περιοχή. Η F περιοχή απουσιάζει από αρκετούς

υποδοχείς, όπως από τους PR (progesterone Receptor) και PPAR (peroxisome Proliferator-Activated receptor), RAR και RXR (Robyr et al., 2000).

Όπως η A/B περιοχή, οι LBD και F περιοχές είναι επίσης στόχοι μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, γεγονός το οποίο προσθέτει ακόμη ένα επίπεδο πολυπλοκότητας στη μεταγωγή μηνυμάτων από τους πυρηνικούς υποδοχείς, εφόσον τέτοιες διαδικασίες μπορούν να επηρεάσουν τις ιδιότητές τους (Laudet and Gronemeyer, 2002).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. (Από διδακτορική διατριβή Ευριδίκης Μπουκουβάλας).

1.2 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor- GR)

1.2.1 Γενικά

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιείται μετά τη σύνδεση της αντίστοιχης ορμόνης (γλυκοκορτικοειδές). Μαζί με τους υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης, ανδρογόνων και αλατοκορτικοειδών ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Οι παραπάνω υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία, ιδιαίτερα στην περιοχή σύνδεσης στο DNA (Evans, 1988). Επιπλέον, έχει δειχθεί ομολογία των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων με το προϊόν του ογκογονιδίου *v-erb-A* του ιού ερυθροβλάστωσης πτηνών (Weinberger et al., 1985; Green et al., 1986), το κυτταρικό ομόλογο (*c-erb-A*) του οποίου κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της θυροξίνης T_3 (Koenig et al., 1989). Παρόμοια ομολογία διαπιστώθηκε και με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (Giguere et al., 1987). Τα παραπάνω δηλώνουν ότι τόσο οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών όσο και οι υποδοχείς της θυροξίνης, της βιταμίνης D_3 και του ρετινοϊκού οξέος προέρχονται από το ίδιο

αρχέγονο πρωτοογκονίδιο και ανήκουν σε μια ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών που αριθμεί περίπου 50 μέλη (Evans, 1988), τα περισσότερα από τα οποία λειτουργούν ως παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής.

1.2.2 Τα γλυκοκορτικοειδή

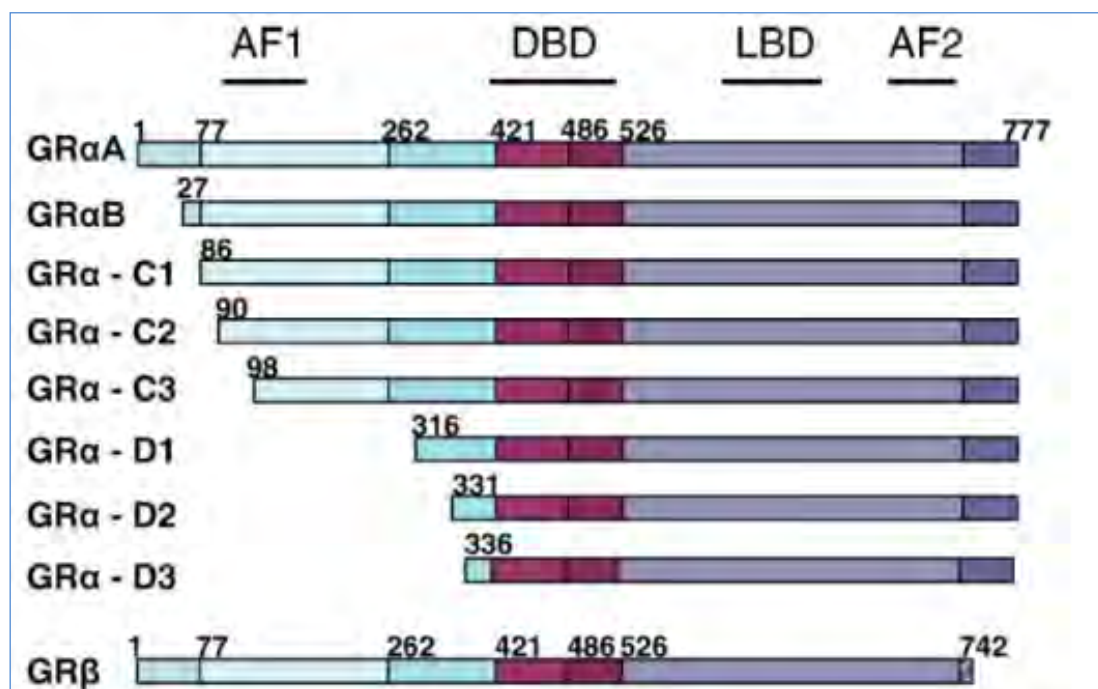
Τα γλυκοκορτικοειδή παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων και η ρύθμιση της έκκρισής τους γίνεται μέσω του συστήματος υποθαλάμου-υπόφυσης. Μαζί με τα αλατοκορτικοειδή συμμετέχουν στη ρύθμιση της ομοιόστασης ελέγχοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης και τη συγκέντρωση αλάτων. Επιπλέον, έχουν έντονη επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων σε καλλιέργεια (Evans, 1988).

Τα γλυκοκορτικοειδή μαζί με τα αλατοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα, τις προγεστίνες και τη βιταμίνη D₃ ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών κοινό σημείο, των οποίων είναι ο δακτύλιος του στερανίου. Οι στεροειδείς ορμόνες, που βιοχημικά χαρακτηρίζονται ως μεταβολίτες της χοληστερίνης, συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση, η αύξηση και η διακυτταρική επικοινωνία. (Yamamoto et al., 1976). Οι ορμόνες αυτές έχουν λιπόφιλο χαρακτήρα και στο αίμα μεταφέρονται συνδεδεμένες σε πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη του πλάσματος, η τρανσκορτίνη κ.α. (Ballard, 1979). Με τον τρόπο αυτό φτάνουν στα κύτταρα-στόχους, εισέρχονται σε αυτά πιθανώς με διάχυση, συνδέονται με υψηλή χημική συγγένεια στους αντίστοιχους ειδικούς υποδοχείς και επιδρούν στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων τους.

1.2.3 Η δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών-Ισομορφές

Έχουν εντοπιστεί ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος δύο σημαντικές ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, GRα και GRβ (Bamberger et al., 1995; Duma et al., 2006) (Εικόνα 2). Η κλασικός hGRα αποτελείται από 777 αμινοξέα. Στον GRβ, τα 50 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα του GRα έχουν αντικατασταθεί από 15 άλλα, που κωδικοποιούνται από το 9β εξόνιο, έχοντας ως αποτέλεσμα μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 742 αμινοξέα. Μόνο η GRα ισομορφή έχει μεταγραφική δράση, καθώς και ενεργότητα LBD-ορμόνης και είναι η πιο συχνή ισομορφή. Αντίθετα, η

GRβ δεν έχει μεταγραφική δράση και συνδέεται με την GRα σχηματίζοντας ετεροδιμερή, εμποδίζοντας με τον τρόπο τον σχηματισμό μεταγραφικά ενεργών ομοδιμερών GRα. Κάθε GRα ή GRβ mRNA παράγει επιπλέον ισομορφές με εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης σε επτά εσωτερικές περιοχές AUG (Lu et al., 2005).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δομής των ισομορφών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (Από Psarra et al., 2008, *IUBMB Life* **60**, 210-223).

Ακόμα, έχουν ανιχνευθεί οκτώ τέτοιες GRα ισομορφές. Όλοι τους είναι λειτουργικοί υποδοχείς, καθώς διαθέτουν την περιοχή LBD και παρουσιάζουν διαφορές στα χαρακτηριστικά της LBD, στη κατανομή τους στους ιστούς και στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Η GRα αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA (στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή, GREs), είτε θετικά, επάγοντας τη μεταγραφή, είτε αρνητικά, καταστέλλοντας τη μεταγραφή (Schoneveld et al., 2004). Τα θετικά GREs αντιπροσωπεύουν παλινδρομικές αλληλουχίες του γενικού τύπου AGAACAx_nTGTTCT. Σε ορισμένα γονίδια μόνο το ένα μισό της παλινδρομικής αλληλουχίας αρκεί για να προκαλέσει σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών. Τα αρνητικά GREs (nGREs) παρουσιάζουν ποικίλες νουκλεοτιδικές συνθέσεις.

Οι δύο αυτές ισομορφές δεν παρουσιάζουν σημαντική ομολογία μετά το 727 αμινοξύ και περιέχουν διαφορετικά ανοικτά πλαίσια μετάφρασης (open reading

frames) στα καρβοξυτελικά τους άκρα. Επιπλέον, μελέτες σε κυτταρικές σειρές ανθρώπου έδειξαν την παρουσία μόνο της α ισομορφής (Hollenberg et al., 1985), ενώ ακόμα το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών εντοπίστηκε στο χρωμόσωμα 5.

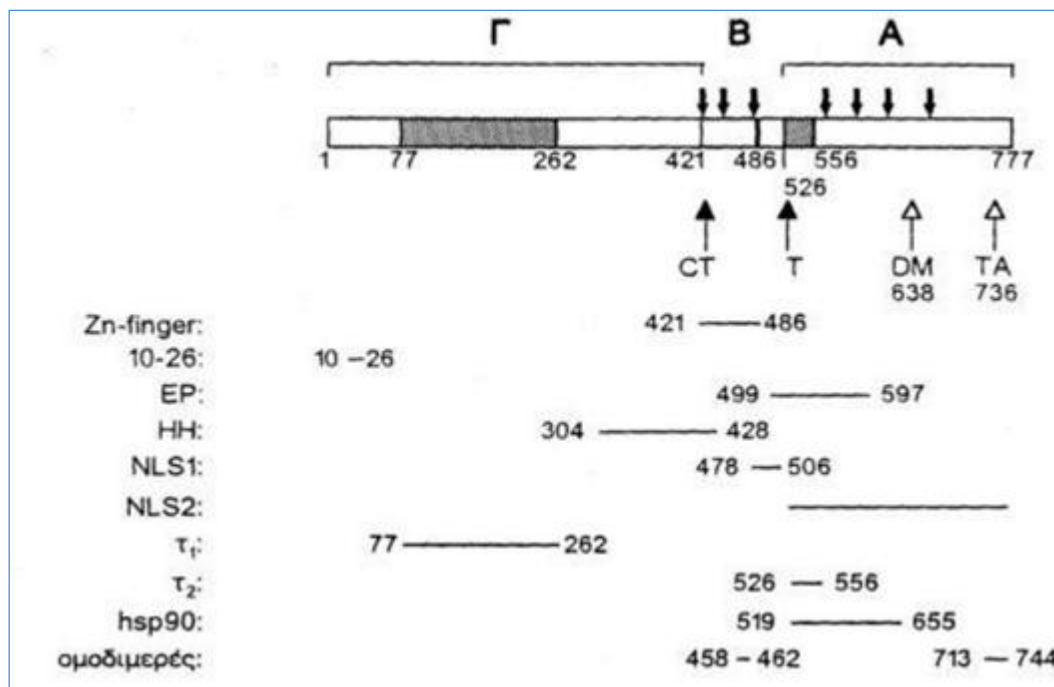
1.2.4 Λειτουργικές περιοχές Υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών

Πειράματα επιμόλυνσης κυττάρων με πλασμίδια έκφρασης τόσο του άθικτου υποδοχέα όσο και μεταλλαγμένων μορφών του, παράλληλα με πλασμίδιο που φέρει ένα γονίδιο (συνήθως της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης, CAT), η έκφραση του οποίου βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των γλυκοκορτικοειδών μέσω ορμονο-αποκρινόμενων αλληλουχιών σύνδεσης του υποδοχέα τους στο DNA (glucocorticoid responsive elements, GREs), έδωσε λεπτομερείς πληροφορίες για τις λειτουργικές περιοχές του μορίου.

Καθαρισμός του υποδοχέα με χρωματογραφικές μεθόδους (Wrange et al., 1984) και ακόλουθη μερική πρωτεόλυση οδήγησαν στον εντοπισμό τριών τμημάτων του υποδοχέα μεταξύ των οποίων υπάρχουν και δύο σημεία πέψης από θρυψίνη και χυμοθρυψίνη, τα τμήματα Α, Β και Γ (**Εικόνα 3**). Μετά από πέψη με θρυψίνη λαμβάνεται το τμήμα Α το οποίο αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου και περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης της ορμόνης. Το τμήμα αυτό είναι υδρόφοβο με μοριακό βάρος 25-27 kDa και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 528-777 του ανθρώπινου υποδοχέα (Giguere et al., 1986; Carstedt-Duke et al., 1987). Λειτουργικός έλεγχος της έλλειψης 528-777, δηλαδή αφαίρεση του τμήματος Α και έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας με επιμόλυνση κυττάρων *in vitro*, έδειξε ότι ο υποδοχέας που προκύπτει είναι ενεργός ανεξάρτητα από τη σύνδεση ορμόνης, γεγονός που δείχνει ότι απουσία ορμόνης η περιοχή αυτή καταστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία του υποδοχέα (Hollenberg et al., 1987; Godowski et al., 1987).

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται χυμοθρυψίνη λαμβάνονται τα τμήματα Α και Β σε ένα με ΜΒ 39 kDa, το οποίο περιλαμβάνει τα αμινοξέα 421-777 του υποδοχέα (Carstedt-Duke et al., 1982; Giguere et al., 1986). Το τμήμα Β από μόνο του είναι υδρόφιλο, περιλαμβάνει την περιοχή σύνδεσης στο DNA (Eisen et al., 1985) και περιέχει μια ομάδα αμινοξέων (αμινοξέα 421-486) (Giguere et al., 1986; Rusconi and Yamamoto, 1987) πλούσια σε κυστεΐνες, η οποία είναι υπεύθυνη για την επαφή του υποδοχέα με τις ειδικές αλληλουχίες GRE (Rusconi and Yamamoto, 1987).

Σημειώνεται ότι η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των υποδοχέων στεροειδών, όπως αναλύεται παρακάτω, και αποκτά διαμόρφωση δακτυλίων που σταθεροποιούνται από ένα ιόν ψευδαργύρου (zinc fingers).



Εικόνα 3: Λειτουργικές περιοχές του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών: Α: περιοχή σύνθεσης της ορμόνης, Β: περιοχή σύνδεσης στο DNA και Γ: αμινοτελική περιοχή. Τα δύο κάτω γεμάτα βέλη δηλώνουν τις θέσεις σύνδεσης της τριαμσιολόνης (T) και της 21-μεσολ-δεξαμεθαζόνης (DM) και τα πάνω βέλη τα σημεία ένωσης των εξονίων (δεν σημειώνεται το πρώτο εξόνιο το οποίο δεν μεταφράζεται). Στο σχήμα, επιπλέον, δηλώνεται η περιοχή των 2 δακτυλίων ψευδαργύρου (Zn-finger), οι περιοχές έναντι των οποίων παρήχθησαν οι αντιοροί 10-26, EP και HH, οι περιοχές των σημάτων πυρηνικής εντόπισης (NLS1 και NLS2), οι περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης (τ_1 και τ_2), οι περιοχές που συμμετέχουν στο διμερισμό του υποδοχέα (ομοδιμερές) και η περιοχή σύνδεσης της hsp90. (Από διδακτορική διατριβή Δήμητρας Μήτσου).

Το τμήμα Γ αντιστοιχεί στο αμινοτελικό μισό του μορίου και περιέχει τα κύρια αντιγονικά κέντρα της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση του ανθρώπινου υποδοχέα αποτελείται από 421 αμινοξέα (Giguere et al., 1986). Η περιοχή αυτή, η οποία δεν είναι υψηλά διατηρημένη μεταξύ των υποδοχέων στεροειδών, φαίνεται να είναι κυρίως υπεύθυνη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα, στην οποία συμμετέχει και η περιοχή Α (Evans, 1988). Μεταλλαγές στο τμήμα Γ οδήγησαν σε μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα κατά 10-20 φορές (Hollenberg et al., 1987; Danielsen et al., 1987). Επιπλέον, ανάλυση φυσικών ελλείψεων του

τμήματος Γ του μορίου έδειξε περιορισμένη μεταγραφική ενεργότητα παρά την ικανότητα σύνδεσης της ορμόνης (Yamamoto et al., 1976).

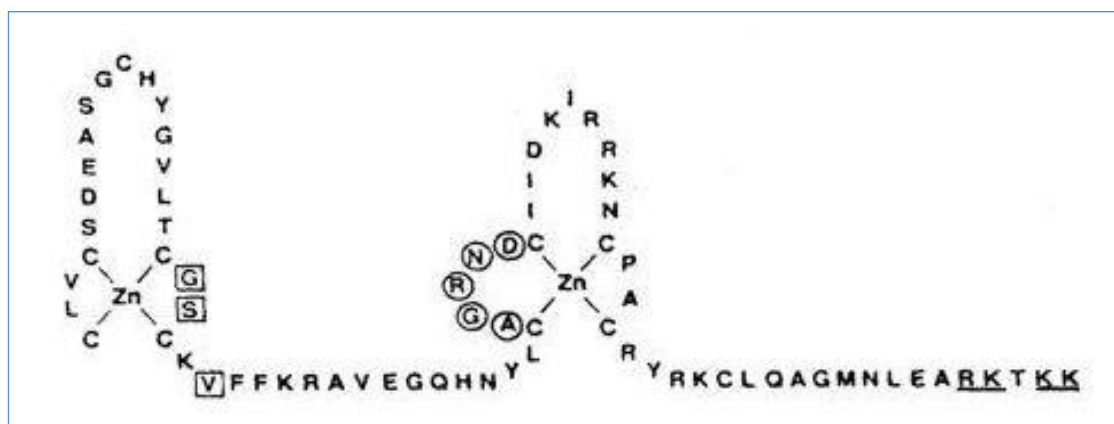
Η σύνδεση του υποδοχέα στο DNA φαίνεται να γίνεται μέσω δύο δακτυλίων που σχηματίζονται στην πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή σύνδεσης στο DNA (Giguere et al., 1986; Green and Chambon, 1987). Η διάταξη των κυστεϊνών στον κάθε δακτύλιο έχει βρεθεί να είναι ίδια με αυτή των καταλοίπων ιστιδίνης στους δακτυλίους του μεταγραφικού παράγοντα TFII_{IA} (Weinberger et al., 1985), ο οποίος επίσης απαιτεί την παρουσία ιόντων ψευδαργύρου για τη σύνδεσή του στο DNA. Κάθε ένας από τους δύο δακτυλίους περιλαμβάνει ένα ιόν ψευδαργύρου συνδεδεμένο με τέσσερις κυστεΐνες σε τετραεδρική μορφή και μπορεί να συνδεθεί στο DNA κάνοντας χρήση αλληλουχίας πέντε βάσεων (του μισού βήματος της διπλής έλικας του DNA) (Miller et al., 1985; Evans, 1988; Hard et al., 1990) (Εικόνες 3 και 4). Σημειώνεται ότι οι επτά από τις οκτώ κυστεΐνες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία του υποδοχέα (Severne et al., 1988; Schena et al., 1989). Ο πρώτος δακτύλιος (αυτός που βρίσκεται προς το αμινοτελικό άκρο του μορίου) είναι περισσότερο διατηρημένος σε σχέση με το δεύτερο και περιέχει λίγα βασικά αμινοξέα (μπορούν να αντιδρούν με το DNA), ενώ ο δεύτερος είναι περιοχή πλούσια σε λυσίνη και αργινίνη και έχει ιδιαίτερα βασικό χαρακτήρα (Evans, 1988). Η αναγνώριση από τον υποδοχέα των ειδικών αλληλουχιών GRE γίνεται με βάση τρία αμινοξέα (γλυκίνη 439, σερίνη 440 και βαλίνη 443) του πρώτου δακτυλίου (Hard et al., 1990), ο οποίος και καθορίζει την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης με το DNA. Σε πειράματα αντικατάστασης αυτής της περιοχής του υποδοχέα οιστρογόνων με την αντίστοιχη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, διατηρείται η ικανότητα σύνδεσης οιστραδιόλης αλλά ο υποδοχέας που προκύπτει συνδέεται σε αλληλουχίες GRE αντί ERE (αλληλουχίες ειδικές για τον υποδοχέα οιστρογόνων) (Green and Chambon, 1987). Η λειτουργική σημασία της περιοχής αυτής επιβεβαιώνεται και από παρατηρήσεις, σύμφωνα με τις οποίες, μεταλλαγές που καταστρέφουν τη διαμόρφωση των δακτυλίων δεν διαθέτουν μεταγραφική ενεργότητα παρά τη διατήρηση της ικανότητας σύνδεσης ορμόνης (Giguere et al., 1986). Τέλος, η περιοχή ανάμεσα στους δύο δακτυλίους και η περιοχή αμέσως μετά το δεύτερο είναι υψηλά διατηρημένες και πιθανά έχουν κάποια λειτουργική σημασία (Evans, 1988).

Όσον αφορά τα συγκεκριμένα αμινοξέα των τμημάτων Α και Γ που μετέχουν στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών βρέθηκαν δύο περιοχές τ_1 και τ_2 με αρνητικό φορτίο οι οποίες φαίνεται να έχουν λειτουργία

ενισχυτή της μεταγραφής (transactivation domains) (Giguere et al., 1986). Η περιοχή τ_1 βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα Γ του μορίου και μεταξύ των αμινοξέων 77 και 262 του υποδοχέα (**Εικόνα 3**) και περιέχει σχετικά υψηλό ποσοστό δύο αμινοξέων, του ασπαρτικού και του γλουταμικού. Η αφαίρεσή της μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση κατά 95% σε σχέση με αυτή του φυσικού υποδοχέα ενώ ο διπλασιασμός της την αυξάνει κατά 310%. Η περιοχή τ_2 περιλαμβάνει τα αμινοξέα 526-556 και βρίσκεται μεταξύ του τμήματος σύνδεσης στο DNA και του ενεργού κέντρου σύνδεσης της ορμόνης (**Εικόνα 3**, Hollenberg et al., 1987; Hollenberg and Evans, 1988). Η λειτουργία της περιοχής τ_1 δεν εξαρτάται από την παρουσία ορμόνης ενώ αυτή της τ_2 εξαρτάται απόλυτα και αυτό συμφωνεί με τη μεταγραφική ενεργότητα ελλείψεων του τμήματος σύνδεσης ορμόνης (Godowski et al., 1987; Hollenberg and Evans, 1988; Beato, 1989). Ειδικά για την περιοχή τ_1 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή μέσω των TAF, των πρωτεϊνών δηλαδή που συνδέονται στην πρωτεΐνη TBP (αυτή που συνδέεται στο στοιχείο TATA) και μαζί της συνιστούν τον παράγοντα μεταγραφής TFIID, σταθεροποιώντας με τον τρόπο αυτό το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής στο οποίο συμμετέχει και η RNA πολυμεράση II (McEwan et al., 1993; Beato, 1989).

Επιπλέον, βρέθηκαν δύο περιοχές του μορίου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πυρηνική εντόπισή του παρουσία της ορμόνης και οι οποίες ονομάζονται σήματα πυρηνικής εντόπισης NLS1 και NLS2 (nuclear localization signals) (**Εικόνα 3**). Γενικά, τα σήματα πυρηνικής εντόπισης είναι βασικές περιοχές των πρωτεϊνών που είναι αναγκαίες για την ενεργητική μεταφορά στον πυρήνα πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους. Το NLS1 αντιστοιχεί στα αμινοξέα 478-506 του υποδοχέα και βρίσκεται στην περιοχή αμέσως μετά το δεύτερο δακτύλιο ψευδαργύρου. Έχει βασικό χαρακτήρα και διαμόρφωση α -έλικας, παρουσιάζει 50% ομολογία με το σήμα πυρηνικής εντόπισης του μεγάλου T αντιγόνου του ιού πιθήκου SV40 (SV40 large T-antigen) και είναι αυτόνομα ενεργό σε υποδοχείς από τους οποίους έχει αφαιρεθεί το τμήμα σύνδεσης ορμόνης (Picard and Yamamoto, 1987). Ο ρόλος του στη μεταφορά στον πυρήνα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός αφού χιμαιρικές πρωτεΐνες που το περιέχουν εντοπίζονται στον πυρήνα (Muller and Renkawitz, 1991; Cadepond et al., 1992). Το NLS2 βρίσκεται μέσα στο τμήμα σύνδεσης ορμόνης (Picard and Yamamoto 1987). Ολόκληρη η περιοχή του NLS1 είναι απόλυτα διατηρημένη μεταξύ των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών γνωστής αμινοξικής αλληλουχίας (Danielsen et al., 1986;

Weinberger et al., 1985). Οι λειτουργίες των περιοχών σύνδεσης στο DNA και πυρηνικής εντόπισης του υποδοχέα είναι ανεξάρτητες η μία με την άλλη (Rusconi and Yamamoto, 1987). Τέλος, ανάλυση της δομής του γονιδίου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών έδειξε ότι αποτελείται από 10 εξόνια. Οι δύο μορφές του υποδοχέα GR α και GR β κωδικοποιούνται από 9 εξόνια από τα οποία τα 8 πρώτα είναι κοινά (1-8) ενώ το ένατο διαφοροποιείται (9 α και 9 β , αντίστοιχα). Το εξόνιο 1 δεν μεταφράζεται, το 2 κωδικοποιεί για το αμινοτελικό τμήμα (τμήμα γ), τα 3 και 4 κωδικοποιούν για τους 2 δακτυλίους ψευδαργύρου (τμήμα B), τα εξόνια 5-8 και το 5' άκρο του 9, το οποίο διαφοροποιείται μεταξύ των δύο μορφών α και β και επιπλέον περιέχει 3'μη μεταφραζόμενες αλληλουχίες, κωδικοποιούν για το τμήμα γ (Εικόνα 3). Σύνδεση της ορμόνης είναι δυνατή μόνο στην περίπτωση της μορφής α (Encio and Detera-Wadleigh, 1991).



Εικόνα 4: Το τμήμα (Cys421-Lys495) της περιοχής σύνδεσης στο DNA του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών που περιλαμβάνει τους δύο δακτυλίους ψευδαργύρου (Zinc fingers). Τα αμινοξέα που βρίσκονται σε τετράγωνα είναι απαραίτητα για τη διάκριση μεταξύ GRE και ERE ενώ αυτά που βρίσκονται μέσα σε κύκλους είναι σημαντικά για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στο διμερισμό του υποδοχέα (Hard et al., 1990). Τα υπογραμμισμένα αμινοξέα δηλώνουν την ομολογία με το σήμα πυρηνικής εντόπισης της νουκλεοπλασμίνης. (Από διδακτορική διατριβή Δήμητρας Μήτσιου).

1.3 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

1.3.1 Γενικά

Οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων στο λειτουργικό τους περιβάλλον, στον πυρήνα του κυττάρου, έχουν μελετηθεί εντατικά και εν μέρει έχει αποκαλυφθεί. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για υποδοχείς στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών, στους οποίους ανήκει και ο

υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών. Αυτοί οι πυρηνικοί υποδοχείς ενεργοποιούνται από προσδέτες αλλά και από μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού, της αύξησης, καθώς και αναπτυξιακών και ανοσοποιητικών διαδικασιών (Evans, 2005). Στη μη ενεργοποιημένη του κατάσταση, ο υποδοχέας είναι συστατικό στοιχείο ενός μακρομοριακού συμπλόκου με πρωτεΐνες θερμικού σοκ, μεταξύ άλλων.

1.3.2 Μετακίνηση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα

Η λειτουργία του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από μία heat-shock πρωτεΐνη (HSP: Heat-Shock Protein) με μοριακό βάρος 90kDa (HSP90). Ο ελεύθερος ορμόνης υποδοχέας GR σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την HSP90, το οποίο, με τη σύνδεση της ορμόνης στον GR, διασπάται και καθίσταται δυνατή η είσοδος του υποδοχέα στον πυρήνα. Ο υποδοχέας γίνεται μεταγραφικά ενεργός μετά τη σύνδεσή του με την ορμόνη, λόγω της ικανότητας της ορμόνης να σταθεροποιεί το μεταγραφικά ενεργό διμερές του υποδοχέα και να το προστατεύει, κατ' αυτόν τον τρόπο, από ανακύκλωσή του σε ανενεργό (Ylikomi et al., 1992; Metzger et al., 1995).

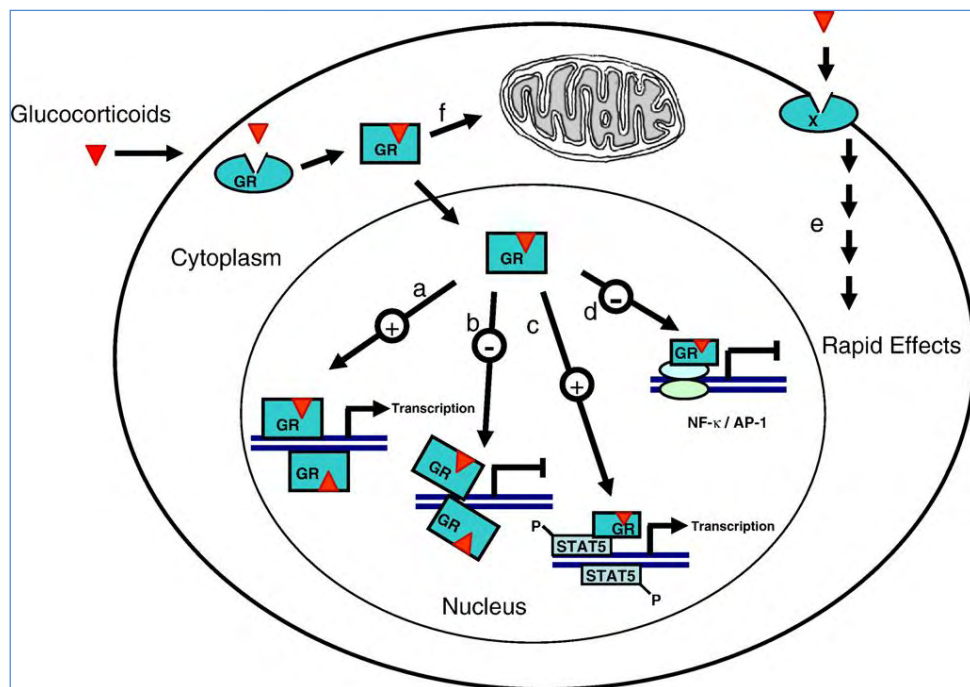
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών έχει δύο σήματα πυρηνικής εντόπισης NLS, το NLS1, που είναι από μόνο του ενεργό, και το NLS2, που ενεργοποιείται από την ορμόνη. Η σύνδεση της ορμόνης και η διάσπαση του συμπλόκου με την HSP90 θα πρέπει να ενεργοποιεί και τα δύο σήματα, ενώ αυτόματη διάσπαση του συμπλόκου να αποκαλύπτει μόνο το ισχυρό σήμα NLS1, με αποτέλεσμα, σε κάθε περίπτωση, τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα. Αντίθετα, η σύνδεση της HSP90 θα πρέπει να καλύπτει το σήμα NLS1 και να αλλάζει τη διαμόρφωση του σήματος NLS2 οδηγώντας στην παραμονή του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα (Picard et al., 1988; Scherrer et al., 1993).

1.3.3 Σύνδεση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στο DNA και ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης

Ο μεταγραφικά ενεργός υποδοχέας GR, αφού μεταφερθεί στον πυρήνα, προσδένεται στο DNA ως ομοδιμερές σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή ή GREs (GREs: Glucocorticoid Responsive

Elements), οι οποίες ρυθμίζουν (ενισχύουν ή αναστέλλουν) τη λειτουργία των προαγωγών εκείνων των γονιδίων η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τα γλυκοκορτικοειδή (γονίδια-στόχοι της ορμόνης).

Αυτό ξεκινά μια σειρά γεγονότων στα οποία εμπλέκονται διάφορες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, π.χ. μεταγραφικοί παράγοντες, συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, ένζυμα τροποποίησης ιστονών και ο βασικός μεταγραφικός μηχανισμός, με αποτέλεσμα την αναδιάρθρωση της χρωματίνης, με αποκορύφωμα την ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων (Collingwood et al., 1999). Ακόμα, στην περίπτωση της δράσης των θυρεοειδών ορμονών, ο υποδοχέας βρίσκεται συνδεδεμένος στη χρωματίνη, δρώντας ως μεταγραφικός καταστολέας και απελευθερώνεται από αυτήν μετά από αλληλεπίδρασή του με την ορμόνη, οδηγώντας έτσι στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ρύθμιση της μεταγραφής μπορεί επίσης να επιτευχθεί με την αλληλεπίδραση των υποδοχέων ως μονομερή, όχι άμεσα με το DNA, αλλά και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν άμεση πρόσβαση στις αντίστοιχες δεσμευτικές αλληλουχίες DNA (Tuckermann et al., 1999). Επιπλέον, οι ορμόνες ασκούν ταχείες, μη γονιδιωματικές επιδράσεις (Losel et al., 2003), μέσω κλασικών υποδοχέων, υποδοχέων συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες ή άλλων μη ταυτοποιημένων ακόμη μορίων (Scheller et al., 2003; Kino et al., 2005) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω της πρόσδεσής τους στους υποδοχείς και της αλληλεπίδρασής τους με τα στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες,

Hormone Response Elements (HREs), μπορούν είτε να a) ενεργοποιήσουν είτε b) να αναστείλουν τη μεταγραφή. Επίσης, μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης του συμπλόκου ορμόνης υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες η ορμόνη μπορεί είτε c) να ενεργοποιήσει είτε d) να μπλοκάρει τη μεταγραφή. Η ορμόνη επίσης μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορες, μη γονιδιωματικές, επιδράσεις (e) μέσω της κλασικής οδού των μεμβρανικών υποδοχέων, των G-πρωτεϊνών ή ακόμα και σε απροσδιόριστα για την ώρα μόρια και μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης υποδοχέα σε αλληλεπίδραση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. (Από Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

Ακόμα, ένα πλήθος άλλων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων έχει χαρακτηριστεί, όπως π.χ. ο NF-κB, ο AP-1, ο CREB και ο p53, οι οποίοι ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια ρυθμιστικά μόρια, που ενέχονται στην κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την απόπτωση.

1.3.4 Ρύθμιση της μεταγραφής: Θετική ρύθμιση της μεταγραφής

Μετά από τη σύνδεση του υποδοχέα στο GRE η ενεργοποίηση της μεταγραφής (και ακόλουθη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης) συμβαίνει μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Με χρήση ενός γονιδίου αναφοράς βρέθηκε ότι η επαγωγή από τα γλυκοκορτικοειδή μέσω απλού GRE συμβαίνει όταν αυτό βρίσκεται κοντά στο στοιχείο TATA (Strahle et al., 1988; Pina et al., 1990). Στην περίπτωση επαγωγής ενδογενών γονιδίων που τα GREs βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από τον ελεγχόμενο προαγωγό φαίνεται να απαιτούνται είτε πολλαπλά GRE εν σειρά είτε απλά GRE μαζί με στοιχεία σύνδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων που επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση της βασικής μεταγραφικής μηχανής (Strahle et al., 1988; Schule et al., 1988).

1.3.5 Ρύθμιση της μεταγραφής: Αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής

Είναι γεγονός ότι υπάρχουν και περιπτώσεις αρνητικής ρύθμισης γονιδίων στόχων από τα γλυκοκορτικοειδή. Ειδικότερα, διακρίνονται οι εξής τρόποι αρνητικής ρύθμισης από τους υποδοχείς (Saaticioglu et al., 1994):

A) Μεταγραφική παρεμβολή του υποδοχέα στη δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων: Ο τρόπος αυτός περιλαμβάνει δύο τρόπους παρεμβολής ανάλογα με το είδος του στοιχείου απόκρισης που συμμετέχει στη διαδικασία:

- i) Μεταγραφική παρεμβολή μέσω ενός απλού στοιχείου απόκρισης. Χαρακτηριστική είναι αυτή του γονιδίου της κολλαγενάσης το οποίο ρυθμίζεται θετικά από τον AP-1 (μεταγραφικός παράγοντας) και αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή (Jonat et al., 1990).
- ii) Μεταγραφική παρεμβολή μέσω ενός σύνθετου στοιχείου απόκρισης. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της προλιφερίνης (Mordacq and Linzer, 1989; Diamond et al., 1990) η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί, να κατασταλεί ή να μείνει ανεπηρέαστη από τα γλυκοκορτικοειδή ανάλογα με τα επίπεδα διάφορων πρωτεϊνών.

B) Άμεση ορμονοεξαρτώμενη καταστολή: Ο δεύτερος τρόπος είναι η άμεση καταστολή της μεταγραφής με σύνδεση του υποδοχέα σε ειδικές αρνητικές αλληλουχίες του DNA (negative GREs, n-GREs) και ακόλουθη μείωση της ενεργότητας της βασικής μεταγραφικής μηχανής χωρίς τη συμμετοχή άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Αν και υπάρχουν ενδείξεις για τη σύνδεση του υποδοχέα στα στοιχεία n-GREs με τη μορφή τριμερούς, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης δεν είναι γνωστός.

1.4 Βιολογικές διεργασίες που ελέγχονται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

1.4.1 Γενικά

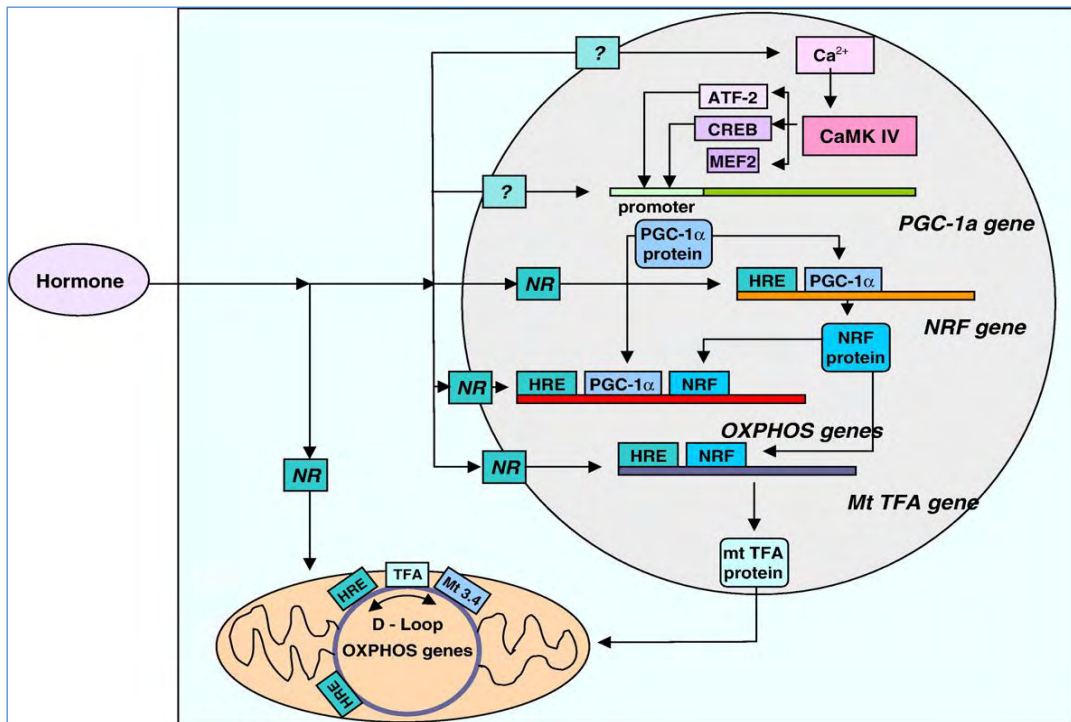
Είναι γεγονός πως η σημαντικότερη μοριακή βάση της δράσης των στεροειδών ορμονών είναι η ρύθμιση (θετική ή αρνητική) της μεταγραφής γονιδίων-στόχων. Στη συνέχεια, τα προϊόντα αυτών των γονιδίων εκτελούν κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως ρύθμιση του μεταβολισμού, διαφοροποίηση ή αύξηση, συνεισφέροντας έτσι στον κυτταρικό φαινότυπο. Όλες αυτές οι λειτουργίες επηρεάζονται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων (Paramichail et al., 1980; Oakley et al., 2011) γεγονός που υποδεικνύει ότι η κυτταρική εξειδίκευση της δράσης του πρέπει να οφείλεται στην έκφραση διαφορετικών γονιδίων στόχων.

1.4.2 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια: Ρόλος στη μιτοχονδριακή μεταγραφή-Παραγωγή ενέργειας

Υποδοχείς για γλυκοκορτικοειδή έχουν βρεθεί στα μιτοχόνδρια των λεμφοκυττάρων, του ήπατος επίμυος, των σπερματοκυττάρων και πολλών κυτταρικών σειρών (Psarra et al., 2001,2003,2005,2006,2009,2011; Moutsatsou et al., 2001; Scheller et al., 2003; Sionov et al., 2006; Gavrilova-Jordan et al., 2007; Du et al., 2009). Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας, που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Καλύπτουν το 90% των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου μέσω του μηχανισμού οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, ενέχονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν βασικά συστατικά της απόκρισης στο stress, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), στην ανοσορύθμιση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω ολοκλήρωσης και συντονισμού των λειτουργιών τους με εκείνες άλλων οργανιδίων των κυττάρων, κυρίως του πυρήνα τους (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006).

Για την παραγωγή ενέργειας, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, είναι απαραίτητα τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), οι υπομονάδες των οποίων κωδικοποιούνται τόσο από πυρηνικά, όσο και από μιτοχονδριακά γονίδια, ώστε να προκύψουν τα ολοένζυμα συστατικά στοιχεία ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων. Το μιτοχόνδριο είναι ένας αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου, που επιτυγχάνει διάφορα επίπεδα προσαρμοστικής ρύθμισης της OXPHOS. Εάν οι ενεργειακές ανάγκες δεν είναι επαρκείς, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την απόδοση ATP με αλλοστερική ενεργοποίηση της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε περιπτώσεις υψηλότερων ενεργειακών αναγκών, όπως αυτές που προκλήθηκαν από γλυκοκορτικοειδικές και θυρεοειδικές ορμόνες σε κύτταρα-στόχους και κατά τη διάρκεια ορισμένων περιόδων ανάπτυξης, τα κύτταρα αντιδρούν με αυξημένη βιοσύνθεση της OXPHOS ή, σε ακραίες περιπτώσεις, με μιτοχονδριακή βιογένεση, μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφής των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS και της αύξησης της διαθεσιμότητας των γονιδίων (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006).

Ο συντονισμός της μεταγραφής γονιδίων της ΟΧΡΗΟΣ στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα από τις ορμόνες, προέρχεται από τον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τις αντίστοιχες HREs για να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων της πυρηνικής ΟΧΡΗΟΣ, αλλά και των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση τόσο των πυρηνικών, όσο και των μιτοχονδριακών γονιδίων της ΟΧΡΗΟΣ, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Πυρηνική-κυτταροπλασματική οργάνωση της μεταγραφής μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες ΟΧΡΗΟΣ από στεροειδικές/θυρεοειδικές ορμόνες. Στον πυρήνα, το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα (NR) μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα HREs των γονιδίων της ΟΧΡΗΟΣ, ώστε να τα ενεργοποιήσει άμεσα και με τα HREs των γονιδίων του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα (NRF), ώστε να επάγει τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν στη συνέχεια να ασκήσουν μια θετική επίδραση στην μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων της ΟΧΡΗΟΣ. Μέσω μη γενωμικής ρύθμισης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} και ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το σύστημα ασβεστίου-καλμοδοουλίνης πρωτεϊνικής κινάσης IV (CaMKIV), τον κύριο ρυθμιστή της μιτογένεσης, ο ενεργοποιούμενος από τον συνενεργοποιητή 1α υποδοχέα γ (PGC-1α) ελάγεται, και μπορεί άμεσα και έμμεσα (μέσω της NRF ελαγωγής) να διεγείρει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων ΟΧΡΗΟΣ και της μιτοχονδριακής μεταγραφής του παράγοντα A (mtTFA), ο οποίος ενεργοποιεί τη μεταγραφή στα μιτοχόνδρια. Οι PGC1α και PPARα μπορούν να επαχθούν τόσο από θυρεοειδικές ορμόνες όσο και από γλυκοκορτικοειδή. Ο PGC1α/1β μπορεί επίσης να επαχθεί από τον IFNγ μέσω του μονοπατιού JAK/STAT1. Ο PGC1α/1β στη συνέχεια μπορεί να ενεργοποιήσει τον συσχετιζόμενο με οιστρογόνα υποδοχέα α (ERRα), έναν ορφανό πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος με άμεση δέσμευση σε προαγωγείς γονιδίων, σημαντικών για μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως για την οξειδωτική φωσφορλίωση ή σε προαγωγείς των παραγόντων που ελέγχουν

μιτοχονδριακή έκφραση, να οδηγήσει σε αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνοή και παραγωγή ROS. Στα μιτοχόνδρια, οι ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων OXPHOS μέσω των συγγενών μιτοχονδριακών υποδοχέων και της αλληλεπίδρασης με τις αντίστοιχες θέσεις δέσμησης στο μιτοχονδριακό γένωμα, διασφαλίζοντας το βέλτιστο συγχρονισμό της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS και στους δύο τύπους γενώματος (Scheller et al., 2000, Psarra et al., 2006). (Από Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

Έτσι, επάγονται τόσο πυρηνικά κωδικούμενες OXPHOS υπομονάδες όσο και μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι μετατοπίζονται προς τα μιτοχόνδρια. Επιτυγχάνεται έτσι ο απαραίτητος συντονισμός της μεταγραφής γονιδίων της OXPHOS στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα. Η παρουσία στεροειδών/θυρεοειδών υποδοχέων ορμονών στα μιτοχόνδρια και παρόμοιων με HRE ακολουθιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, υπέδειξε μια πρόσθετη λειτουργία συντονισμού, μέσω μιας άμεσης επίδρασης του μιτοχονδριακά εντοπισμένου υποδοχέα στην μιτοχονδριακή μεταγραφή. Κατά συνέπεια, κοινοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι υποδοχείς, παρόντες στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, ενεργοποιούμενοι από τον ίδιο ρυθμιστικό παράγοντα, την ορμόνη, θα διασφαλίσουν τον συντονισμό μιας διαδικασίας, που απαιτεί την παράλληλη μεταγραφή γονιδίων που ενδημούν στα δύο κυτταρικά οργανίδια (**Εικόνα 6**) (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006).

1.4.3 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης αποτελώντας μέρος του μονοπατιού που ξεκινά από τα γλυκοκορτικοειδή. Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στη γλυκονεογένεση στοιχειοθετείται από τις εξής τέσσερις διαπιστώσεις: 1) Η ρύθμιση της παροχής υποστρώματος και η διαμόρφωση του γλυκονεογενετικού μονοπατιού στο ήπαρ είναι εξίσου σημαντικά στον έλεγχο της γλυκονεογένεσης από τα γλυκοκορτικοειδή. 2) Η επινεφριδική ανεπάρκεια ελαττώνει την απελευθέρωση γλυκονεογενετικών και άλλων αμινοξέων από τους σκελετικούς μύες σε περίοδο αστίας. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αναστραφεί με την αναπλήρωση γλυκοκορτικοειδών. Οι αλλαγές στην απελευθέρωση αμινοξέων συνοδεύονται με παρόμοιες αλλαγές στα επίπεδα αμινοξέων στους ιστούς και δεν εξηγούνται από αλλαγές στη διάσπαση των πρωτεϊνών. Τα γλυκοκορτικοειδή δε μεταβάλλουν τον καταβολισμό των πρωτεϊνών αλλά προκαλούν μια μικρή καταστολή της πρωτεϊνσύνθεσης. Οι βιοχημικές

μετατροπές που είναι υπεύθυνες για τις αλλαγές στο μεταβολισμό των αμινοξέων που προκαλούνται από αυτά τα στεροειδή δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν, επίσης, να ρυθμίσουν την παροχή γλυκονεογενετικών υποστρωμάτων επιτρέποντας τη λιπολυτική δράση των κατεχολαμινών και άλλων ορμονών στους λιπώδεις ιστούς και στη γλυκογονολυτική δράση των κατεχολαμινών στους σκελετικούς μύες. 3) Τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα για την αύξηση της γλυκονεογένεσης στο διαβήτη και στην αστία. Μέρος της δράσης τους ασκείται άμεσα στο ήπαρ και φαίνεται να αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκονεογενετικών ενζύμων. Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη σύνθεση της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού και ενεργοποιούν τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και τη φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης. 4) Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν επιτρεπτική δράση στη διέγερση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ από τη γλυκαγόνη και την επινεφρίνη. Τα στεροειδή δεν είναι απαραίτητα για τη δημιουργία του cAMP ή για την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης από αυτές τις ορμόνες αλλά φαίνεται ότι δρουν διατηρώντας την αποκριτικότητα συγκεκριμένων ενζύμων στη δράση του cAMP και των α-αδρενεργικών συστημάτων. Αυτό πιθανότατα επιτυγχάνεται με τη διατήρηση ενός κανονικού ιονικού περιβάλλοντος μέσα στα κύτταρα (Exton, 1979).

1.4.4 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στη διαφοροποίηση σκελετικών μυϊκών και οστικών κυττάρων

Τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση διαφόρων τύπων κυττάρων. Ενδεικτικά αναφέρουμε παραδείγματα δράσης τους στην περίπτωση σκελετικών μυϊκών κυττάρων και οστεοβλαστών.

Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη διαφοροποίηση των σκελετικών μυϊκών κυττάρων. Η διεγερτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στη μυογενετική διαφοροποίηση αντικατοπτρίζεται στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων της κρεατινικής κινάσης (CK) και της γ-υπομονάδας του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (AChR). Εφόσον η δεξαμεθαζόνη δεν επιδρά στα επίπεδα έκφρασης των ρυθμιστικών γονιδίων της μυογένεσης, όπως της myoD και της μυογενίνης, η ενίσχυση των ειδικών για τους μύες γονιδίων από τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να αντανακλά μία αύξηση στη λειτουργική δραστηριότητα των ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Montano and Lim, 1997).

Στο σχηματισμό των οστών, τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και το σχηματισμό της οστέινης θεμέλιας ουσίας. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της σιαλοπρωτεΐνης των οστών (BSP) από τα γλυκοκορτικοειδή σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και τον εκ νέου σχηματισμό των οστών. Αυτές οι μελέτες έχουν εντοπίσει άμεσα και έμμεσα μονοπάτια για τη ρύθμιση της έκφρασης της BSP από τα γλυκοκορτικοειδή. Η άμεση επίδραση των γλυκοκορτικοειδών γίνεται μέσω των GRE στον υποκινητή του γονιδίου της BSP ενώ η κυριότερη έμμεση διέγερση της BSP αφορά πυρηνικές μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς (Ogata et al., 1995).

1.5 Ο homeobox μεταγραφικός παράγοντας Prox1 (prospero-related homeobox 1)

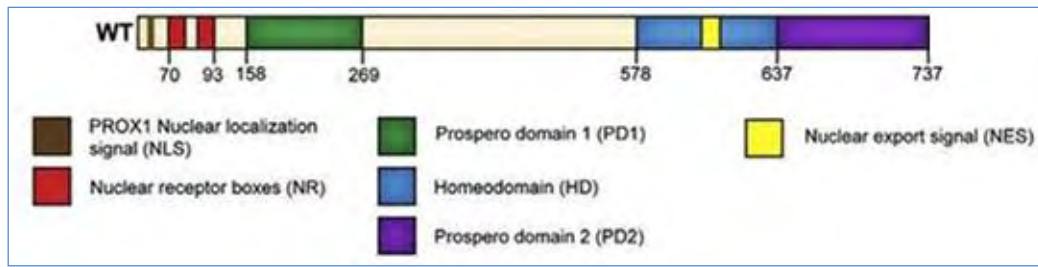
1.5.1 Γενικά

Ο Prox1 είναι ένας πολυλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την ανάπτυξη του φακού των ματιών, των λεμφικών αγγείων, του ήπατος, του παγκρέατος, του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς. Ακόμα, μπορεί να λειτουργήσει είτε ως ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως ένας μεταγραφικός συγκαταστολέας, ανάλογα με το αναπτυξιακό κυτταρικό περιβάλλον (Elkouris et al., 2010; kaltezioti et al., 2010).

Πρόσφατα δεδομένα από την διεθνή βιβλιογραφία επίσης αποκαλύπτουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 και ο ER έχουν αντίθετες δράσεις σε κοινά γονίδια στόχους, επηρεάζοντας μεταβολικές διεργασίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, υποδεικνύοντας την εμπλοκή τους στη ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (Edvardsson et al., 2011).

1.5.2 Η δομή του Prox1

Το γονίδιο Prox1 κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα αποτελούμενο από 737 αμινοξέα με μοριακό βάρος 84 kDa ο οποίος περιλαμβάνει πολλές υποτιθέμενες λειτουργικές περιοχές, πέραν της περιοχής αλληλεπίδρασης με το DNA (homeodomain) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Οι λειτουργικές περιοχές του *Prox1*: η N-τελική περιοχή της πρωτεΐνης αποτελείται από δύο πυρηνικά boxes (NR), σήματα πυρηνικής τοποθέτησης (NLS) καθώς και την περιοχή Prospero 1 (PD1). Το C-τελικό άκρο του *Prox1* αποτελείται από την πολύ συντηρημένη περιοχή homeodomain (HD), η οποία περιλαμβάνει τα σήματα εξόδου από τον πυρήνα (NES) και την περιοχή Prospero 2 (PD2). Η homeodomain και η περιοχή Prospero domain 2 μαζί σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain) του *Prox1*. (Από Baxter et al., 2011, *BBA* **1813**, 201-212).

Το αμινοτελικό άκρο (N-) του *Prox1* περιλαμβάνει δύο περιοχές πυρηνικού υποδοχέα (Nuclear Receptor boxes: NR boxes) με τα οποία ο *Prox1* αλληλεπιδρά με την περιοχή πρόσδεσης LBD των πυρηνικών υποδοχέων (Song et al., 2006, Qin et al., 2004, Shin et al., 2006). Η αμινοτελική περιοχή του *Prox1* επίσης περιλαμβάνει την προβλεπόμενη αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης NLS και την περιοχή prospero 1 (Prospero Domain 1: PD1), η οποία είναι 45% συντηρημένη σε σχέση με την PD1 περιοχή του πρόσφατα χαρακτηρισμένου *Prox2* (Nishijima et al., 2006). Η καρβοξυτελική περιοχή του *Prox1* είναι η περισσότερο συντηρημένη εξελικτικά περιοχή της πρωτεΐνης. Περιέχει μία άτυπη περιοχή πρόσδεσης DNA που αποτελείται από 60 αμινοξέα, η οποία έχει μία προσθήκη τριών αμινοξέων ανάμεσα στην έλικα 2 και έλικα 3, καθώς και μία μοναδική περιοχή Prospero 2 (PD2), η οποία απαντάται σε όλα τα *Prox1* ορθόλογα (Oliver et al., 1993). Η περιοχή PD2 καλύπτει μια αλληλουχία σήματος εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal: NES), στην περιοχή πρόσδεσης με το DNA, η οποία αποτελείται από τέσσερα υδρόφοβα κατάλοιπα και χρησιμεύει στην έξοδο της πρωτεΐνης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, μέσω του συμπλέγματος του πυρηνικού πόρου (Tanja la Cour et al., 2004). Έτσι, η απαλοιφή της PD2 περιοχής έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο της prospero στο κυτταρόπλασμα (Demidenko et al., 2001; Bi et al., 2003). Έως τώρα, δεν έχει δειχθεί ο ρόλος της PD2 περιοχής στη διαμόρφωση της μεταγραφικής ρύθμισης που μεσολαβείται από τον *Prox1*. Η περιοχή πρόσδεσης με το DNA (homeodomain) και η PD2 περιοχή (prospero domain 2) μαζί, σχηματίζουν μια συνεχή homeoprospero περιοχή που αποτελείται από έξι έλικες (Oliver et al., 1993, Ryter et

al., 2002) και προσδέεται στις θέσεις (C(A/T)(C/T)NNC(T/C) και CGTCTT(A)) στη μεγάλη αύλακα του DNA (Hassan et al., 1997; Cook et al., 2003).

1.5.3 Βιολογικός ρόλος του *Prox1*-Αναπτυξιακός ρόλος

Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο του homeobox μεταγραφικού παράγοντα *Prox1* κλωνοποιήθηκε αρχικά στον ποντικό από ομολογία με το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα *Prospero* στη *Drosophila melanogaster*. Όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο του *Prox1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 737 αμινοξέων με μοριακό βάρος 84 kDa (Hong et al., 2003) και αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, μία περιοχή που είναι ίδια με της πρωτεΐνης *Prospero* και μία περιοχή homeodomain (Lavado et al., 2007). Ομόλογες πρωτεΐνες του *Prox1* έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλα σπονδυλωτά, όπως *Xenopus*, *Zebra fish*, κοτόπουλο και άνθρωπο (Tomarev et al., 1996; Glasgow and Tomarev, 1998; Ny et al., 2005). Στα σπονδυλωτά, η πρωτεΐνη *Prox1* εκφράζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, στον αμφιβληστροειδή, στον φακό των ματιών, στον κοχλία του αυτιού, στον μυελό των οστών, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, στην καρδιά, στο ήπαρ, στο πάγκρεας και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του λεμφικού συστήματος (Oliver et al., 1993; Tomarev et al., 1996; Glasgow and Tomarev, 1996; Wigle and Oliver, 1999; Burke and Oliver, 2002; Wigle et al., 2002; Wang et al., 2005; Bermingham-McDonogh et al., 2006). Στον ποντικό, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με λειτουργική απενεργοποίηση του *Prox1* έχουν δείξει ότι η δράση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι απαραίτητη για το σχηματισμό διαφόρων οργάνων και κυτταρικών τύπων όπως των φακών του ματιού, του αμφιβληστροειδούς, του ήπατος, του παγκρέατος της καρδιάς και των ενδοθηλιακών κυττάρων του λεμφικού συστήματος (Wigle et al., 1999; Sosa-Pineda et al., 2000; Hong et al., 2002; Dyer et al., 2003; Harvey et al., 2005; Wang et al., 2005; Risebro et al., 2009). Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι ο *Prox1* είναι ένας βασικός ρυθμιστής της οργανογένεσης.

Επιπλέον, ο *Prox1* έχειδειχθεί ότι διαθέτει θεμελιώδη δράση κατά τη διάρκεια της καρδιακής μορφογένεσης (Risebro et al., 2009). Ο *Prox1* εκφράζεται στην αναπτυσσόμενη καρδιά (Oliver et al., 1993; Tomarev et al., 1996; Wigle et al., 1999) και έμβρυα ποντικών που φέρουν μη λειτουργικό *Prox1* πεθαίνουν γύρω στη 14.5^η (E14.5) μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

1.5.4 Δράση του *Prox1* στον έλεγχο ενεργειακού μεταβολισμού

Ο σχετιζόμενος με οιστρογόνα υποδοχέας α (ERR α) και ο συνενεργοποιητής 1 α του υποδοχέα γ , (PGC-1 α), διαδραματίζουν κεντρικούς ρόλους στο μεταγραφικό έλεγχο της ομοιόστασης της ενέργειας, αλλά λίγα είναι γνωστά για τους παράγοντες που ρυθμίζουν τη δραστηριότητά τους.

Η πρωτεΐνη *Prox1*, βρέθηκε ως ένας από αυτούς τους παράγοντες. Ο *Prox1* αλληλεπιδρά με τους ERR α και PGC-1 α , καταλαμβάνει υποκινητές των μεταβολικών γονιδίων σε κλίμακα γονιδιώματος και αναστέλλει τη δραστηριότητα του συμπλέγματος ERR α /PGC-1 α . Ανάλυση του DNA μοτίβου δείχνει ότι ο *Prox1* αλληλεπιδρά με το γονιδίωμα, μέσω πρόσδεσης στον ERR α και άλλους παράγοντες. Είναι σημαντικό ότι η κατάλυση των *Prox1* και ERR α έχει αντίθετες επιπτώσεις στην παραγωγή ενέργειας μέσω συστήματος αναπνευστικής αλυσίδας OXPHOS, αποκαλύπτοντας ένα απροσδόκητο ρόλο του *Prox1* στον έλεγχο της ομοιόστασης της ενέργειας.

Η ρύθμιση της ομοιόστασης της ενέργειας περιλαμβάνει περίτεχνες βιοχημικές οδούς που έχουν εξελιχθεί για να αντιδράσουν στις μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού, για την αντιμετώπιση συγκεκριμένων καταστάσεων της φυσιολογίας. Ενώ η ομοιοστατική ρύθμιση είναι γενικά υπό ορμονικό έλεγχο και επιτυγχάνεται μέσω αλλοστερικού ελέγχου και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μεταβολικών ενζύμων για τις άμεσες ανάγκες, οι ειδικές απαιτήσεις του οργάνου και η διαρκής προσαρμογή, απαιτούν ρύθμιση μεταβολικών γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο, μέσω της δράσης διάφορων κατηγοριών μεταγραφικών παραγόντων και συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Desvergne et al 2006; Feige and Auwerx, 2007).

Μεταξύ των παραγόντων αυτών, ο ορφανός πυρηνικός υποδοχέας που ονομάζεται «σχετιζόμενος με οιστρογόνα υποδοχέας α » (ERR α , NR3B1) και ο συν-ρυθμιστής που ονομάζεται «συνενεργοποιητής 1 α του υποδοχέα γ », (PGC-1 α), έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στον έλεγχο διαφόρων πτυχών του μεταβολισμού της ενέργειας, από τις οποίες, μεγαλύτερη σημασία έχουν η μιτοχονδριακή βιογένεση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) (Lin et al., 2005; Giguere, 2008).

2. Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, οι στεροειδείς ορμόνες ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, ο ενεργειακός μεταβολισμός καθώς και οι ανοσολογικές αποκρίσεις. Συγκεκριμένα, εισέρχονται στα κύτταρα με διάχυση και συνδέονται ενδοκυτταρικά με τους υποδοχείς τους. Η σύνδεση αυτή προκαλεί τροποποίηση του μορίου του υποδοχέα, καθιστώντας τον έτσι ικανό να μεταφέρεται στον πυρήνα, να συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στη χρωματίνη, για τις οποίες έχει ισχυρή συγγένεια και να τροποποιεί τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων.

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και μάλιστα είναι ο πρώτος υποδοχέας στεροειδών ορμονών που απομονώθηκε και μελετήθηκε λεπτομερώς. Ειδικότερα, συνδέεται στα GREs, ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων είτε θετικά είτε αρνητικά διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό κυττάρων καθώς και στον ενεργειακό μεταβολισμό.

Ο πρωτεϊνικός παράγοντας Prox1, από την άλλη, είναι και αυτός, όπως ήδη έχουμε επισημάνει, ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ανάπτυξη καθώς και στον ενεργειακό μεταβολισμό.

Δεδομένου ότι οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες (GR και Prox1) εμπλέκονται στη ρύθμιση κοινών κυτταρικών λειτουργιών, σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και η διασαφήνιση του μηχανισμού επίτευξης της πιθανής αυτής δράσης.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα ήπατος (HepG2) και ενδομητρίου (HeLa) είχαν στόχο να διερευνήσουν εάν και πώς ο Prox1 επηρεάζει τη δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και στη συνέχεια να γίνει χαρτογράφηση των περιοχών του μορίου του Prox1 που ευθύνονται για την εκδήλωση αυτής της δράσης.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Διαλύματα

A) Θρεπτικό διάλυμα για καλλιέργεια κυττάρων:

- DMEM
- FBS 10%
- 1/100 Πενικιλίνη/στρεπτομοκίνη
- 200mM L-Γλουταμίνη

B) Θρεπτικό διάλυμα για πειράματα διαμόλυνσης:

- OPTIMEM

Γ) Κρυοπροστατευτικό διάλυμα κυττάρων:

- DMSO 10%
- FBS 90%

Δ) Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου:

i) Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (1x Running buffer): 25mM Tris, 192mM Γλυκίνη, 0,1% SDS, pH 8,3

ii) Διαλύματα stock για πήκτωμα ακρυλαμιδίου:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl 1,5M, pH 8,8
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl 1,5M, pH 6,8
- SDS 10% v/w
- Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο : 29/1) σε ddH₂O

iii) Loading Buffer (1,5M Tris pH 6,8, 10% Γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-Μερκαπτοαιθανόλη, 1% Μπλε της βρωμοφαινόλης)

Ε) Διαλύματα για το πήκτωμα ακρυλαμιδίου:

Ανάλογα με τις διαστάσεις της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, αναζητούμε τους πίνακες για την ποσότητα των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμείξουμε και προσθέτουμε στο τέλος τους καταλύτες APS 10% και TEMED.

ΣΤ) Διαλύματα για ανοσοαποτύπωση (Western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

- i) Transfer buffer 1x: 25mM Tris, 192mM Γλυκίνη, 0,1% SDS, Μεθανόλη 20%
- ii) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών [Phosphate Buffer Salts (PBS)] (1x): 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄

Z) Blocking Buffer:

- PBS-T
- Άπαχο γάλα σε σκόνη

Η) Διάλυμα για πλύσεις μεμβράνης νιτροκυτταρίνης:

- PBS-T (0,1% Tween 20 σε PBS)

Θ) Διαλύματα για ανίχνευση σήματος:

- ECL: Solution A και B (Chemicon)
- Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Kodak)
- Διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Kodak)

Ι) Διαλύματα για Ανοσοκατακρήμνιση:

- RIPA buffer [(10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA και 0.1% Nonidet P40) μαζί με αναστολείς πρωτεασών]
- PBS x10 (91mM Na₂HPO₄, 17mM NaH₂PO₄, 1500 mM NaCl).

3.1.2 Χημικά

- APS (Ammonium Persulfate) (Sigma)

- Bradford protein assay (Bio-rad)
- DMEM (Gibco)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- HCl (Merck)
- KCl (Merck)
- KH_2PO_4 (Merck)
- Lipofectamin 2000 (Invitrogen)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaH_2PO_4 (Merck)
- NaOH (Merck)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Rezilait)
- Temed (N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακρυλαμίδιο (Sigma)
- β-Μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Δις-ακρυλαμίδιο (Sigma)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης whatman (Protran)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (Research Organics)

3.1.3 Αντισώματα

A) 2F8 μονοκλωνικό αντίσωμα: Αποτελεί ευγενική προσφορά του Δρ. Μιχάλη Αλέξη, καθηγητή Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ.), Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΕΒ)

B) β-ακτινης μονοκλωνικό αντίσωμα (Sigma)

Γ) Prox1 αντίσωμα από κόνικλο (Reliatech)

Δ) H300 πολυκλωνικό αντίσωμα από κόνικλο (Santa-Cruz)

E) : Anti-rabbit HRP, Anti-mouse HRP: δευτερογενή για western blot

3.1.4 *Κυτταρικές σειρές*

HeLa: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου

HepG2: Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ήπατος

3.1.5 *Όργανα*

Χρησιμοποιήθηκαν όργανα και αναλώσιμα από:

- Αίθουσα κυτταροκαλλιεργειών TBB
- Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας TBB

Τα σημαντικότερα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R erppendorf, φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5415R, λουμινόμετρο (Berhold), συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-rad), συσκευή ηλεκτρομεταφοράς για western blot (semidry transfer system, Wealtec Yrdimes), φωτόμετρο (Spectronic Instruments), αναδευτήρας τύπου GFL 3015, πεχάμετρο (744 pH Meter, Ω. Metrohm), ζυγός (KERN),

3.2 **Μέθοδοι**

3.2.1 *Διαδικασίες για καλλιέργεια κυττάρων HepG2 / HeLa*

A) Απόψυξη κυττάρων HepG2/HeLa

Αρχικά, τα φιαλίδια (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα στους -80°C , όπου ήταν αποθηκευμένα, τοποθετούνται αμέσως στο υδατόλουτρο στους 37°C , ώστε να ξεπαγώσουν. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα γίνεται καθαρισμός του φιαλιδίου με 70% αιθανόλη εξωτερικά, ώστε να μπορεί να μεταφερθεί στον απαγωγό όπου πρέπει να είναι στείρες οι συνθήκες. Έπειτα, ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε πλαστικό σωλήνα 15ml και γίνεται προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένο με 10%FBS, 1/100 πενικιλίνη/στρεπτομοκίνη και L-Γλουταμίνη (πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 37°C για 4-5 ώρες μέχρι να προσκολληθούν στο ταπήτιο της πλαστικής φλάσκας.

B) Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση)

Η ανακαλλιέργεια με θρυψίνη πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει όλο το ταπήτιο της φλάσκας (90-100% πληρότητα), οπότε δεν υπάρχει πλέον χώρος ώστε να αναπτυχθούν περαιτέρω. Αρχικά, παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο και ελέγχεται η μορφολογία τους καθώς και η πληρότητα του ταπητίου τους (confluency). Έπειτα, απομακρύνεται (με αναρρόφηση) το υλικό της καλλιέργειας και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.25%. Στη συνέχεια, ανακινείται η φλάσκα έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και παρατηρούνται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Μεταφέρονται, έπειτα, τα κύτταρα στον επωαστήρα (37°C) για περίπου 1-2 λεπτά και αμέσως μετά παρατηρείται το σχήμα των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Παράλληλα, με ελαφρά χτυπήματα στη φλάσκα, αποκολλώνται τα κύτταρα από το ταπήτιο της φλάσκας και προστίθεται πενταπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης. Λαμβάνεται, στη συνέχεια, η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/10 για κύτταρα HeLa, 1/3 για κύτταρα HepG2) για τη νέα ή τις νέες φλάσκες και προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα θρεπτικού υλικού. Τέλος, διασπείρονται τα κύτταρα ομοιόμορφα στη φλάσκα ώστε να αναπτυχθούν.

Γ) Συλλογή κυττάρων

Αρχικά, για τη συλλογή κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό τους και ακολουθεί πλύση τους 3 φορές με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1X. Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικού πλαστικού scraper πραγματοποιείται η πλήρης αποκόλληση τους και με προσοχή μεταφέρονται τα κύτταρα σε falcon των 15ml. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 1200rpm (500g) στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C.

Δ) Μέτρηση κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη βοήθεια αιμοκυττόμετρου (πλάκα Newbuer).

Ε) Λύση κυττάρων

Αρχικά, πραγματοποιείται επαναδιάλυση του κυτταρικού ιζήματος που συλλέχθηκε και αποθηκεύθηκε σε RIPA Buffer $\times 1$. Έπειτα, με τη βοήθεια sonicator επιτυγχάνεται η λύση των κυττάρων με υπερήχους.

3.2.2 Διαμόλυνση κυττάρων HeLa με λιποφεκταμίνη

Η διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για να εισαχθεί γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα μέσω των λιποσωμάτων τα οποία εύκολα μπορούν να απορροφηθούν από την κυτταρική μεμβράνη αφού και τα δύο αποτελούνται από φωσφορική διπλοστιβάδα. Τα βασικά πλεονεκτήματά της είναι η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε όλους τους τύπους νουκλεϊκών οξέων και σε πολλά είδη κυττάρων, ενώ παράλληλα υπάρχει ευκολία στη χρήση της και σχετικά χαμηλή τοξικότητα.

Διαδικασία:

1) Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει θρυψινοποίηση μιας T75 φλάσκας στην οποία η πληρότητα σε κύτταρα είναι περίπου 100%. Έπειτα, προσδιορίζεται ο αριθμός των κυττάρων με μέτρηση σε πλάκα Newbuer (αιμοκυττόμετρο).

2) Σε κάθε well ενός 6-well plate προστίθενται 7×10^4 κύτταρα από τα παραπάνω θρυψινοποιημένα κύτταρα έτσι ώστε να υπάρχει πληρότητα περίπου 70-80% την επόμενη μέρα σε κάθε well μετά από επώαση στους 37°C. Η πληρότητα αυτή ενδεικνύεται για τη διαμόλυνση.

3) Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιείται λιποφεκταμίνη. Μεταβολές των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων DNA και λιποφεκταμίνης είναι απαραίτητες για την βελτιστοποίηση της διαμόλυνσης.

4) Για το σχηματισμό των λιποσωμάτων ετοιμάζονται δύο διαλύματα: ένα DNA mix και ένα Lipo mix σύμφωνα με τους εξής κανόνες:

- i) ο λόγος γ DNA/ λ χρησιμοποιούμενης λιποφεκταμίνης ισούται με 1/2
- ii) 50 λ OPTIMEM/ γ DNA (για προετοιμασία του DNA mix)
- iii) 50 λ OPTIMEM/2 λ Λιποφεκταμίνης (για την προετοιμασία του Lipo mix)
- iv) 0,5 γ DNA απαιτείται για τη διαμόλυνση των κυττάρων κάθε well ενός 6-well plate.

5) Για την παρασκευή του transfection mix αναμιγνύονται τα DNA mix και Lipo mix και αφήνονται να επωαστούν για 5-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6) Παράλληλα απομακρύνεται από κάθε well το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και γίνεται έκπλυση των κυττάρων με κρύο και αποστειρωμένο PBS 1x τρεις φορές. Πριν την προσθήκη του transfection mix προστίθεται θρεπτικό OPTIMEM χωρίς αντιβιοτικά-αντιμυκηκωτικά και χωρίς ορό (FBS) σε κάθε well (0,2ml/well).

7) Μετά το πέρας του χρόνου επώασης του transfection mix, μοιράζεται το τελευταίο στα κύτταρα που προορίζονται για διαμόλυνση και το 24-well plate μένει για επώαση στους 37°C.

8) Έπειτα από 4 ώρες, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα διαμολυσμένα κύτταρα και το αντικαθιστάται με DMEM 10% FBS, 1% Αντιβιοτικά (pen/strep), 1% L-γλουταμίνη (πλήρες θρεπτικό υλικό).

9) Κατόπιν, επωάζονται τα κύτταρα για 24 ώρες.

10) Έπειτα, γίνεται έκπλυση με PBS και λύση σε LB×1 (Promega) για 30 λεπτά στους 4°C.

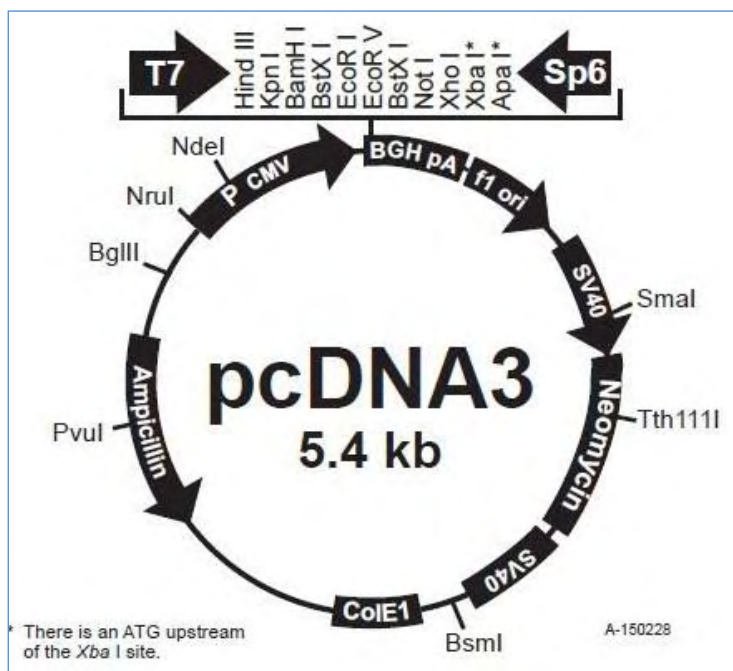
11) Στη συνέχεια, συλλέγονται τα κύτταρα και φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 13000 rpm.

12) Τέλος, το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C.

Πλασμιδιακοί Φορείς:

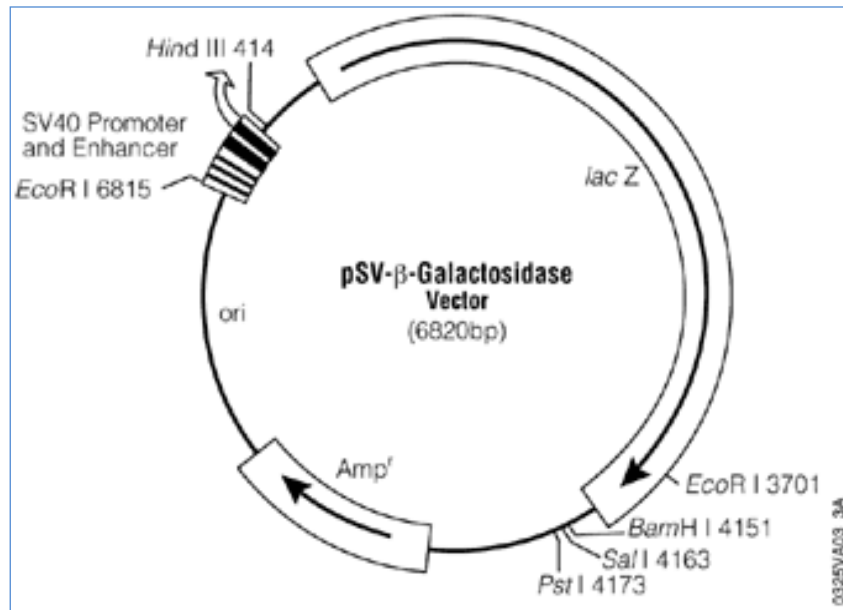
Τα κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με τους ακόλουθους πλασμιδιακούς φορείς:

A) pCDNA₃:



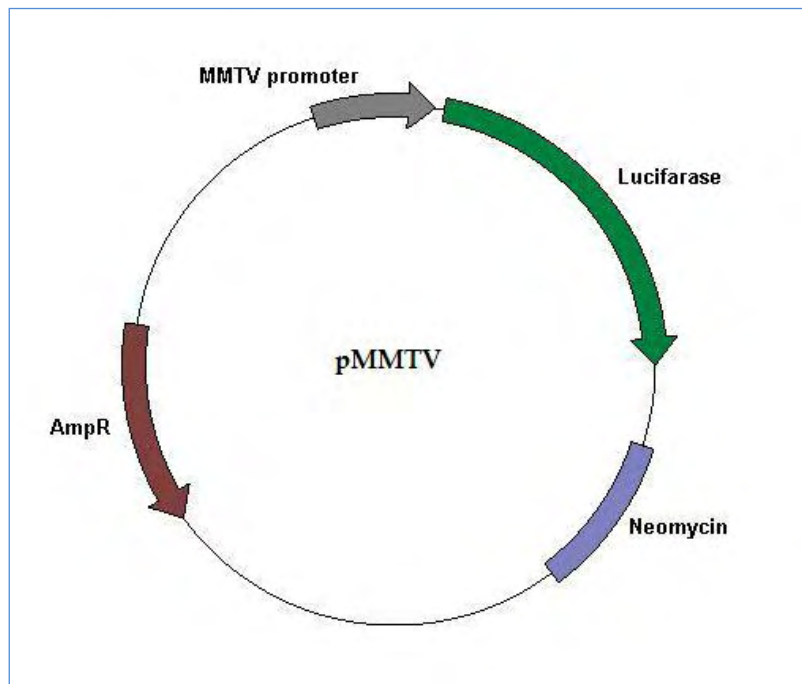
Εικόνα 8: Πλασμίδιο pCDNA₃

Β) Β-gal πλασμιδιακός φορέας:



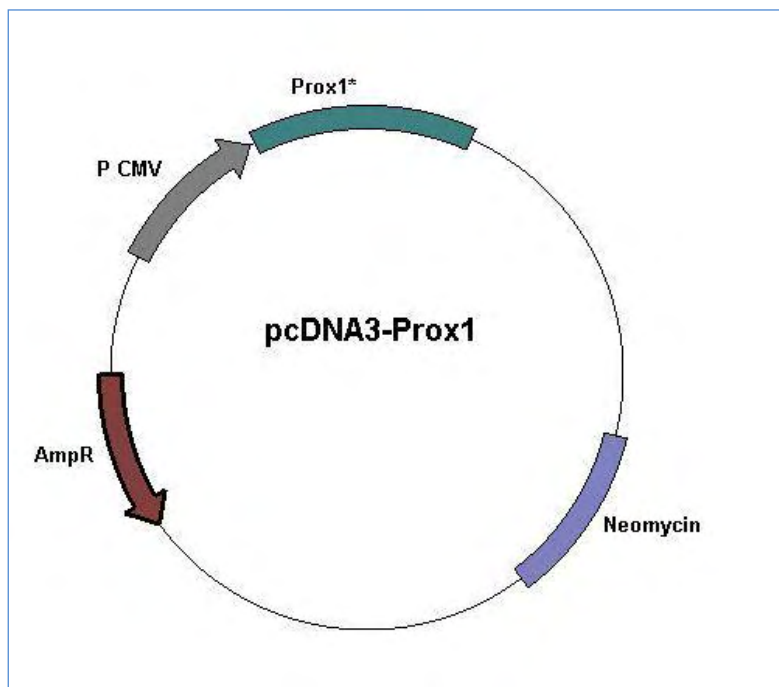
Εικόνα 9: Πλασμιδιακός φορέας Β-gal

Γ) Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-GRE-luciferase:



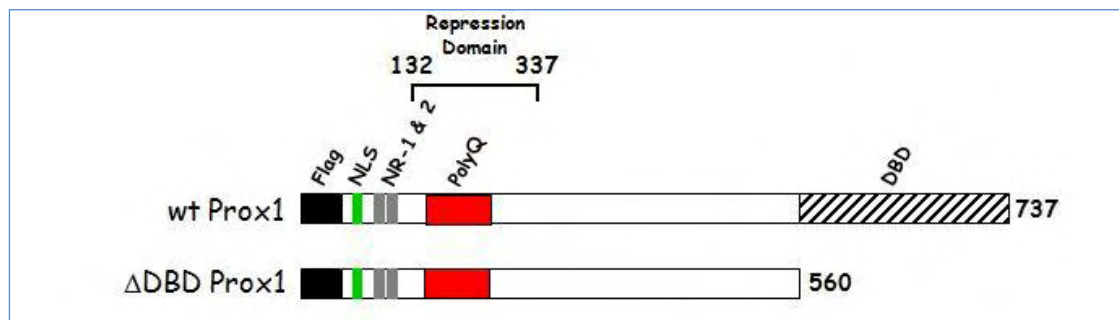
Εικόνα 10: Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-luciferase, όπου ο υποκινητής φέρει GREs αλληλουχίες

Δ) pCDNA₃-Prox1*:

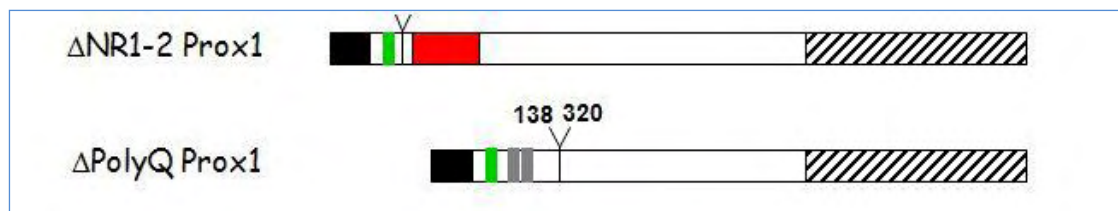


Εικόνα 11: Πλασμιδιακός φορέας pCDNA3 με ένθεμα τον PROX1*.

Το ένθεμα μπορεί να είναι είτε το γονίδιο του Prox1 ακέραιο είτε με αφαίρεση συγκεκριμένων περιοχών, όπως για παράδειγμα η DBD (DNA Binding Domain) περιοχή (**Εικόνα 12**), η οποία αποτελεί περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, η NR (Nuclear Receptor) περιοχή, η οποία έχει χαρτογραφηθεί ως περιοχή αλληλεπίδρασης με πυρηνικούς υποδοχείς και η PolyQ περιοχή, η οποία έχει βρεθεί ότι εσθθνεται για την κατασταλτική δράση του Prox1 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 12: Ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 αρχικά ακέραιος (wt Prox1) και στη συνέχεια χωρίς την περιοχή DBD (ΔDBD Prox1).



Εικόνα 13: Ο μεταγραφικός παράγοντας *Prox1* χωρίς τις περιοχές NR (Δ NR) και PolyQ (Δ PolyQ)

3.2.3 Μέθοδος λουσιφεράσης/ β -γαλακτοζιδάσης

A) Δοκιμασία Β-γαλακτοζιδάσης

Η έκφραση του γονιδίου της β -γαλακτοζιδάσης δεν υπόκειται σε έλεγχο μεταγραφής από τον *Prox1* και από τον GR και προσδιορίζεται για την επίτευξη κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων έκφρασης του γονιδίου λουσιφεράσης.

Αρχή της μεθόδου:

Η β -γαλακτοζιδάση μπορεί να αναλυθεί, μετρώντας την υδρόλυση του χρωμογόνου υποστρώματος, OPNG (o-nitrophenyl- β -D-galactosidase) όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Miller, 1972).



Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να μετρηθεί προσδιορίζοντας την απορρόφηση στα 420nm. Αν το OPNG που προστίθεται είναι σε περίσσεια τότε το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που παράγεται είναι ανάλογο του ποσού της β -γαλακτοζιδάσης και του χρόνου της αντίδρασης. Η αντίδραση σταματά προσθέτοντας Na_2CO_3 το οποίο διαμορφώνει το pH της αντίδρασης στο 11. Σε αυτό το pH η ο-νιτροφαινόλη μετατρέπεται σε κίτρινη ανιονική μορφή και η β -γαλακτοζιδάση απενεργοποιείται.

Διαδικασία:

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης για κάθε δείγμα, χρησιμοποιούνται 3μl 100x διάλυμα Mg, 201μl 0.1 sodium phosphate (pH 7,5), 30μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 66μl 1x ONPG που είναι και το υπόστρωμα της β -γαλακτοζιδάσης. Ετοιμάζεται πάντα και ένα δείγμα ελέγχου το οποίο περιέχει όλα τα διαλύματα της αντίδρασης εκτός από το κυτταρικό εκχύλισμα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 37°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η αντίδραση και να αρχίσουν να παίρνουν

κίτρινο χρώμα. Μόλις τα δείγματα αρχίζουν να παίρνουν κίτρινο χρώμα, τερματίζεται η αντίδραση με την προσθήκη 500μl 1M Na₂CO₃. Τέλος, μετριέται η απορρόφηση για κάθε δείγμα στα 420nm στο φασματοφωτόμετρο. Η μέτρηση αρχικά ρυθμίζεται βάσει της μηδενικής τιμής του δείγματος ελέγχου. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας της λουσιφεράσης προκύπτει από το λόγο των μονάδων της ενεργότητας της λουσιφεράσης (RLU) προς την απορρόφηση των ίδιων δειγμάτων για την β-gal. Τα αποτελέσματα αναπαριστώνται σε διάγραμμα με τη χρήση του προγράμματος Microsoft excel.

B) Λουσιφεράση

Αρχή της μεθόδου:

Στις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας, το φως παράγεται από την οξείδωση της λουσιφερίνης (μια χρωστική):

- **Lousiferin + O₂ → oxiluciferin + light**

Οι πιο συνηθισμένες αντιδράσεις ανοσοφθορισμού απελευθερώνουν CO₂ σαν προϊόν. Τα επίπεδα αυτής της αντίδρασης μεταξύ λουσιφερίνης και οξυγόνου είναι πολύ αργά μέχρι να καταλυθούν από τη λουσιφεράση, με την παρουσία μερικές φορές συμπαραγόντων, όπως ιόντα ασβεστίου ή ATP. Η αντίδραση καταλύεται από τη λουσιφεράση και πραγματοποιείται σε δύο βήματα:

- **Lousiferin + ATP → luciferyl adenylate + PPi**

- **Luciferyl adenylate + O₂ → oxiluciferin + AMP + light**

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η ενέργεια που εισέρχεται μετατρέπεται σε φως.

Διαδικασία:

Για τη μέθοδο της λουσιφεράσης τα κύτταρα HeLa καλλιεργούνται σε 24-well plate, σε τελικό όγκο καλλιέργειας και θρεπτικού 0,5ml στο κάθε well. Αφού πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση των κυττάρων, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, μετά από δύο μέρες πραγματοποιείται η διαδικασία της μεθόδου της λουσιφεράσης. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τις κυτταρικές καλλιέργειες HeLa και τα πιάτα ξεπλένονται με 1x PBS δύο φορές και στη συνέχεια προστίθεται 70μl 1x Report Lysis Buffer (RLB) και τα κύτταρα επώάζονται στους 4°C, αναδεύονται για 30 λεπτά και συλλέγονται σε δύο eppendorfs. Έπειτα, πραγματοποιείται η μέθοδος της λουσιφεράσης όπου χρησιμοποιούνται από κάθε δείγμα 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 100μl διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης έχει προετοιμαστεί νωρίτερα και αποτελείται από

20mM Tris PH 8, 2,67mM MgSO₄, 0,1mM EDTA, 33,3mM DTT, 270μM Co enzyme-A, 470μM Luciferine, 530μM ATP, dH₂O. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης μετρείται στο λουμινόμετρο σε μονάδες RLU. Ύστερα από τη μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης, πραγματοποιείται η διαδικασία μέτρησης έκφρασης της β-γαλακτοζιδάσης, με την οποία πιστοποιείται η επιτυχία της διαμόλυνσης και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.2.4 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος

Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός διαλύματος σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford και με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford protein assay της Bio-rad. Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι μια χρωστική, η Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία είναι γνωστή και ως αντιδραστήριο Bradford, προσδένεται σε συγκεκριμένα αμινοξέα που συναντώνται στις περισσότερες πρωτεΐνες. Όταν η χρωστική προσδεθεί κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και pH στα αμινοξέα, τότε το χρώμα της μεταβάλλεται από κοκκινωπό-καφέ σε μπλε. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της πρωτεΐνης σε ένα δείγμα, τόσο εντονότερο εμφανίζεται και το μπλε χρώμα στο διάλυμα. Αυτή η μεταβολή του χρώματος είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος σε ένα φασματοφωτόμετρο στα 595nm. Η μέθοδος Bradford μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1 μg/mL έως 1500μg/mL.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέθοδος Bradford, αρχικά παρασκευάζεται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin), συνήθως μέσω αραιώσεων ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, σε 20μL από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0,2-1,4 mg/ml) προστίθεται 1ml Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης έπειτα από 5 λεπτά έως και 60 λεπτά. Τα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford και οι τιμές της απορρόφησης τους μετριοούνται σε ένα φασματοφωτόμετρο, στα 595nm. Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό μια καμπύλης αναφοράς. Στην καμπύλη αναφοράς, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τοποθετείται στον άξονα των x,

ενώ η απορρόφηση στον άξονα των y . Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα δείγματα υπολογίζονται με βάση την εξίσωση της καμπύλη αναφοράς.

3.2.5 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western που πραγματοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS). Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE) σύμφωνα με την μέθοδο του Laemmli (1970).

Αρχή της μεθόδου:

Οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος ηλεκτρικού πεδίου και η σχετική ταχύτητα κίνησης εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα από τις μεγαλύτερες στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μέγεθός τους.

Διαδικασία:

A) Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή ακρυλαμιδίου διακρίνεται σε δύο επιμέρους μέρη:

i) Το πρώτο τμήμα αποτελείται από τη πηκτή συσσώρευσης (stacking gel), όπου τα δείγματα πακετάρονται με σταθερή τάση 100V και έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμιδίου 4%, ανεξάρτητο από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών.

Πίνακας 1: Σύσταση πηκτής επιστοιβαξής

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο 40%	7,5%
Tris-HCl 1,5M (pH6,8)	0,125M
SDS 10%	0,1%
TEMED	0,1%
APS 10%	0,05%
ddH ₂ O	-

Το δεύτερο τμήμα αποτελείται από την πηκτή διαχωρισμού (separating gel/running gel), της οποίας το ποσοστό ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών που επιθυμούμε να ηλεκτροφορήσουμε. Για τα συγκεκριμένα πειράματα, χρησιμοποιήσαμε 7,5% ποσοστό ακρυλαμιδίου.

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού συγκέντρωσης 7,5%

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση
Ακρυλαμίδιο 40%	7,5%
Tris-HCl 1,5M (pH8,8)	0,375M
SDS 10%	0,1%
TEMED	0,05%
APS 10%	0,05%
ddH ₂ O	-

Σημείωση: Το APS (Ammonium Persulfate: υπερθειϊκό αμμώνιο-απαρχητής του πολυμερισμού) και το TEMED (N, N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη-επιταχυντής του πολυμερισμού) προστίθενται με ταχύτητα στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για έναρξη και την επιτάχυνση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

B) Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν φορτωθούν στην πηκτή περιλαμβάνει την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος διαχωρισμού σε αυτά [loading buffer 4x (1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue)] με σκοπό τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η μετουσίωση επιτυγχάνεται επίσης με τη θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C, για 5 λεπτά.

Γ) Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

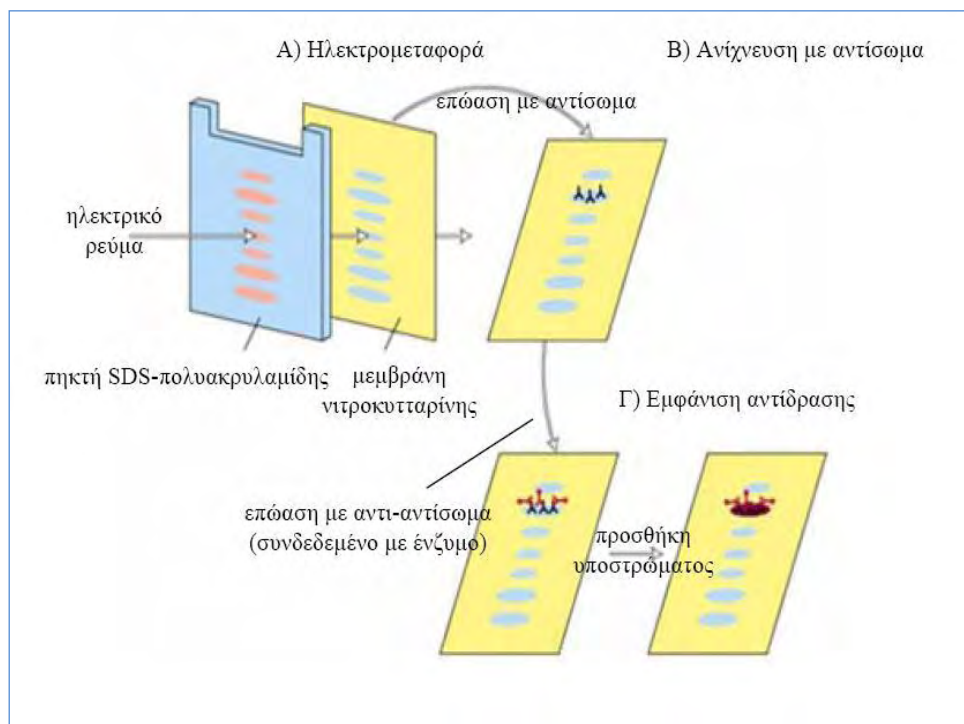
Αφού εξασφαλισθεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα δείγματα και οι μάρτυρες μοριακού βάρους φορτώνονται στις ειδικές αύλακες της πηκτής. Έπειτα, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), έτσι ώστε να έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης

και εφαρμόζεται τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιτοίβαξης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 120V.

3.2.6 Ανοσοαποτόπωση Western (Western Blot)

Αρχή της μεθόδου:

Η τεχνική της ανοσοαποτόπωσης Western είναι μια αποτελεσματική τεχνική για την ανίχνευση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα δείγματα των πρωτεϊνών αρχικά ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, στη συνέχεια αποτυπώνονται σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτρομεταφορά και, τέλος, πραγματοποιείται η διαδικασία εμφάνισης σήματος (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Ανοσοαποτόπωση Western: A) Ηλεκτρομεταφορά. B) Ανίχνευση με αντίσωμα. Γ) Εμφάνιση αντίδρασης.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες του δείγματος κινούνται και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες

στις οποίες το μέγεθός τους αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα τους. Κατά τη ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οι πρωτεΐνες κινούνται με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και εγκλωβίζονται στο πλέγμα της μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες, κατά τη μεταφορά τους αυτή, διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι μπορούν να αναγνωριστούν από τα αντισώματα στη συνέχεια. Συγκεκριμένα, αρχικά, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα που περιέχει το ειδικό αντίσωμα, το οποίο και θα δεσμευτεί σε αυτή και έπειτα ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί.

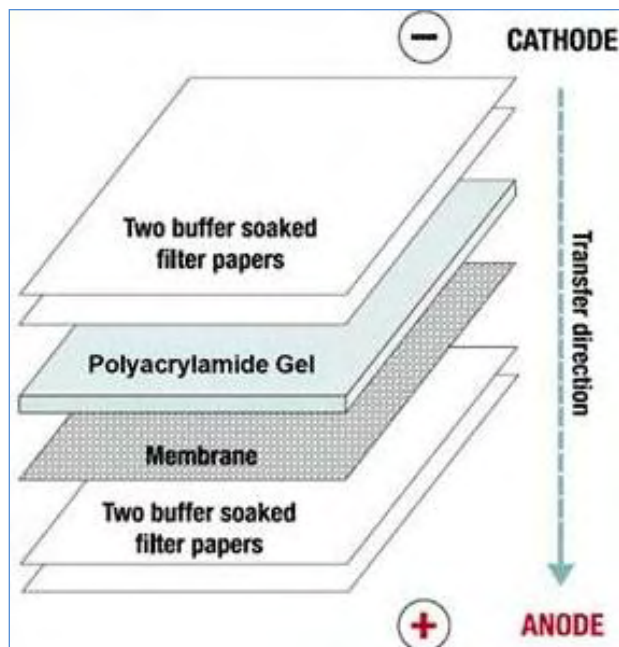
Διαδικασία:

Αρχικά, σύμφωνα με τον Bradford (1976), υπολογίζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων σε πρωτεΐνη που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Ακόμα, κατά τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, ηλεκτροφορούνται 30μg πρωτεΐνης σε πηκτή 7,5% SDS-PAGE στα 100V για το stacking gel και στα 120V για το separating gel, όπως περιέγραψε ο Laemmli (1970) και μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σύμφωνα με τους Towbin, Staehelin και Gordon (1979).

Αμέσως μετά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται σε μια λεκάνη που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη και η πηκτή τοποθετούνται ανάμεσα σε 4 διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm, αφού έχουν και αυτά εμποτιστεί στο ίδιο διάλυμα. Η τοποθέτηση τους στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται με τη μεμβράνη προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και την πηκτή στον αρνητικό, ώστε οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται από την πηκτή στη μεμβράνη κατά την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος. Η επαφή μεταξύ τους πρέπει να είναι άμεση και χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά γίνεται για 75 περίπου λεπτά (ο χρόνος εξαρτάται από τις ανάγκες του πειράματος), κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 350mA (**Εικόνα 15**).

Μετά τη μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, η μεμβράνη επωάζεται σε 10ml Blocking Buffer για 1 ώρα υπό ελαφριά ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Με το διάλυμα αυτό, επέρχεται κορεσμός της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες του γάλακτος, με αποτέλεσμα να καλύπτονται τα κενά και το αντίσωμα που εισέρχεται μετά να δεσμεύεται μόνο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη για την οποία

προστίθεται (κάλυψη μη ειδικών θέσεων δέσμευσης). Ακολουθεί πλύση της μεμβράνης με PBS-T.



Εικόνα 15: Συναρμολόγηση συσκευής ηλεκτρομεταφοράς.

Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης overnight με 5ml διαλύματος που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση [1:300 (Prox1)-1:500 (GR)] στους 4°C . Το πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύει μόνο τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη την οποία αναγνωρίζει. Έπειτα, η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές σε PBS-T για 10 λεπτά, ώστε να αφαιρεθεί όλο το επιπλέον πρωτογενές αντίσωμα που δεν προσδέθηκε πάνω στη μεμβράνη. Ακολούθως, η μεμβράνη επώαζεται με το δευτερογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1:50000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ελαφρά ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει ομοιοπολικά προσδεμένο ένζυμο υπεροξειδάση και είναι υπεύθυνο για το σήμα που λαμβάνουμε στο τέλος της διαδικασίας, που δείχνει το σημείο στο οποίο βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με PBS-T για 10 λεπτά και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με κατάλληλο υπόστρωμα για το δευτερογενές αντίσωμα.

Εμφάνιση σήματος

Για την εμφάνιση του σήματος αρχικά χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της CHEMICON. Αυτό το kit περιλαμβάνει το Luminol/Enhancer διάλυμα (διάλυμα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος), το διάλυμα υπεροξειδίου και το διάλυμα

διαλυτοποίησης υπεροξειδίου, ώστε να υπάρξει εμφάνιση σήματος σε film στη συνέχεια. Ειδικότερα, προετοιμάζεται 1:1000 αραιώση, του διαλύματος αραιώσης του υπεροξειδίου με το διάλυμα υπεροξειδίου και στη συνέχεια, ενοποιούνται τα διαλύματα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος και διάλυμα υπεροξειδίου. Αυτό το ενοποιημένο διάλυμα είναι λειτουργικό για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, αυτό τοποθετείται στη μεμβράνη για 3 λεπτά, σε σημείο που να μην εκτίθεται στο φως, και μετά χωρίς να ξεπλυθεί η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασέτα.

Στη συνέχεια, τοποθετούνται στην κασέτα τα film στα οποία εμφανίζεται εντέλει το σήμα. Για την εμφάνιση των film χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της Kodak το οποίο περιλαμβάνει το διάλυμα developer και το διάλυμα fixer. Το film μετά την έκθεση του στη μεμβράνη (για όσο χρονικό διάστημα είναι επιθυμητό, το οποίο εξαρτάται από το πείραμα) τοποθετείται για 1 λεπτό στο διάλυμα developer και αφού ξεπλυθεί με νερό στιγμιαία, έπειτα τοποθετείται για 30 δευτερόλεπτα στο διάλυμα fixer. Τέλος, ακολουθεί νέο στιγμιαίο ξέπλυμα του film. Έτσι, το σήμα εμφανίζεται στο film και πλέον μπορεί να μελετηθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η διαδικασία εμφάνισης του film πρέπει να γίνεται σε σκοτεινό δωμάτιο ώστε να μην υπάρχει καταστροφή/κάψιμο των film.

3.2.7 Ανοσοκατακρήμνιση [Immunoprecipitation (IP)] σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση protein-A beads

Αρχικά, HepG2 κύτταρα που μεγαλώνουν σε 15cm πιάτα με DMEM, πλένονται με PBS δύο φορές, συλλέγονται σε PBS και φυγοκεντρούνται στα 500g για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίζημα λύεται σε RIPA buffer, μαζί με αναστολείς πρωτεασών, με υπερήχους (sonication), 3 φορές, για 20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται για 30min στις 13000 rpm, συλλέγεται το υπερκείμενο και προσδιορίζεται η ποσότητα των πρωτεϊνών στο εκχύλισμα με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα, ο τελικός όγκος του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που θα χρησιμοποιηθεί στο σύνολο στο πείραμα επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C για δύο ώρες με protein A agarose beads. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να απομακρυνθεί οτιδήποτε μπορεί να συνδεθεί μη ειδικά με τα beads και την πρωτεΐνη A. Η προετοιμασία των protein A agarose beads έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Pierce. Ύστερα από αυτή τη διαδικασία, το μείγμα φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 13000rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο. Κατόπιν, το μείγμα μοιράζεται σε τρία δείγματα έτσι

ώστε στο καθένα να αντιστοιχεί 2mg πρωτεΐνη. Στο ένα δείγμα προστίθεται 6μg μονοκλωνικού αντισώματος 2F8, στο δεύτερο 5 μl IgG από ποντικό και στο τρίτο δεν προστίθεται αντίσωμα. Και στα τρία δείγματα προστέθηκε μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο διάλυμα 3. Η επώαση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με το αντίσωμα γίνεται επί δεκαεξαώρου υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Έπειτα, πραγματοποιείται επώαση των δειγμάτων με protein A agarose beads για 3-4 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 2000rpm για 1 λεπτό, αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύση των protein A agarose beads με το διάλυμα 3. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές. Τέλος, τα protein A agarose beads αναδυσάλονται σε διάλυμα που περιέχει 1x DTT, 1xSDS, H₂O, τοποθετούνται στους 100°C για 10 λεπτά, υφίστανται φυγοκέντριση για 10min στις 13000rpm και προετοιμάζονται για ανάλυση western blot.

4. Αποτελέσματα

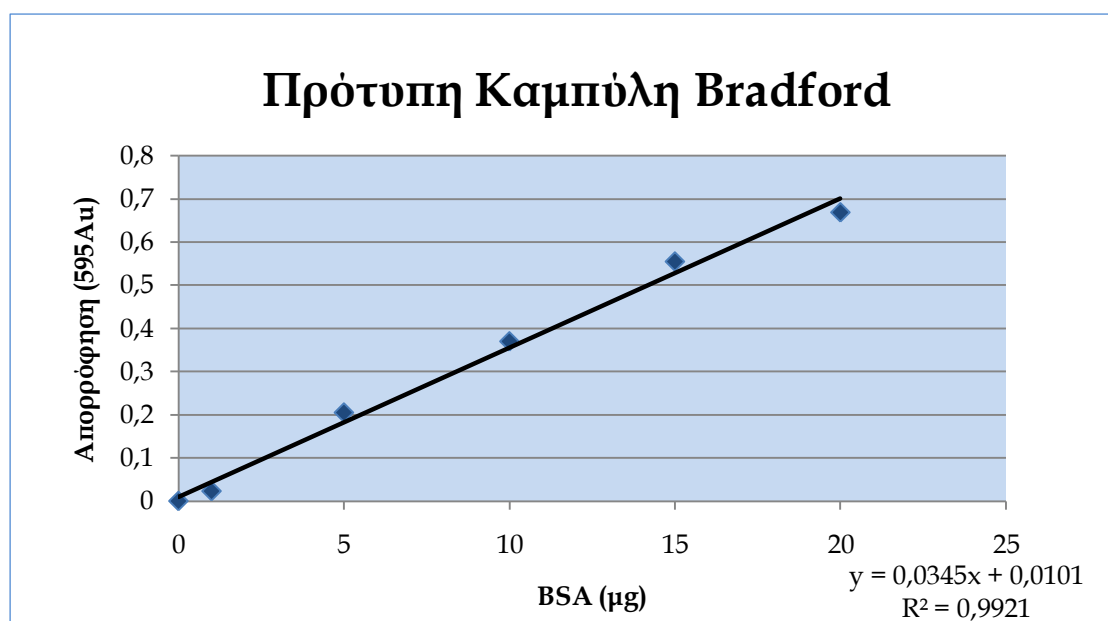
4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την ποσότητα πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό βοοειδών (BSA) στο δείγμα αντίδρασης μετρώντας την οπτική απορρόφηση δειγμάτων γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και η απορρόφηση του κάθε δειγματος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον **πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις δειγμάτων και απορροφήσεις τους.

BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mm pH7.4 (μl)	Bradford reagent X1 (μl)	BSA (μg)	A595nm (Au)	BSA (μg/μl)
0	20	980	0	0	0
1	19	980	1	0,023	1
5	15	980	5	0,205	5
10	10	980	10	0,370	10
15	5	980	15	0,555	15
20	0	980	20	0,669	20

Η πρότυπη καμπύλη που πήραμε έχει εξίσωση $y = 0,0345x + 0,0101$ και φαίνεται στο **διάγραμμα 1**.

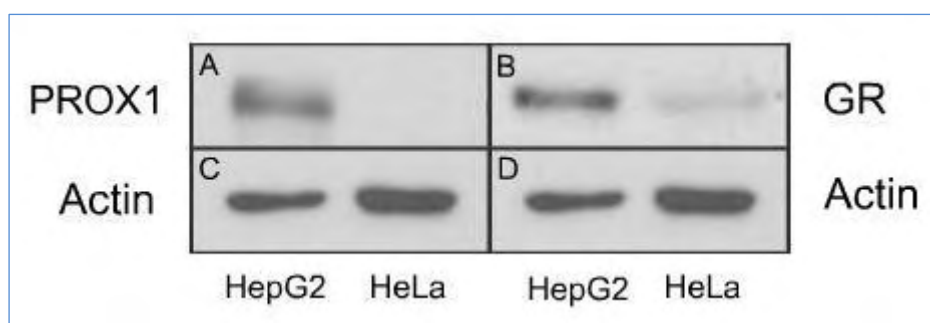


Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford.

Από την εξίσωση που μας δίνει η πρότυπη καμπύλη υπάρχει η δυνατότητα να υπολογιστεί η ποσότητα της πρωτεΐνης σε οποιοδήποτε δείγμα και γνωρίζοντας τον όγκο του δείγματος, στο οποίο αυτό περιέχεται, να υπολογιστεί και η συγκέντρωση.

4.2 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης υποδοχέα GR και Prox1 σε HepG2 και HeLa κύτταρα με ανοσοαποτόπωση

Για τον έλεγχο της ύπαρξης του GR και του Prox1 πραγματοποιήθηκε αρχικά ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών από δείγματα κυττάρων HepG2 και HeLa σε gel πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών του gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε επώαση της με αντισώματα έναντι αυτών (GR και Prox1). Η εμφάνιση του σήματος της ανοσοαποτόπωσης φαίνεται στην **εικόνα 16**.



Εικόνα 16: Ανοσοαποτόπωση GR και Prox1 σε HeLa και HepG2 εκχυλίσματα κυττάρων: (A) Παρουσία του Prox1 στα HepG2 κύτταρα και η απουσία του στα HeLa κύτταρα. (B) Παρουσία του GR και στα δύο είδη κυττάρων. (C) και (D) Η ακτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, επειδή εκφράζεται συνεχώς σε όλα τα κύτταρα, χωρίς η έκφραση της να υπόκειται σε έλεγχο από τους μεταγραφικούς παράγοντες που μελετάμε.

4.3 Διερεύνηση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στον έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR

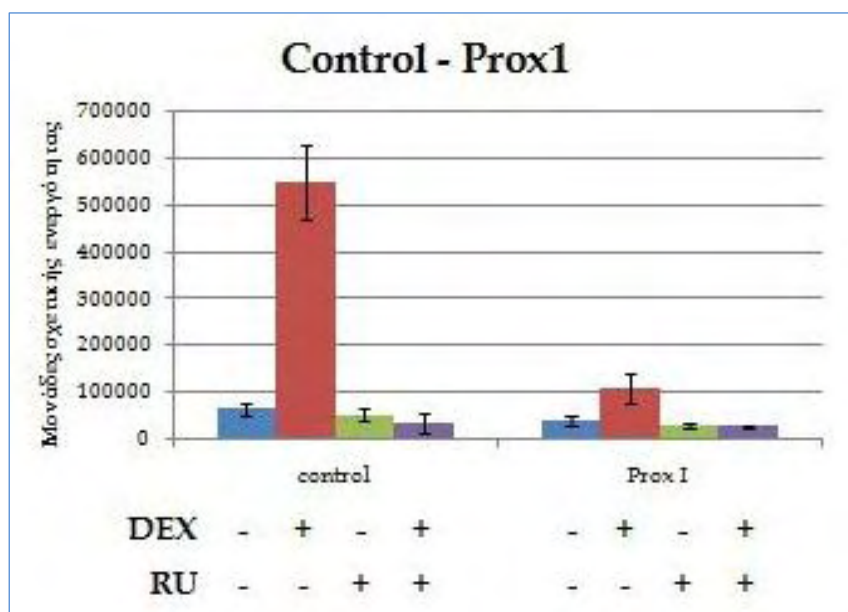
Για τη μελέτη της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στον έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης HeLa κυττάρων και προσδιορισμού της μεταγραφικής ενεργότητας του GR μέσω προσδιορισμού ενεργότητας λουσιφεράσης. Η διαμόλυνση έγινε με πλασμίδιο pCDNA₃, είτε χωρίς ένθεμα (control), είτε με το γονίδιο του Prox1 ως ένθεμα, άλλοτε ακέρατο και άλλοτε με αφαίρεση συγκεκριμένων περιοχών υποψήφιων για εμπλοκή στην κατασταλτική δράση του μορίου. Στα κύτταρα,

επίσης, προστέθηκαν και οι παράγοντες DEX και RU, οι οποίοι αποτελούν έναν ειδικό αγωνιστή και ανταγωνιστή, αντίστοιχα των γλυκοκορτικοειδών, για να μελετηθεί η σχετική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία αυτών. Η DEX (δεξαμεθαζόνη) είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και η πρόσδεσή του στον GR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ο RU (RU486) είναι ένας ανταγωνιστής του GR και η παρουσία του καταστέλλει τη δράση του υποδοχέα.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η σχετική ενεργότητα του GR σε κάθε περίπτωση (όπου «+»: παρουσία του παράγοντα, όπου «-»: απουσία του παράγοντα).

4.3.1 Έλεγχος της κατασταλτικής δράσης του *Prox1* στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Στο πρώτο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε παράλληλη διαμόλυνση κυττάρων HeLa: α) με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β-gal υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή, β) πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο ειδικού υποκινητή για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και γ) με πλασμίδιο pCDNA₃ είτε χωρίς ένθεμα (control) είτε με το γονίδιο του *Prox1* ως ένθεμα ακέραιο για να μελετηθεί η επίδραση του *Prox1* στη σχετική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία των παραγόντων DEX και RU.

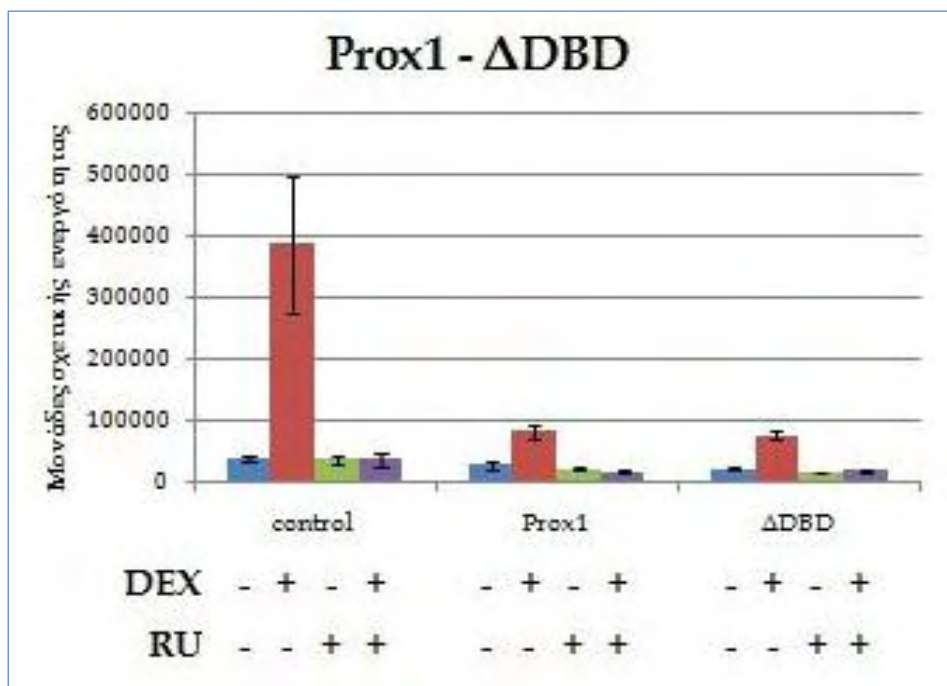


Διάγραμμα 2: Ρύθμιση κατασταλτικής δράσης από τον *Prox1*.

Παρατηρούμε ότι παρουσία DEX, του αγωνιστή του GR, η ενεργότητα του GR αυξάνει σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Παρουσία RU παρατηρούμε καταστολή της από DEX επαγόμενης ενεργότητας του GR. Επίσης, έχουμε καταστολή της ενεργότητας του GR είτε παρουσία είτε απουσία των αγωνιστών ή ανταγωνιστών. Η καταστολή είναι, τέλος, έντονη παρουσία του αγωνιστή του GR (DEX).

4.3.2 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής ΔDBD στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa: με πλασμίδια που φέρουν την πληροφορία για την έκφραση της α) β-gal και β) της λουσιφεράσης και γ) με πλασμίδιο pCDNA₃ είτε χωρίς ένθεμα (control) είτε με το γονίδιο του Prox1 ως ένθεμα από το οποίο έχει αφαιρεθεί η DBD περιοχή (DNA Binding Domain), περιοχή σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα με το DNA, για να μελετηθεί η εμπλοκή της περιοχής αυτής στην κατασταλτική δράση του Prox1 στη σχετική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία των παραγόντων DEX και RU.

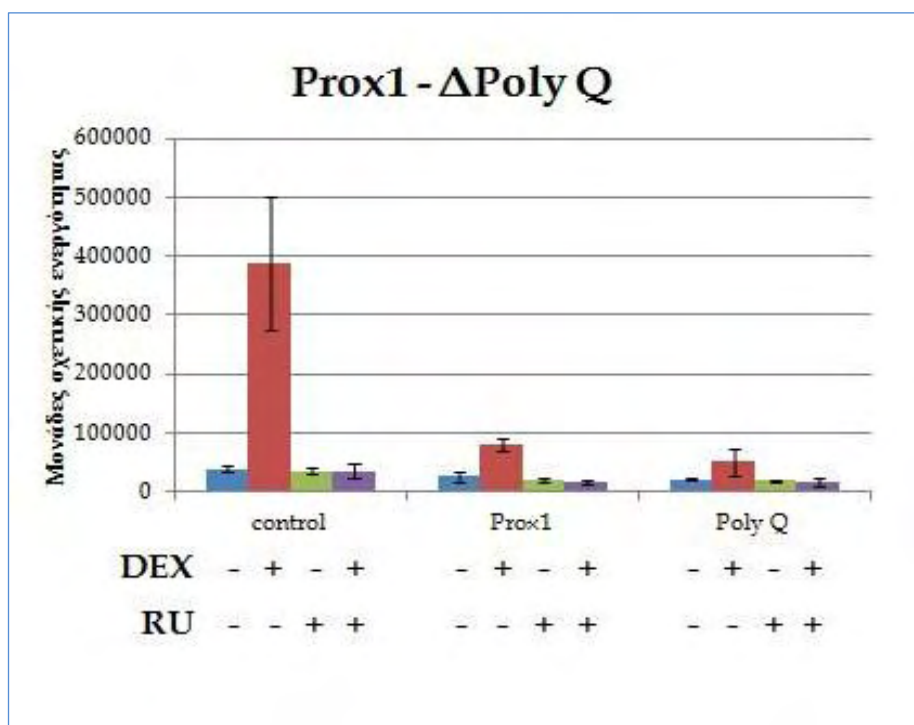


Διάγραμμα 3: Ρύθμιση κατασταλτικής δράσης από τον Prox1 χωρίς την περιοχή DBD.

Παρατηρούμε ότι απουσία της DBD του Prox1 έχουμε διατήρηση της κατασταλτικής δράσης του Prox1, παρουσία ή απουσία DEX. Άρα, συμπεραίνουμε ότι η περιοχή αυτή δεν είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της από Prox1 επαγόμενης εκδήλωσης της καταστολής.

4.3.3 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής PolyQ στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Στο τρίτο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa: με πλασμίδια που φέρουν την πληροφορία για την έκφραση α) της β-gal και β) της λουσιφεράσης και γ) με πλασμίδιο pCDNA₃ χωρίς ένθεμα (control) και με το γονίδιο του Prox1 ως ένθεμα από το οποίο έχει αφαιρεθεί περιοχή Poly Q για να μελετηθεί η εμπλοκή της περιοχής αυτής στην κατασταλτική δράση του Prox1 στη σχετική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία των παραγόντων DEX και RU. Η περιοχή Poly Q έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για την κατασταλτική δράση του Prox1 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής.

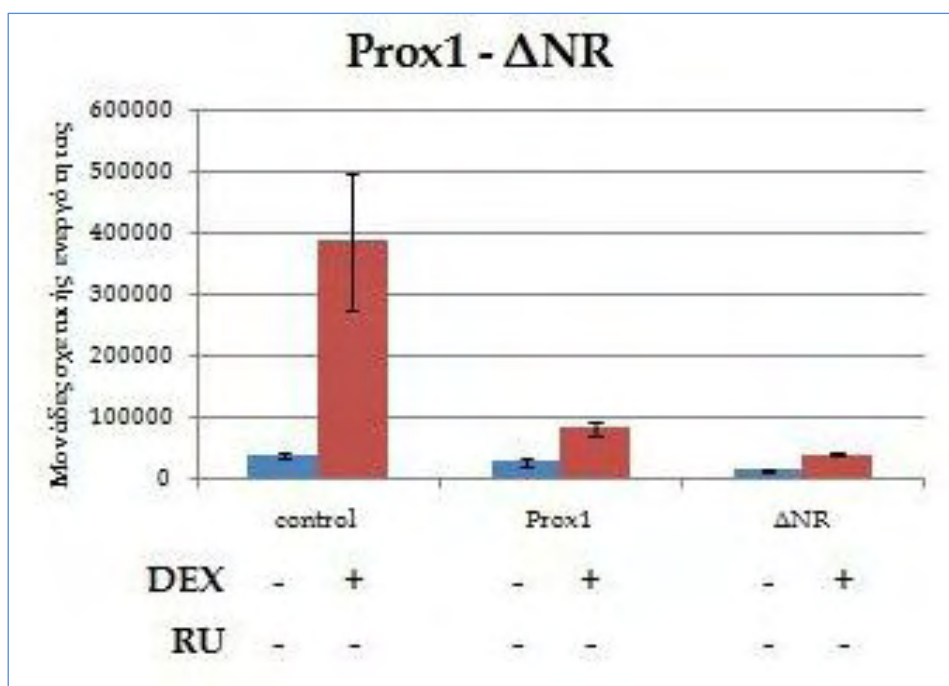


Διάγραμμα 4: Ρύθμιση κατασταλτικής δράσης από τον Prox1 χωρίς την περιοχή Poly Q.

Παρατηρούμε ότι απουσία της PolyQ του Prox1 έχουμε διατήρηση της κατασταλτικής δράσης του Prox1, παρουσία ή απουσία DEX. Άρα, συμπεραίνουμε ότι η περιοχή αυτή δεν είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της από Prox1 επαγόμενης εκδήλωσης της καταστολής.

4.3.4 Έλεγχος εμπλοκής της περιοχής ΔNR στην εκδήλωση κατασταλτικής δράσης του Prox1 στην μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Στο τέταρτο μέρος του πειράματος πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδια που φέρουν την πληροφορία για την έκφραση της β-gal και της λουσιφεράσης, με πλασμίδιο pCDNA₃ χωρίς ένθεμα (control) και με το γονίδιο του Prox1 ως ένθεμα από το οποίο έχει αφαιρεθεί περιοχή NR (Nuclear Receptor), η οποία έχει χαρτογραφηθεί ως περιοχή αλληλεπίδρασης με πυρηνικούς υποδοχείς, για να μελετηθεί η εμπλοκή της περιοχής αυτής στην κατασταλτική δράση του Prox1 στη σχετική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία των παραγόντων DEX και RU.



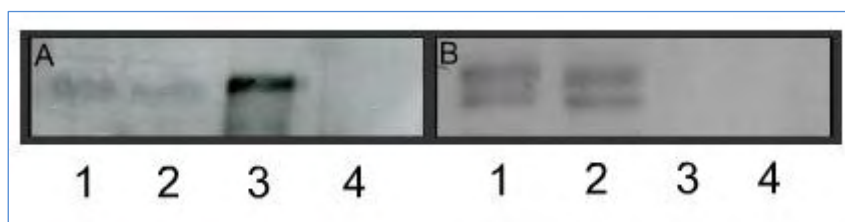
Διάγραμμα 5: Ρύθμιση κατασταλτικής δράσης από τον Prox1 χωρίς την περιοχή NR.

Παρατηρούμε ότι απουσία της NR του Prox1 έχουμε διατήρηση της κατασταλτικής δράσης του Prox1, παρουσία ή απουσία DEX. Άρα, συμπεραίνουμε

ότι η περιοχή αυτή δεν είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της από Prox1 επαγόμενης εκδήλωσης της καταστολής.

4.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1

Για να διερευνηθεί κατά πόσο η κατασταλτική δράση του Prox1 στον GR οφείλεται σε αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση σε εκχύλισμα HepG2 κυττάρων (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Μελέτη παράλληλης ανοσοκατακρήμνισης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 με χρήση αντισώματος ανοσοκατακρήμνισης έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: (A) Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR-M20). (B) Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι μεταγραφικού παράγοντα Prox1. (1) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 πριν την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (2) Εκχύλισμα κυττάρων HepG2 μετά την ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (2F8). (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων HepG2 με αντισώματα μη ανοσοποιημένου ζώου.

Παρατηρούμε ότι η ανοσοκατακρήμνιση με το αντίσωμα έναντι του GR έγινε επιτυχώς δεδομένου ότι η ποσότητα GR στο εκχύλισμα μετά της ανοσοκατακρήμνισης (2) είναι σημαντικά μικρότερη από αυτήν αρχικά (1), ενώ η ποσότητα του GR που ανοσοκατακρημνίστηκε φαίνεται στο (3) σημαντικά μεγαλύτερη από το δείγμα μάρτυρα (4), άρα επιτεύχθηκε ο στόχος της ανοσοκατακρήμνισης του GR, στο εκχύλισμα κυττάρων HepG2 με χρήση του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε (2F8).

Ακόμα, παρατηρούμε ότι ο Prox1 ανιχνεύεται τόσο στο εκχύλισμα πριν όσο και στο εκχύλισμα μετά την ανοσοκατακρήμνιση, χωρίς σημαντικές διαφορές. Επίσης, δεν ανιχνεύεται στο δείγμα (3) ως προϊόν συνανοσοκατακρήμνισης με τον GR. Άρα, υπό τις συνθήκες που εκτελέστηκε το πείραμα δεν είχαμε αλληλεπίδραση GR-Prox1.

5. Συζήτηση

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ελέγχει πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως ενεργειακός μεταβολισμός, κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ανάπτυξη, διαφοροποίηση, ανοσολογικές αποκρίσεις και απόπτωση. Η εκδήλωση της δράσης του υποδοχέα επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της δράσης του ως μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος μετά τη σύνδεσή του με την ορμόνη μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ελέγχει θετικά ή αρνητικά την έκφραση γονιδίων μετά την πρόσδεσή του σε ειδικές ορμονοεξαρτώμενες περιοχές του DNA (HRE). Η εκδήλωση της δράσης του υποδοχέα στον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω αλληλεπίδρασής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, των οποίων επίσης η δραστηριότητα μπορεί μεταβάλλεται μετά την πρόσδεσή τους με τον υποδοχέα. Η πρόσδεση του υποδοχέα στα HRE μπορεί επίσης να επηρεάσει την πρόσδεση άλλων μεταγραφικών παραγόντων σε αλληλουχίες DNA, σε γειτονικές περιοχές DNA, που αποτελούν περιοχές στόχους για τους μεταγραφικούς παράγοντες επηρεάζοντας έτσι και την δραστηριότητά τους (Jenkins et al., 2001; Marcel et al., 2003; Psarra et al., 2007). Ο έλεγχος της δραστηριότητας του υποδοχέα ως μεταγραφικού παράγοντα ρυθμίζεται μέσω διάφορων μηχανισμών όπως πρόσδεσή του με ειδικούς αγωνιστές-ανταγωνιστές, διμερισμό του μορίου, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, φωσφορυλιώσεις και αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια (Oakley et al., 2011).

Την τελευταία δεκαετία ιδιαίτερη σημασία δίνεται αφενός στον χαρακτηρισμό των μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα με τον υποδοχέα και αφετέρου στον χαρακτηρισμό των μοριακών συμπλόκων που δημιουργούνται μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων. Η σημασία της δημιουργίας αυτών των μοριακών συμπλόκων έγκειται στο ότι αυτά μπορεί να αποτελέσουν κομβικά σημεία ελέγχου και επικοινωνίας διάφορων βιολογικών διεργασιών. Όμοια με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, πρόσφατα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία δείχνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 ελέγχει βασικές μεταβολικές διεργασίες όπως κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ενεργειακός μεταβολισμός, και μάλιστα μέσω κοινών με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών βιολογικών οδών (Alexis Charest-Marcotte et al., 2010). Γονίδιο στόχος τόσο για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών όσο και για τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1 αποτελεί το γονίδιο της καρβοξυκινάσης του φωσφο-ένολο-πυροσταφυλικού PEPK (Kwang-Hoon Song et al., 2006).

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σαν στόχο τη μελέτη της πιθανής επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη δράση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και τη διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο αυτή επιτυγχάνεται. Για την επίτευξη αυτού του στόχου πραγματοποιήθηκαν μία σειρά από πειράματα όπως ανοσοαποτόπωση πρωτεϊνών Western, διαμόλυνση κυττάρων, μέτρηση ενεργοποίησης έκφρασης γονιδίων μέσω μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης, της οποίας η έκφραση βρίσκεται υπό τον έλεγχο ορμονοανταποκρινόμενων στοιχείων και ανοσοκατακρήμνιση.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτόπωση Western για τον έλεγχο της ύπαρξης του GR και του Prox1 σε κύτταρα HepG2 και HeLa. Η παρουσία του GR διαπιστώθηκε και στους δύο τύπους κυττάρων, ενώ του Prox1 μόνο στα HepG2 κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας που δείχνουν σημαντική δράση του Prox1 σε κύτταρα ήπατος (Kwang-Hoon Song et al., 2006). Τα κύτταρα HeLa, στα οποία δεν εντοπίστηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες Prox1, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα διαμόλυνσης για την ελεγχόμενη επαγωγή έκφρασης του Prox1. Έτσι, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με πλασμίδιο pCDNA₃ χωρίς ένθεμα (control) και με το γονίδιο του Prox1 ως ένθεμα, άλλοτε ακέραιο και άλλοτε με αφαίρεση συγκεκριμένων περιοχών κρίσιμων για την εκδήλωση της δραστηριότητας του μορίου. Τέτοιες περιοχές αποτελούν, η περιοχή σύνδεσης με DNA, η περιοχή αλληλεπίδρασης με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς και η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση καταστολής της μεταγραφής. Κατά τη διαδικασία της διαμόλυνσης χρησιμοποιήθηκαν επίσης, πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο του υποκινητή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ώστε να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση της παρουσίας του Prox1 στον έλεγχο της δραστηριότητας του GR. Η μελέτη αυτή έγινε παρουσία ή απουσία ειδικών αγωνιστών του GR, όπως δεξαμεθαζόνης (DEX) και μifeπριστόνης (RU486), αντίστοιχα.

Αποτέλεσμα αυτής της σειράς πειραμάτων είναι ότι πράγματι ο Prox1 δείχνει να έχει κατασταλτική δράση στην έκφραση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, γεγονός που συμφωνεί με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που δείχνουν ότι ο Prox1 ασκεί κατασταλτική δράση στην δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Alexis Charest-Marcotte et al., 2010). Καμία από τις περιοχές που μελετήθηκαν δε φάνηκε να είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση της κατασταλτικής δράσης του Prox1 δεδομένου ότι η απουσία τους δεν έφερε σημαντική μεταβολή στην

εκδήλωση της κατασταλτικής του δράσης. Όπως αναμενόταν, η παρουσία DEX οδήγησε σε ενεργοποίηση του GR, ενώ αντίθετα η παρουσία RU486 οδήγησε σε καταστολή της από DEX επαγόμενης ενεργοποίησης του GR γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας.

Τέλος, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των μορίων GR και Prox1 με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης σε HepG2 κύτταρα, που όπως διαπιστώθηκε από τα αρχικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης εκφράζουν ενδογενώς και τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες. Το προϊόν της ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι του GR δεν έδωσε σήμα στην ανοσοαποτύπωση Western με αντίσωμα έναντι του Prox1, υποδηλώνοντας μη δυνατότητα αλληλεπίδρασης των δύο μορίων υπό τις συνθήκες του πειράματος. Βέβαια δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο έμμεσης αλληλεπίδρασης των μορίων και σχηματισμού μοριακών συμπλόκων όπου η ευαισθησία της μεθόδου να μην επιτρέπει την ανίχνευση μικρών συγκεντρώσεων μορίου Prox1 στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης. Επιπλέον, η δράση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση μπορεί είτε να δεσμεύει τις περιοχές αλληλεπίδρασης του GR με τον Prox1, είτε να προκαλεί τέτοια αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου ώστε να μην επιτρέπει αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Η χρήση και άλλων αντισωμάτων καθώς επίσης και η τροποποίηση των συστατικών του διαλύματος εκχύλισης των κυττάρων και επίτευξης της ανοσοκατακρήμνισης μπορεί να δώσει ενδεχομένως διαφορετικά αποτελέσματα στο μέλλον.

Ο παρατηρούμενος έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1 αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα δεδομένου ότι για πρώτη φορά παρουσιάζονται δεδομένα που υποδηλώνουν ρυθμιστική δράση του Prox1 στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μόριο με ιδιαίτερα σημαντική βιολογική δράση. Περαιτέρω μελέτες διερεύνησης του μηχανισμού και χαρακτηρισμού των κοινών μορίων-στόχων θα μπορούσαν να διαλευκάνουν έναν άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποτέλεσαν την αρχή για τη μελέτη της κατασταλτικής δράσης που έχει ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 στον GR και τα αποτελέσματα που έδωσαν είναι χρήσιμα για περαιτέρω διερεύνηση αυτής της αλληλεπίδρασης. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξετάστηκε η εμπλοκή των περιοχών DBD, Poly Q και NR χωρίς όμως να αποδειχθεί απαραίτητη η παρουσία αυτών για την καταστολή του GR. Ένα επόμενο βήμα για τη διερεύνηση

του μηχανισμού εκδήλωσης της κατασταλτικής δράσης του Prox1 θα μπορούσε να είναι η χαρτογράφηση όλων των περιοχών που είναι πιθανό να εμπλέκονται στην εκδήλωση της κατασταλτικής δράσης του Prox1.

Χρήσιμη, ακόμα, θα ήταν η εντόπιση των πιθανών γονιδίων στόχων των GR και Prox1 για την κατανόηση της λειτουργίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο μορίων, καθώς και της σημασίας της καταστολής αυτής. Επίσης, κάτι τέτοιο θα διασαφήνιζε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη ρύθμιση των γονιδίων στόχων του GR.

6. Βιβλιογραφία

- Ballard, P.L. (1979) in “Glucocorticoid Hormone Action” (Eds Baxter J.D. and Rousseau G.G., Springer Verlag, **25**).
- 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**, 2435-2441.
- Baxter, S.A., Cheung, D.Y., Bocangel, P., Kim, H.K., Herbert, K., Douville, J.M., Jangamreddy, J.R., Zhang, S., Eisenstat, D.D., Wigle, J.T. (2011). Regulation of the lymphatic endothelial cell cycle by the PROX1 homeodomain protein. *BBA* **1813**, 201-212.
- Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**, 335-344
- Bi, X., Kajava, A.V., Jones, T., Demidenko, Z.N., Mortin, M.A. (2003). The carboxy terminus of Prospero regulates its subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1014-1024.
- Cadepond, F., Gasc, J.M., Delahaye, F., Jimbard, N., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Evans, R.M., Baulieu, E.E. (1992). Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp. Cell Res.* **201**, 99-108.
- Carlberg, C. (2004). Principles of gene regulation by bioactive lipids through members of nuclear receptor superfamily. *Mechanisms of signal Transduction and Inducible gene Expression*, 77-95.
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, O., Gustafsson, J.A. (1982). Immunochemical analysis of glucocorticoid receptor: identification of a third domain separate from the steroid-binding and DNA-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4260-4264.
- Carlstedt-Duke, J., Stormstedt, P.E., Wrangé, O., Bergman, T., Gustafsson, J.A., Jornvall, H. (1987). Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4437-4440
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940-954.
- Charest-Marcotte, A., Dufour, C.R., Wilson, B.J. (2010). The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERRA/PGC-1a bioenergetic functions. *Genes and Development* **24**, 537-542.

- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* **23**, 255–275.
- Cook, T., Pichaud, F., Sonnevile, R., Papatsenko, D., Desplan, C. (2003). Distinction between color photoreceptor cell fates is controlled by Prospero in *Drosophila*. *Dev. Cell* **4**, 853–864.
- Danielsen, M., Northrop, J.P., Jonklaas, J., Ringold, G.M. (1987). Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement. *Mol. Endocrinol.* **1**, 816-822.
- Demidenko, Z., Badenhorst, P., Jones, T., Bi, X., Mortin, M.A. (2001). Regulated nuclear export of the homeodomain transcription factor Prospero. *Development* **128**, 1359–1367.
- Diamond, M., Miner, J.N., Yoshinaga, S. K., Yamamoto, K.R. (1990). Transcription factor interactions selectors for positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249**, 1266-1272.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen B.S., Manji, H.K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A* **106**, 3543-3548.
- Duma, D., Jewell, C.M. and Cidlowski, J.A. (2006). Multiple glucocorticoid receptor isorforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **102**, 11-21.
- Edvardsson, K., Ström A., Jonsson, P., Gustafsson, J.Å., Williams, C. (2011). Estrogen receptor β induces antiinflammatory and antitumorigenic networks in colon cancer cells. *Molecular Endocrinology* **6**, 969-679.
- Eisen, L. P., Reichman, M. E., Thompson, E. B., Gametchu, B., Harrison, R. W., Eisen, H.J. (1985). Monoclonal antibody to the rat glucocorticoid receptor. *L. Biol. Chem.* **260**, 11805-11810.
- Elkouris, M., Balaskas, N., Poulou, M., Politis, P.K., Panayiotou, E., Malas, S., Thomaidou, D., Reboutsika, E. (2011). Sox1 maintains the undifferentiated state of cortical neural progenitor cells via the suppression of Prox1-mediated cell cycle exit and neurogenesis. *Stem cells* **29**, 89-98.

- Encio, I.J., Detera-Wadleigh, S.D. (1991). The genomic structure of human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 7182-7188.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895.
- Evans, R.M. (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology, *Mol. Endocrinol.* **19**, 1429-1438.
- Exton, J. H. (1979). Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr. Endocrinol.* **12**, 535-546.
- Gavriloja-Jordan, L.P., Price T.M. (2007). Actions of steroids in mitochondria. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 154-164.
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., Evans, R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**, 624-629.
- Glass, C.K and Rosenfeld, M.G (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121-141
- Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R., Yamamoto, K.R. (1987). Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature* **325**, 365-368.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornet, J.M., Argos, P., Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **325**, 75-78.
- Gronemeyer, H. and Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile* **2**, 1173-1308.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Migrom, E. (1994). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 7179-7183.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., Kaptein, R. (1990). Solution structure of glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **249**, 157-160.
- Hassan, B., Li, L., Bremer, K.A., Chang, W., Pinsonneault J., Vaessin, H. (1997). Prospero is a panneural transcription factor that modulates homeodomain protein activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 10991-10996.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., Evans, R.M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* **49**, 39-46.

- Hu, X., Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the rescruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**, 93-96.
- Jenkins, B.D., Pullen, C.B., Darimont, B.D. (2001). Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 122-126.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C.B., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and inflammation: down-regulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**, 1189-1204.
- Kaltezioti, V., Kouroupi, G., Oikonomaki, M., Mantouvalou, E., Stergiopoulos, A., Charonis, A., Rohrer, H., Matsas, R., Politis, P.K. (2010). Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis. *Plos Biol.* **12**, PubMed PMID: 20973031.
- 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.
- Koeing, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., Moore, D.D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erb-A protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* **337**, 659-661.
- Kwang-Hoon, S., Tiangang, L., Chiang, J.Y.L. (2006). A Prospero-related Homeodomain Protein Is a Novel Co-regulator of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α that regulates the cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene.
- Laudet, V. and Gronemeyer, H. (2002). *The Nuclear Receptor, Facts Book.* Academic Press.
- Lu, N.Z, Cidlowski, J.A. (2005) Translational regulatory mechanisms generated N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell.* **18**, 331-342.
- Marcel Schaaf J.M., Cidlowski, J.A. (2003). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. of Steroid Bioch. & Mol. Biol.* **83**, 37-48.
- McEvwan, I.J., Wright, A.P.H., Dahlman-Wright, K., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1993). Direct interaction of the τ_1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 399-407.

- Metzger, D., Berry, M., Ali, S., Chambon, P. (1995). Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol.* **9**, 579-591.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609-1614.
- Montano, M. M., Lim, R. W. (1997). Glucocorticoid effects on the skeletal muscle differentiation program: analysis of clonal proliferation, morphological differentiation and the expression of muscle-specific and regulatory genes. *Endocrine Research.* **23**, 37-57.
- Moras, D., Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* **10**, 384-391.
- Mordacq, J.D., Linzer, D.I.H. (1989). Colocalization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* **3**, 760-769.
- Moutsatsou, P., Psarra, A.M, Tsiapara, A., Paraskevakou, H., Davaris, P., Sekeris, C.E., (2001). Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Biochim. Biophys.* **386**, 69-78.
- Muller, M., Renkawitz, R. (1991). The glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys.* **1088**, 171-182.
- Nagy, L. Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., Schwabe, J.W.R. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.*, **13**, 3209-3216.
- Nishijima, I., Ohtoshi, A. (2006). Characterization of a novel prospero-related homeobox gene, *Prox2*, *Mol. Genet. Genomics* **275**, 471-478.
- 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. *J. Biol. Chem.* **286**, 3177-3184.
- Ogata, Y., Yamauchi, M., Kim, R. H., Li, J.J., Freedman, L.P., Sodek, J. (1995). Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression identification of a glucocorticoid response element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur. J. Biochem.* **230**, 183-192.
- Oliver G., Sosa-Pineda, Geisendorf, S., Spana, E.P., Doe, C.Q., Gruss, P. (1993). *Prox1*, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development, *Mech. Dev.* **44**, 3-16.

- Papamichail, M., Tsokos, G., Tsawdaroglou N., Sekeris, C.E. (1980). Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptors in different cell types and their translocation from the cytoplasm to the cell nucleus in the presence of dexamethasone. *Exp. Cell Res.* **125**, PubMed PMID: 6986277.
- Picard, D., Yamamoto, K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6**, 3333-3340.
- Pina, B., Hache, R. J. G., Arnemann, J. Chalepakis, G. Slater, E., Beato, M. (1990). Hormonal induction of transfected genes depends on DNA topology. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 625-633.
- Psarra, A.M.G., Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani G., Sekeris, C.E., Tsacopoulos M. (2003). Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Müller) cells in the salamander retina. *Glia* **41**, 38-49.
- Psarra, A.M.G., Hermann, S., Panayotou, G., Spyrou G. (2009). Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells. *Biochem. J.* **422**, 521-531.
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2007). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochim. Biophys. Acta* **5**, 431-436.
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2008). Steroid and thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. *IUMB Life* **60**, 210-223.
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys.* **10**, 1814-1821.
- Psarra, A.M.G., Solakidi, S., Sekeris, C.E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1088**, 12-22.
- 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. *Mol. Cell Endocrinol* **246**, 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. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 2544-2558.
- Qin, J., Gao, D.M, Jiang, Q.F., Zhou, Q., Kong, Y.Y., Wang, Y., Xie, Y.H. (2004). Prospero-related homeobox (Prox1) is a corepressor of human liver receptor homolog-1 and suppresses the transcription of the cholesterol 7-alpha-hydroxylase gene. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2424-2439.
 - Robyr, D., Wolffe, A.P., and Wahli, W. (2000). Nuclear Hormone Receptor Coregulators in Action: Diversity for Shared Tasks. *Mol Endocrinol* **14**, 329-347.
 - Rusconi, S., Yamamoto, K.R. (1987). Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **6**, 1309-1315.
 - Ryter, J.M., Doe, C.Q., Matthews, B.W. (2002). Structure of the DNA binding region of prospero reveals a novel homeo-prospero domain. *Structure (Camb.)* **10**, 1541-1549.
 - Saatcioglu, F., Claret, F.X., Karin, M. (1994). Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Cancer Biol.* **5**, 347-359.
 - Scheller, K., Seibel, P., Sekeris, C.E., (2003). Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* **222**, 1-61.
 - Scheller, K., Sekeris, C.E., Krohne, G., Hock, R., Hansen, I.A., Scheer, U. (2000). Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 299-307.
 - Schena, M., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R. (1989). Mutation in the glucocorticoid receptor zing finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Dev.* **3**, 1590-1601.
 - Scherrer, L.C., Picard, D., Massa, E., Harmon, J.M., Simons, S.S., Jr., Yamamoto, K.R., Pratt, W.B., (1993). Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90. *Biochemistry* **32**, 5381-5386.
 - Schoneveld, O.J., Gaemers, I.C., Lamers, W.H. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1680**, 114-128.
 - Schule, R., Muller, M., Kaltschmidt, C., Renkawitz, R. (1988). Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* **242**, 1418-1420.
 - Severne, Y., Wieland, S., Schaffner, W., Rusconi, S. (1988). Metal binding "finger" structures in the glucocorticoid receptor defined by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* **7**, 2503-2508.

- Shao, D. and Lazar, M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.* **103**, 1617-1618.
- Shin, J.W., Min, M., Larrieu-Lahargue, F., Canron, X., Kunstfeld R., Nguyen, L., Henderson, J.E., Bikfalvi, A., Detmar, M., Hong, Y.K. (2006). Prox1 promotes lineage-specific expression of FGF receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for fgf signaling in lymphangiogenesis. *Mol. Biol. Cell* **17**, 576-584.
- Sionov, R.V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *Epub* **203**, 189-201.
- Sionov, R.V., Kfir, S., Zafir, E., Cohen, O., Zilberman, Y., Yefenof, E. (2006). Glucocorticoid-induced apoptosis: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* **10**, 1017-1026.
- Song, K.H., Li, T., Chiang, J.Y. (2006). A Prospero-related homeodomain protein is a novel co-regulator of hepatocyte nuclear factor 4alpha that regulates the cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* **281**, 10081-10088.
- Strahle, U., Schmid, W., Schutz, G. (1988). Synergistic action of glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* **7**, 3389-3395.
- Tanja la Cour, Kiemer, L., Molgaard, A., Ramneek, G., Skriver, K., Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering, Design & Selection* **17**, 527-536.
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985). Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature* **318**, 670-672.
- Wrange, O., Okret, S., Radojic, M., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1984). Characterization of the purified glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Bio. Chem.* **259**, 4534-4541.
- Yamamoto, K.R., Gehring, U., Stampfer, M.R., Sibley, C. (1976). Genetic approaches to steroid hormone reaction. *Recent Prog. Res.* **32**, 3-32.
- Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., Chambon, P. (2002). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptor. *EMBO J.* **11**, 3681-3694.