



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 ως
ρυθμιστής της από τον υποδοχέα των
γλυκοκορτικοειδών επαγόμενης γονιδιακής
έκφρασης σε νευρικά κύτταρα

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΥΣ Χ. ΜΑΡΙΑ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2013



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



Transcription factor Prox1 as a regulator of the glucocorticoid receptor transcriptional activity in neuronal cells

DIPLOMA PROJECT

CHARALAMBOUS CH. MARIA

Supervisor: Psarra G. Anna-Maria

Larissa 2013

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εγκρίθηκε ομόφωνα από την Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνθεσης (ΓΣΕΣ) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.) στην υπ' αριθμό συνεδρίασή του, 1/2/13, με αριθμό πρωτοκόλλου #87, σύμφωνα με τον Εσωτερικό Κανονισμό Λειτουργίας του Προγράμματος Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ.

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του ΤΒΒ του Π.Θ. (Λάρισα, 2013) στα πλαίσια της μερικής εκπλήρωσης των απαιτήσεων για την απόκτηση προπτυχιακού τίτλου σπουδών, όπως προβλέπεται από το Πρόγραμμα Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ. Έγινε υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας δρ Α.-Μ. Γ. Ψαρρά, κατά το θερινό εξάμηνο του έτους 2013 και αποτελεί ένα μέρος της έρευνας που πραγματοποιείται στο χώρο του εργαστηρίου του Τμήματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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



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



Πολίτης Κ. Παναγιώτης, Ερευνητής Βαθμίδος Δ' στο ΙΙΒΕΑΑ



Ευχαριστίες:

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας νιώθω την υποχρέωση να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν στην ομαλή διεξαγωγή της.

Καταρχάς ευχαριστώ θερμότατα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, δρ Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, το οποίο υπήρξε η αφετηρία αρκετών ενδιαφέροντων αναζητήσεων και ανακαλύψεων. Την ευχαριστώ για την αμέριστη προσοχή, τη συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές, τη συμπαράσταση και τη βοήθειά της τόσο κατά την πορεία εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας όσο και καθ' όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών. Σας ευχαριστώ πολύ για την εμπιστοσύνη και τη γενικότερη στάση σας. Ήταν τιμή μου. Θα προσπαθήσω ώστε να... «κρατάω γερά το τιμόνι».

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή δρ Λεωνίδα Δημήτριο για την αποδοχή του να αποτελέσει μέρος της εν λόγω ερευνητικής προσέγγισης και για τη διάθεση του χώρου του εργαστηρίου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω και στον δρ Παναγιώτη Πολίτη που συνεισέφερε εμπράκτως για την ομαλή υλοποίηση των πειραματικών διεργασιών.

Σημαντικό μέρος των ευχαριστιών θα ήθελα να εκφράσω στον υποψήφιο διδάκτορα TBB, Γοργογιέτα Βύρωνα, που συνέβαλε στο μέγιστο για την εκπόνηση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας. Τον ευχαριστώ για την ανιδιοτελή βοήθειά του, τις συμβουλές, αλλά και για τις συζητήσεις μας, κατά το διάστημα της μεταξύ μας συνεργασίας.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τον απόφοιτο του Τμήματος, Κωδούνη Μιχάλη, για τη φιλία και τη στήριξή του, τόσο εντός όσο και εκτός του TBB.

Ευχαριστώ ολόψυχα τους υποψήφιους διδάκτορες TBB: Κατσαρού Δήμητρα, Καντσάδη Αναστασία, Κροκιά Αφροδίτη, Κυρίτση Αθανάσιο, Μαραγκοζίδη Παναγιώτη, Ρουσίδου Κωνσταντίνα, Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα καθώς επίσης και την απόφοιτο ΠΜΣ Βούρκου Εργίνα και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σκουτέλικ Ντιάνα, μια και όλοι τους συνέβαλαν λιγότερο ή περισσότερο, ο καθένας με τον τρόπο του, στο να είμαι το άτομο που είμαι σήμερα. Ευχαριστώ από καρδιάς όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του TBB για την αρμονική συνεργασία στο χώρο του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τους φίλους και συμφοιτητές μου: Κυριάκη Ευθύμιο, Μπέτα Ραφαηλία, Γραμματικόπουλο Αλέξανδρο και Τσιμιπίδη Μιχάλη που μου χάρισαν την παρέα τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μας. Τον Κονιδάρη Γεράσιμο, για τα απογευματινά σουτάκια. Τον Χατζηελευθεριάδη Κωνσταντίνο, για την εξαιρετική συνεργασία στα εργαστήρια των φοιτητών. Την Κεραμιδιώτη Αθηνά, για τις βόλτες στον Όλυμπο. Ευχαριστώ τον Τσιλαφάκη Κωνσταντίνο, για τις συζητήσεις και τις αμέτρητες (!) ώρες γέλιου. Ευγνωμονώ και ευχαριστώ την Πετρίδου Ανατολή, για το πολύτιμο της φιλίας της, τις συμβουλές, τη στήριξη και τη συμπαράστασή της. Ευχαριστώ επίσης την Κομνηνού Αγγελική, για τη φιλία της και τις Δούκα Έβελν και Τζόρτζιου Μαρία για το αληθινό χαμόγελό τους.

Δεν μπορώ παρά να εκφράσω την εκτίμησή μου στους φίλους στη Λάρισα για τις ωραίες στιγμές και εμπειρίες που σίγουρα θα μου μείνουν αξέχαστες: τον κο Γιάννη, την κα Σταυρούλα, το Γιώργο, τον Βασίλη, τη Δάφνη, το Γιώργο, τη Βούλα και τον Άλκη. Ελπίζω να καταφέρω να ξεπληρώσω κάποτε τα όσα τόσο απλόχερα μου προσφέρατε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του TBB, τεχνικό και διοικητικό, για το «καλημέρα» και την καλή τους κουβέντα.

Ευχαριστώ από καρδιάς όλους τους Δασκάλους μου για τις γνώσεις που μου προσέφεραν, τα παραδείγματα ζωής, καθώς επίσης και για την παρακίνηση για αναζήτηση και έρευνα, κυρίως μέσα από το θαυμασμό για το ανήσυχο πνεύμα τους.

Κλείνω απευθύνοντας ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, για την ηθική και υλική τους συμπαράσταση, αλλά και για την κατανόηση που δείχνουν στις παραξενιές και τις τρέλλες μου. Τους οφείλω όλα όσα έχω και όλα όσα είμαι...

Παρέλειπα αρκετούς, αλλά πραγματικά σας ευχαριστώ όλους. Συντελέσατε -και σίγουρα το ξέρετε- τα μέγιστα ώστε να επιτευχθεί ό,τι με οδήγησε μέχρι αυτό το σημείο.

Αποποίηση Ευθύνης/Disclaimer

Η έγκριση της παρούσας διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων της συγγραφέως, (Ν. 5343/1932, άρθρο 202 § 2).

Πνευματική Ιδιοκτησία/Copyright

© 2013. Χαραλάμπους Χ. Μαρία.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος/All rights reserved.

Τα περιεχόμενα της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελούν πνευματική ιδιοκτησία της συγγραφέως και ως εκ τούτου διέπονται από τις διεθνείς διατάξεις περί πνευματικής ιδιοκτησίας, με εξαίρεση τα ρητώς αναγνωρισμένα δικαιώματα τρίτων.

Απαγορεύεται η αναδημοσίευση, η αντιγραφή, η αποθήκευση σε αρχείο πληροφοριών, η διανομή, η αναπαραγωγή, η μετάφραση, η τροποποίηση ή η μετάδοση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είτε εξ ολοκλήρου είτε αποσπασματικά, για εμπορικό σκοπό, υπό οποιαδήποτε μορφή και με οποιοδήποτε μέσο επικοινωνίας, χωρίς την προηγούμενη έγγραφη άδεια της συγγραφέως ή/και χωρίς τη συναίνεση της επιβλέπουσας διδάσκουσας (δρ Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία).

Επιτρέπεται η αναπαραγωγή, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσεως, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

*Αφιερώνεται
σε όλους τους φίλους
που γνώρισα κατά την παραμονή μου στην πόλη της Λάρισας*

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

aa	aminoacids αμινοξέα
amp	ampicillin αμπικιλίνη
AF1	activation function 1 λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 1
AF2	activation function 2 λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 2
APS	ammonium persulfate υπερθειικό αμμώνιο
AR	androgen receptor υποδοχέας ανδρογόνων
BSA	bovine serum albumin αλβουμίνη βόειου ορού
CDK	cell cycle-dependent kinase κυκλινοεξαρτώμενη κινάση
CK	carboxykinase καρβοξυκινάση
cis	charcoal inactivated serum ορός απενεργοποιημένος με ενεργό άνθρακα
CTE	C-terminal extension καρβοξυτελική επέκταση
DCC	dextran-coated charcoal ενεργός άνθρακας με διαλύτη τη δεξτράνη
DEX	dexamethasone δεξαμεθαζόνη
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium θρεπτικό μέσο DME
DOX	doxycyclin δοξκυκλίνη
DR	direct repeat ευθεία επανάληψη
DTT	dithiothreitol 1,4-διθειοθρεϊτόλη
DMSO	dimethylsulfoxide διμεθυλοσουλφοξείδιο
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ER	estrogen receptor υποδοχέας οιστρογόνων
ERR	estrogen-related receptor οιστρογονο-σχετικός υποδοχέας
EtOH	ethanol αιθανόλη
FBS	fetal bovine serum εμβρυϊκός ορός βοός
FoxO1	fork-head box protein O1 πρωτεΐνη O1 του διχαλωτού κουτιού
GCs	glucocorticoids γλυκοκορτικοειδή
GR	glucocorticoid receptor υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
GSK-3	glycogen synthase kinase-3 3-κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου
HDAC	histone deacetylase activity ενεργότητα αποακετυλάσης ιστονών
HNF4α	hepatic nuclear factor 4α πυρηνικός παράγοντας ηπατοκυττάρων 4 ^α
HNR	hormonal nuclear receptor πυρηνικός υποδοχέας ορμονών
G6Pase	glucose-6 phosphatase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης
GMC	ganglion mother cell μητρικό γαγγλιακό κύτταρο

GPCR	G-protein coupled receptors υποδοχείς συνδεδεμένοι με G πρωτεΐνες
GRE	glucocorticoid response element στοιχείο αποκρινόμενο στα γλυκοκορτικοειδή
GRU	glucocorticoid response unit μονάδα αποκρινόμενη στα γλυκοκορτικοειδή
HRE	hormone response element στοιχείο αποκρινόμενο σε ορμόνη
HPA	hypothalamic-anterior pituitary-adrenal axis άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης- -επινεφριδίων
HPDP	homeo-Prospero domain ομοιοεπικράτεια Prospero
HRP	horseradish peroxidase υπεροξειδάση του χρένου
IgG	immunoglobulin G ανοσοσφαιρίνη G
IP	immunoprecipitation ανοσοκατακρήμνιση
kan	kanamycin καναμυκίνη
kDa	kilo Dalton
L-B	L-Broth medium θρεπτικό υλικό L-Broth
L.B.	Lysis Buffer διάλυμα λύσης
L.G.	low glucose χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (συγκέντρωση 1 mg/mL)
L-Glut	L-glutamine L-γλουταμίνη
LRH1	liver receptor homolog-1 ομόλογο-1 του ηπατικού υποδοχέα
LTR	long terminal repeat μακρύ επαναλαμβανόμενο άκρο
MAPK	mitogen-activated protein kinase πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
MBA	N,N'-methylenebisacrylamide N, N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου
MMTV	mouse mammary tumor virus ιός όγκου μαστού ποντικού
MR	mineralocorticoid receptor υποδοχέας αλατοκορτικοειδών
NES	nuclear export signal σήμα εξόδου από τον πυρήνα
NLS	nuclear localization signal σήμα πυρηνικής μετατόπισης
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol
NPT	neomycin phosphotransferase φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης
NR	nuclear receptor πυρηνικός υποδοχέας
nt(s)	nucleotide(s) νουκλεοτίδιο(/α)
NTD	N-terminal domain αμινοτελικό άκρο
O/N	overnight για όλη τη νύχτα
ONPG	2-nitrophenyl b-D-galactopyranoside 2-νιτροφαινυλο β-D-γαλακτοπυρανοσίδιο
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
PBS	phosphate-buffered saline ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PBS-T	phosphate-buffered saline w/ Tween-20 ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween-20
PC	pyruvate carboxylase καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού
PDB	protein database πρωτεϊνική βάση δεδομένων
PEP	phosphoenolpyruvate φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase καρβοξυκινάση του PEP
PGC1-α	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α συνενεργοποιητής 1 α του ενεργοποιημένου υποδοχέα πολλαπλασιασμού των υπεροξειδιοσωμάτων
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο
PR	progesterone receptor υποδοχέας προγεστερόνης
P.R.	phenol red ερυθρό της φαινόλης
Prox1	prospero homeobox 1 παραπλήσια της <i>Prospero</i> ομοιοτική πρωτεΐνη 1
PVA	polyvinyl alcohol πολυβινυλική αλκοόλη
P/S	pen/strept ή penicillin/streptomycin πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
RIPA	radio immunoprecipitation assay δοκιμασία ραδιοανοσοκατακρήμνισης
R.T.	room temperature θερμοκρασία δωματίου (=22-25 °C)
rpm	revolution per minute στροφές ανά λεπτό
SDS	sodium dodecyl sulfate δωδεκακυλοθειικό νάτριο
SF1	steroidogenic factor 1 στεροειδογενετικός παράγοντας 1
SHR	steroid hormone receptor υποδοχέας στεροειδών ορμονών
SNP(s)	single nucleotide polymorphism(s) πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου
SUMO	small ubiquitin-like modifier μικρός τροποποιητής με δράση που θυμίζει αυτή της ουβικουΐτινης
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
TF	transcription factor μεταγραφικός παράγοντας
TR	thyroid receptor υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane 2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλο)-προπανοδιόλη 1,3
w/	with με, παρουσία
w/o	without χωρίς, απουσία
W.B.	Western blot ανοσοαποτύπωμα Western
WT	wild type αγρίου τύπου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	V
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	X
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	16
1.1 Γενικά.....	16
1.2 Ρύθμιση της μεταγραφής.....	17
1.3 Πυρηνικοί Υποδοχείς.....	18
1.3.1 Γενικά.....	18
1.3.2 Κατάταξη των πυρηνικών υποδοχέων.....	19
1.3.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων.....	21
1.3.4 Τρόπος δράσης των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων.....	24
1.4 Τα γλυκοκορτικοειδή.....	26
1.4.1 Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών.....	27
1.4.2 Γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών.....	29
1.4.3 Μη-γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών.....	30
1.4.4 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών.....	31
1.5 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών.....	33
1.5.1 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	33
1.5.2 Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	34
1.5.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	35
1.5.3.1 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.....	35
1.5.3.1.1 Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GRα-A.....	36
1.5.3.1.2 Ο GRβ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.....	37

1.5.3.1.3 Ο GRγ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.....	39
1.5.3.1.4 Οι GR-A και GR-P ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ..	39
1.5.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης	40
1.5.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	42
1.6 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	43
1.7 Βιολογικές επιδράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	44
1.7.1 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και μιτοχόνδρια.....	44
1.7.2 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης.....	46
1.8 Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού	47
1.9 Ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1	50
1.9.1 Γενικά για τον Prox1	50
1.9.2 Η δομή του Prox1	51
1.9.3 Prox1 και κύτταρα νευροβλαστών	53
1.9.4 Λειτουργικές δράσεις και βιολογικές επιδράσεις του Prox1	54
1.9.4.1 Δράση του Prox1 στον έλεγχο του ενεργειακού μεταβολισμού.....	55
1.10 Νευρικά κύτταρα και ενεργειακός μεταβολισμός.....	56
2. ΣΚΟΠΟΣ	60
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
3.1 ΥΛΙΚΑ	61
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	61
3.1.1.1 Χημικά	61
3.1.1.2 Θρεπτικά υλικά	62
3.1.1.3 Αντισώματα	62
3.1.1.4 Βακτηριακά στελέχη.....	63
3.1.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς	63

3.1.1.6 Διαλύματα.....	64
3.1.2 Οργανολογία.....	67
3.1.2.1 Αναλώσιμα.....	68
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	68
3.2.1 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	68
3.2.2 Απομόνωση pDNA από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep)	68
3.2.3 Διαχείριση Κυτταροκαλλιιεργειών.....	69
3.2.3.1 Καρκινική κυτταρική σειρά mN(euro)2A	69
3.2.3.2 Απόψυξη κυττάρων.....	70
3.2.3.3 Καλλιέργεια κυττάρων mN(euro)2A.....	70
3.2.3.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων	71
3.2.3.5 Ψύξη κυττάρων.....	71
3.2.3.6 Μέτρηση κυττάρων.....	72
3.2.3.7 Μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων	72
3.2.3.8 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων.....	73
3.2.3.9 Λύση κυττάρων.....	75
3.2.3.10 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων για Western Blot.....	75
3.2.3.11 Ομογενοποίηση κυττάρων	76
3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford.....	76
3.4 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	78
3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	78
3.6 Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blotting).....	80
3.7 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS.....	81
3.8 Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	82
3.9 Ανοσοκυτταροχημεία	84
3.10 Ανοσοκατακρήμνιση	85

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA	88
4.2 Διερεύνηση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του GR	88
4.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης του GR με τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1.....	90
4.5 Έλεγχος των επιπέδων ενδοκυτταρικής έκφρασης της από GR επαγόμενης PEPCK παρουσία και απουσία Prox1 σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A με τη μέθοδο ανοσοκυτταροχημείας.....	93
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Ο Prox1 είναι μέλος της οικογένειας των ομοιοτικών γονιδίων και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας βασικές μεταβολικές διεργασίες. Αρκετές από τις δράσεις του Prox1 πραγματοποιούνται μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που είναι κοινά με αυτά στα οποία συμμετέχει ο GR. Μελέτες αναφέρουν πως ο Prox1 συσχετίζεται και με τον υποκινητή του γονιδίου της PEPCK.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η δράση του Prox1 έναντι της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR σε νευρικά κύτταρα κυτταρικής σειράς mN(euro)2A. Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων, ενώ μελέτες προσδιορισμού της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της λουσιφεράσης, ανέδειξαν τον Prox1 ως ενεργοποιητή της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, ακόμα και παρουσία του ανταγωνιστή του, RU486. Στοχεύοντας στο γονίδιο της PEPCK πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης Western, όπου φάνηκε πως η παρουσία του Prox1 έχει ως αποτέλεσμα μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης PEPCK, παρουσία ή απουσία του RU486 και της δεξαμεθαζόνης (DEX), η οποία αποτελεί ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές.

Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν τον Prox1 ως ενεργοποιητή της δράσης του GR στα νευρικά κύτταρα, σε αντίθεση με αντίστοιχες παρατηρήσεις μας σε άλλους τύπους κυττάρων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια ιστοειδική ρυθμιστική δράση του Prox1 έναντι του GR, η οποία πιθανόν να επιτελείται μέσω αλληλεπίδρασης των δύο μορίων και στρατολόγησης διαφορετικών ρυθμιστικών μορίων στο μεταγραφικό σύμπλοκο, ανάλογα με το είδος και τη φυσιολογία του κυττάρου. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν επίσης την κατασταλτική δράση του Prox1 στην έκφραση του γονιδίου της PEPCK στα νευρικά κύτταρα, η οποία πιθανόν να επιτελείται ανεξάρτητα από τη ρυθμιστική δράση του GR.

ABSTRACT

Glucocorticoid receptor (GR) is a transcriptional factor (TF) that modulates various biological processes by regulating the expression of numerous target genes. One of its most essential roles is its implication in the transcription regulation of glyconeogenic enzymes, including phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). There are several regulatory mechanisms for GR; for instance regulation through its interaction with other transcription factors.

Prox1 is a member of the homeobox genes family. It acts as a transcription factor and it is involved in the regulation of fundamental metabolic processes; several of which are also regulated by GR. In this context, emerging evidence suggests that Prox1 is associated with the PEPCK gene promoter.

In this study we examined the effect of Prox1 on the GR transcriptional regulation in neuronal cells, mN(euro)2A. Immunoprecipitation analysis revealed GR and Prox1 interaction. Functional characterization of GR through luciferase-reporter gene assay demonstrated that Prox1 induced GR transcriptional activation, even in the presence of its known antagonist, RU486. Further work focused on the regulatory effects of Prox1 on PEPCK gene. Analysis of PEPCK gene expression by immunofluorescence assays and Western blot analysis showed reduced PEPCK expression levels by Prox1; in the presence or absence of the GR agonist (DEX) and antagonist (RU486).

Our results indicate Prox1 as an activator of the GR transcriptional activity in neuronal cells, in contrast to our observations in different cell types. This reveals a cell type specific mode of action of Prox1 on the regulation of GR transcriptional activity, which may be based on Prox1 and GR interaction and a possible cell type specific differential recruitment of distinct regulatory molecules in the transcription initiation complex. Our results also confirmed the suppressive effects of Prox1 on the transcription and thus the expression of PEPCK gene in neuronal cells, which might be exerted via a signaling pathway not mediated by GR.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR). Ο GR είναι μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ενεργοποιείται από τη δέσμευση της ορμόνης-προσδέτη και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (transcription factor, TF) στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων [Yamamoto, 1985; Beato *et al.*, 1995].

Απουσία των γλυκοκορτικοειδών, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένος σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 (heat shock protein 70 ή HSP70) και HSP90. Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του GR από τις συνοδούς πρωτεΐνες, αφού η λιπόφιλη φύση των ορμονών τους επιτρέπει να διασχίζουν την πλασματική μεμβράνη και να προσδένονται στον GR. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας μετατοπίζεται στο εσωτερικό του πυρήνα ή των μιτοχονδρίων και ο μηχανισμός δράσης του περιλαμβάνει την ικανότητα τόσο της ενεργοποίησης όσο και της καταστολής της μεταγραφής των γονιδίων στόχων, ανάλογα με το τι είδους αλληλεπίδραση πραγματοποιείται.

Σε ό,τι αφορά τον πυρήνα, ο συνδεδεμένος με προσδέτη GR δύναται να δεσμευτεί στο DNA ως μονομερές [Hudson *et al.*, 2013] ή ως διμερές σε παλινδρομικές αλληλουχίες αποκρινόμενες στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) και να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του [Karin, 1998; McKay and Cidlowski, 1999; Saklatvala, 2002; Yudt and Cidlowski 2002; De Bosscher *et al.*, 2003]. Η αλληλεπίδραση του ενεργοποιημένου GR με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα [Psarra *et al.*, 2011], αλλά και σε συνδυασμό με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ελέγχοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων αυτών.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζουν το δίκτυο δράσης των γλυκοκορτικοειδών σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο στόχο μπορούν να παρίστανται και να δρουν είτε στον υποκινητή είτε σε ενισχυτή (/ές) του γονιδίου στόχου. Πιο συγκεκριμένα, η ενοποίηση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών λαμβάνει χώρα στις μονάδες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Units, GRUs), οι οποίες αποτελούνται από ένα συνδυασμό αλληλουχιών GREs και θέσεις δέσμευσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Παράδειγμα τέτοιου GRU αποτελεί ο

υποκινητής του γονιδίου της PEPCK [Hanson and Reshef, 1997; Stafford *et al.*, 2001; Schoneveld *et al.*, 2004].

Το γονίδιο της PEPCK αποτελεί στόχο δέσμευσης του GR στα GREs που βρίσκονται ανοδικά του υποκινητή του (άμεση αλληλεπίδραση) και υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR [Scott *et al.*, 1998.; Le *et al.*, 2005]. Γενικότερα έχουν δημοσιευτεί αρκετά γονίδια που αποτελούν στόχους του GR [McKay and Cidlowski, 1999; Le *et al.*, 2005]. Η κατανόηση του πώς τα γονίδια ελέγχονται μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των γλυκοκορτικοειδών έχει ιδιαίτερη βιοχημική σημασία και θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις, αποκλείοντας τυχόν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Μια ολοκληρωμένη κατανόηση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών απαιτεί τη γνώση όχι μόνο του συνόλου των γονιδίων που δεσμεύονται και ρυθμίζονται από τον GR, αλλά και των μεταγραφικών παραγόντων που δύνανται να αλληλεπιδρούν με τον GR, καθώς επίσης και των γονιδιακών τόπων όπου πραγματοποιούνται αυτές οι αλληλεπιδράσεις. Ένα παράδειγμα τέτοιου μεταγραφικού παράγοντα είναι και η ομοιοτική πρωτεΐνη Prox1.

1.2 Ρύθμιση της μεταγραφής

Η μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων είναι μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία που συντελείται παρουσία ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών. Η ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο είναι υπεύθυνη για την ιστοειδική έκφραση των γονιδίων, καθώς και για τη γονιδιακή έκφραση κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόκριση σε ενδοκυττάρια σήματα, όπως οι ορμόνες.

Η ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των γονιδίων γίνεται προγραμματισμένα και σε αυτό παίζουν ουσιαστικό ρόλο οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, παρακείμενα στο γονίδιο το οποίο ελέγχουν. Κάθε μεταγραφικός παράγοντας δύναται να συμμετέχει στη ρύθμιση της μεταγραφής πολλαπλών γονιδίων, σε συνεργασία πάντα με άλλες πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι πλειάδα κυτταρικών λειτουργιών [Mitchell and Tjian, 1989; Pabo and Sauer, 1992; Wolberger, 1999].

Η έναρξη της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν για την έκφραση πρωτεϊνών ευκαρυωτικών κυττάρων απαιτεί την παρουσία τόσο της RNA πολυμεράσης II (RNA pol II), όσο και κάποιων παραγόντων που καθοδηγούν την πολυμεράση στη θέση έναρξης της μεταγραφής στο DNA. Οι παράγοντες αυτοί

καλούνται βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες (TFIIA, TFIIIB, TFIIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH) και βοηθούν στο σχηματισμό του προεναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής [Conaway and Conaway, 1993; Sauer *et al.*, 1995; Zawel and Reinberg, 1995; Tansey and Herr, 1997; Green, 2000].

Ωστε να ξεκινήσει η μεταγραφή ενός γονιδίου δεν αρκεί η πρόσδεση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του γονιδίου. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το DNA βρίσκεται με τη μορφή επαναλαμβανόμενων νουκλεοσωμάτων που αποτελούνται από 146 ζεύγη βάσεων DNA περιελιγμένων γύρω από ένα οκταμερικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Το οκταμερές περιέχει δύο αντίγραφα από κάθε μία από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4 και είναι πλούσιο σε βασικά αμινοξέα τα οποία αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA.

Μια σειρά από μελέτες φανέρωσε ότι το νουκλεοσωμικό DNA δεν επιτρέπει τη διαδικασία της μεταγραφής, καθώς οι αλληλεπιδράσεις των ιστονών με το DNA εμποδίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες να συνδεθούν στο DNA [Lemon and Tjian, 2000]. Ωστόσο, διάφορα σύμπλοκα πρωτεϊνών που λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση της μεταγραφής μπορούν να δράσουν τροποποιώντας τις ιστόνες ή μεταβάλλοντας τη δομή της χρωματίνης, βοηθώντας έτσι στο σχηματισμό του εναρκτήριου συμπλόκου της μεταγραφής.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα ευκαρυωτικά κύτταρα αντιμετωπίζουν το πρόβλημα των νουκλεοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μεταγραφής: α) ATP-εξαρτώμενα σύμπλοκα αναδιάταξης της χρωματίνης [Vignali *et al.*, 2000] και β) σύμπλοκα που τροποποιούν τις ουρές των ιστονών που προεξέχουν από την επιφάνεια των νουκλεοσωμάτων μέσω τροποποιήσεων ακετυλίωσης, φωσφορυλίωσης, μεθυλίωσης ή αλληλεπίδρασης με ουβικουΐτίνες. Με αυτό τον τρόπο η δομή της χρωματίνης χαλαρώνει και είναι δυνατή η πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA [Fu *et al.*, 2004; Hermanson *et al.*, 2002].

1.3 Πυρηνικοί Υποδοχείς

1.3.1 Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NRs) είναι μια υπερ-οικογένεια πρωτεϊνών η οποία συμπεριλαμβάνει περισσότερες από 150 διαφορετικές πρωτεΐνες, που λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες [Evans, 1988; Olefsky, 2001].

Στις πλείστες των περιπτώσεων, οι προκείμενοι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται από προσδέτες και μεταξύ άλλων, έχουν ενεργό ρόλο και στην αναδιάταξη της χρωματίνης. Μπορούν να λειτουργούν είτε μόνοι τους είτε σε συνεργασία με μόρια συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχουν και πυρηνικοί υποδοχείς των οποίων η μεταγραφική ενεργότητα δεν είναι προσδετο-εξαρτώμενη, αλλά ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά μέσω φωσφορυλίωσης ή ακετυλίωσης ή μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς [Mangelsdorf and Evans, 1995; Hermanson *et al.*, 2002].

Η μελέτη τους είναι αξιολογική, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διάφορων βιολογικών λειτουργιών όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός και η ομοιόσταση [Beato *et al.*, 1995; Kastner *et al.*, 1995; Chambon, 1996; Aranda and Pascual, 2001; Giguere, 1999].

Στους NRs συγκαταλλέγονται οι υποδοχείς των ορμονών του θυρεοειδούς, των στεροειδών ορμονών, των ρετινοειδών και της βιταμίνης D, καθώς επίσης και διάφοροι "ορφανοί" υποδοχείς [Aranda and Pascual, 2001]. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι ένας καλά μελετημένος πυρηνικός υποδοχέας και ανήκει στην υποοικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών.

1.3.2 Κατάταξη των πυρηνικών υποδοχέων

Οι NRs μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους και τη δυνατότητά τους να διμερίζονται και να προσδένονται στο γενωμικό DNA. Οι υποπεριοχές του DNA όπου προσδένονται οι NRs μπορεί να είναι ευθείες, παλίνδρομες ή ανεστραμμένες επαναλήψεις που διαχωρίζονται από 1-5 νουκλεοτίδια (nucleotides, nts) [Jiang *et al.*, 1995].

Σε γενικές γραμμές, οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Σχετικά πρόσφατα δεδομένα, αποδεικνύουν την παρουσία τους και στα μιτοχόνδρια [Psarra and Sekeris, 2011; η εκεί βιβλιογραφία]. Η ενεργοποίηση των NRs προκύπτει συνήθως από τη δέσμευση ενός προσδέτη, αλλά είναι επίσης δυνατό να ενεργοποιηθούν μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας (cross-talking) με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Οι NRs δρουν ως μεταγραφικοί υποδοχείς με το να αλληλεπιδρούν άμεσα ως μονομερή, ομοδιμερή ή ως ετεροδιμερή (συνήθως με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς

X) με ειδικές DNA αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων. Οι επιδράσεις τους στη διαδικασία της μεταγραφής διαμεσολαβούνται από συν-ρυθμιστικά μόρια.

Η ενδοκυτταρική κατανομή των στεροειδών υποδοχέων (Steroid Hormone Receptors, SHRs) είναι αποτέλεσμα της πυρηνο-κυτταροπλασματικής διάχυσης και της ATP-εξαρτώμενης πυρηνο-κυτταροπλασματικής παλινδρομικής κίνησης [Guiochon-Mantel *et al.*, 1991]. Η πλειοψηφία των υποδοχέων οιστρογόνων (estrogen receptor, ER), ανδρογόνων (androgen receptor, AR) και προγεστερονών (progesterone receptor, PR) είναι στον πυρήνα και αυτό οφείλεται στην παρουσία των αποκαλούμενων σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signals, NLSs), τα οποία θεωρείται ότι απαιτούνται για την αναγνώριση πυρηνικών πόρων. Ο αριθμός και η θέση των NLSs ποικίλλουν μεταξύ των SHRs, αλλά συχνά ένα ιδιόσυστατο NLS (NLS1) βρίσκεται στα σύνορα των περιοχών C-D (βλέπε §1.3.3 «Δομή των Πυρηνικών Υποδοχέων»), ενώ ένα δεύτερο NLS (NLS2) εντοπίζεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD) και είναι προσδετο-εξαρτώμενο.

Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός είναι περισσότερο περίπλοκος για τον GR και τον MR, επειδή έχει αναφερθεί η ορμονο-προκληθείσα πυρηνική μετατόπιση. Γενικότερα όλοι οι κυτταροπλασματικοί SHRs απουσία προσδέματος είναι συνδεδεμένοι με ένα μεγάλο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο συνοδών, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (HSP90), το οποίο χρησιμεύει στη διατήρηση των υποδοχέων σε μια ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα, έχοντας μια διαμόρφωση καλά προετοιμασμένη για τη σύνδεση ορμονών [Pratt and Toft, 1997]. Τυχόν δέσμευση του προσδέτη (εξειδικευμένη ορμόνη) στον υποδοχέα του οδηγεί σε αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και τη μετακίνησή του, σε συμπλοκοποιημένη μορφή με την ορμόνη, στον πυρήνα ή/και στο μιτοχόνδριο, όπου προσδένεται συνήθως ως ομοδιμερές σε παλίνδρομες ακολουθίες του DNA.

Η ταξινόμηση των NRs είναι επίσης δυνατό να γίνει είτε με βάση τον μηχανισμό δράσης τους [Mangelsdorf *et al.*, 1995; Novac and Heinzl, 2004] είτε βάσει ομολογίας [Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999; Laudet, 1997].

Οι NRs μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες [Beato *et al.*, 1996]. Σύμφωνα με την επιτροπή ονοματολογίας πυρηνικών υποδοχέων [1999], οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (SHRs) και οι παρόμοιοι υποδοχείς των SHR διαμορφώνουν την υπο-οικογένεια 3 των πυρηνικών υποδοχέων (NR3). Η NR3 περιλαμβάνει δύο υποδοχείς για τα οιστρογόνα (ERα και ERβ ή NR3A1 και NR3A2 αντίστοιχα), δύο

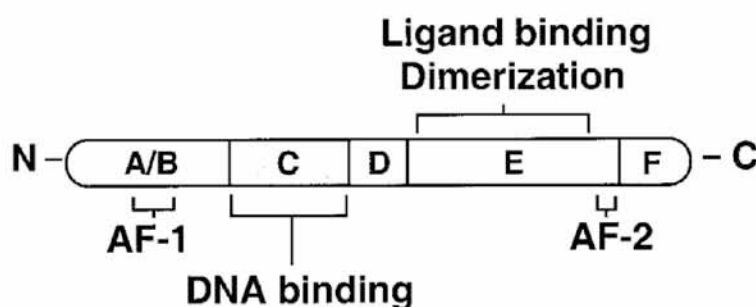
οιστρογόνο-σχετικούς ορφανούς υποδοχείς (ERRα/ERR1 και ERRβ/ERR2, ή NR3B1 και NR3B2 αντίστοιχα) και από έναν υποδοχέα για τις άλλες σημαντικές κατηγορίες στεροειδών ορμονών: τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR ή NR3C1), τον υποδοχέα των μεταλλοκορτικοειδών (MR ή NR3C2), τον υποδοχέα της προγεστερόνης (PR ή NR3C3) και τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR ή NR3C4).

Όλοι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, μία υπο-οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από ευδιάκριτες περιοχές που αντιστοιχούν σε λειτουργικές περιοχές δομικών μονάδων.

1.3.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων

Οι NRs αποτελούνται από έξι λειτουργικά διακριτές περιοχές (Εικόνα 1.1) και η ονοματολογία των περιοχών A-F χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για όλα τα μέλη του συνόλου της υπερ-οικογένειας [Krust *et al.*, 1986; Green and Chambon, 1987; Kumar *et al.*, 1987].

Διαθέτουν μία μεταβλητή αμινοτελική πρωτεϊνική επικράτεια (δομική περιοχή A/B), μία συντηρημένη πρωτεϊνική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (δομική περιοχή C), μία συνδετική περιοχή (δομική περιοχή D), μία καλά συντηρημένη περιοχή που αποτελεί την πρωτεϊνική επικράτεια πρόσδεσης του προσδέτη (δομική περιοχή E) και μία καρβοξυτελική πρωτεϊνική επικράτεια (δομική περιοχή F) [Aranda and Pascual, 2001].



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση της δομικής και λειτουργικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. Η περιοχή A/B περιέχει την AF-1 δομική περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, η C περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA, η D αποτελεί το σύνδεσμο ανάμεσα στις περιοχές C και E και η E είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και περικλείει την περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2. Στο καρβοξυτελικό άκρο της AF-2 εντοπίζεται η καλά διατηρημένη περιοχή AF-2AD. [Από Aranda and Pascual, 2001].

Σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεϊνικές επικράτειες, η δομική περιοχή A/B είναι η λιγότερο συντηρημένη και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποικιλία τόσο ως προς το μήκος όσο και ως προς την πρωτοταγή της ακολουθία. Οι ισομορφές υποδοχέων

NRs που προκύπτουν από ένα γονίδιο είτε με εναλλακτικό μάτισμα είτε χρησιμοποιώντας εναλλακτικούς υποκινητές παρουσιάζουν ποικιλομορφία στη συγκεκριμένη περιοχή [Chambon, 1996].

Χαρακτηριστικό της αμινοτελική περιοχής A/B είναι η παρουσία μιας αυτόνομης πρωτεϊνικής επικράτειας με λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης, γνωστής ως AF-1 (Activation Function-1). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα απουσία προσδέτη, καθώς δύναται να προσδένει συνενεργοποιητές της μεταγραφής [McKenna and O'Malley, 2002]. Η AF-1 αποτελεί επίσης στόχο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μέσα από διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης με συνέπεια να επηρεάζεται η μεταγραφική ενεργότητα ενός NR. Οι τροποποιήσεις στις οποίες υπόκειται μπορούν να επηρεάσουν είτε τη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα είτε τη συγγένεια της δέσμευσης στο DNA [Shao and Lazar, 1999], καθώς επίσης και την εν δυνάμει πρόσδεση συνενεργοποιητών [Tremblay *et al.*, 1999]. Επιπλέον, η ενεργότητα της AF-1 φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τον υποκινητή όσο και από τον κυτταρικό τύπο, προτείνοντας ότι πιθανότατα να συμβάλλει στην εξειδίκευση της δράσης μεταξύ των ισομορφών των υποδοχέων, αλληλεπιδρώντας με ιστοειδικούς παράγοντες [Tora *et al.*, 1988; Berry *et al.*; 1990].

Η C περιοχή (DNA-binding domain, DBD) είναι η πιο καλά συντηρημένη περιοχή των NRs. Αποτελείται από δύο δακτύλους ψευδαργύρου (zinc fingers, zf), που εκτείνονται κατά 60-70 αμινοξέα (aminoacids, aa) και μια COOH-τελική επέκταση (Carboxy Terminal Extension, CTE). Σε κάθε zf, τέσσερα μόρια κυστεΐνης (Cys) συνδέονται τετραεδρικά με ένα ιόν ψευδαργύρου, ενώ στην DBD περιοχή υπάρχουν ακόμη 9 συνολικά αμινοξέα Cys, που είναι εξελικτικά συντηρημένα και απαιτούνται για την ισχυρή πρόσδεση στο DNA. Στον πρώτο zf εντοπίζεται το «κουτί P» που είναι απαραίτητο για την αναγνώριση των κατάλληλων μοτίβων στο DNA, ενώ το «κουτί D», που εντοπίζεται στον δεύτερο zf, είναι απαραίτητο για το σχηματισμό ομοδιμερών. Η περιοχή CTE (C-terminal extension) περιλαμβάνει τα «κουτιά A και T» (A, T boxes). Το «κουτί A» έρχεται σε επαφή με τη μικρή αύλακα του DNA, ενώ το «κουτί T» είναι σημαντικό για την πρόσδεση των διμερών στο DNA [Mangelsdorf and Evans, 1995].

Οι zf φέρουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ειδικές ακολουθίες στο DNA, τις HREs (Hormone Response Elements) [Evans, 1988]. Ένα στοιχείο ορμονικής απόκρισης (HRE) αποτελείται από 6 ζεύγη βάσεων (base pairs, bps). Έχουν εντοπιστεί δύο ομόφωνα μοτίβα: η ακολουθία AGAACA, η οποία αναγνωρίζεται κυρίως από

τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και η ακολουθία AGG/TTCA, η οποία αποτελεί μοτίβο αναγνώρισης από τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς [Glass, 1994].

Οι NRs μπορούν να προσδεθούν στα HREs είτε ως μονομερή είτε ως διμερή, ρυθμίζοντας τη διαδικασία της μεταγραφής. Είναι επίσης δυνατό να συνδεθούν σε ένα μόνο εξαμερές μοτίβο HRE, αν και οι περισσότεροι προσδέονται ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή σε HREs που αποτελούνται από δύο εξαμερή μοτίβα. Στα διμερή HREs, οι υποπεριοχές μπορεί να είναι ευθείες, παλίνδρομες ή ανεστραμμένες επαναλήψεις.

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών αναγνωρίζουν αποκλειστικά παλίνδρομα στοιχεία, τα οποία διαχωρίζονται από 3 nts, ενώ οι μη στεροειδικοί υποδοχείς δύνανται να προσδέονται σε HREs με διαφορετικές στερεοδιατάξεις, κυρίως όμως σε ευθείες επαναλήψεις (Direct Repeats, DRs) που διαχωρίζονται από 1-5 nts (DR1-5) [Mangelsdorf and Evans, 1995]. Τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή χαρακτηρίζονται από μια παλινδρομική δομή του τύπου AGAACAx_{xx}TGTTCT όταν είναι θετικά, ενώ για τα αρνητικά GREs (nGREs) έχουν αναγνωριστεί ποικίλες νουκλεοτιδικές συνθέσεις. Έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου η παρουσία μόνο του μισού της παλινδρομικής αλληλουχίας είναι αρκετή για να προκαλέσει σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών.

Η περιοχή D είναι μια μη συντηρημένη εξελικτικά περιοχή των NRs που χρησιμεύει ως εύκαμπτος σύνδεσμος ανάμεσα στο DBD και την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (Ligand-binding domain, LBD). Η ευελιξία που χαρακτηρίζει την περιοχή, επιτρέπει στην DBD να περιστρέφεται κατά 180°, με αποτέλεσμα μερικοί υποδοχείς να έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν ως διμερή σε HREs που αποτελούνται τόσο από ευθείες όσο και από ανεστραμμένες επαναλήψεις του μοτίβου AGGTCA [Glass, 1994]. Σε μερικές περιπτώσεις η περιοχή αυτή περιέχει τα σήματα για τον πυρηνικό εντοπισμό (NLS) του υποδοχέα, καθώς επίσης και επιφάνειες αλληλεπίδρασης με συγκαταστολείς [Chen and Evans, 1995] και συνενεργοποιητές [Tcherepanova *et al.*, 2000].

Η περιοχή E (πρωτεϊνική επικράτεια LDB), πέρα από το ρόλο της στη σύνδεση του προσδέτη έχει και επιπλέον λειτουργίες: βοηθάει στο διμερισμό, στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και στη μεταγραφική ενεργοποίηση παρουσία του προσδέτη. Στην πρωτεϊνική επικράτεια LBD εντοπίζεται και η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2 (Activation Function-2), η οποία περιλαμβάνει δύο καλά συντηρημένες περιοχές: ένα μοτίβο υπογραφής (signature motif) στο

αμινοτελικό άκρο και την AF2-AD περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο [Wurtz *et al.*, 1996].

Η περιοχή AF-2AD περιλαμβάνει μία εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία, την ΦΦΧΕΦΦα/L (όπου “Φ” είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ, “Χ” ένα οποιοδήποτε αμινοξύ, “a” ένα όξινο αμινοξύ, “L” η λευκίνη και “E” ένα αμινοξύ γλουταμινικού οξέος) η οποία παρουσιάζει μια αμφιπαθή α-ελικοειδή διαμόρφωση, με τα καλά συντηρημένα υδρόφοβα αμινοξέα να βρίσκονται τοποθετημένα στο εσωτερικό της περιοχής LBD, ενώ τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια [Danielian *et al.*, 1992; Iyemere *et al.*, 1998]. Το εν λόγω μοτίβο είναι συντηρημένο στα περισσότερα μέλη των NRs, με το γλουταμινικό οξύ να παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ενεργοποίηση, ως απαραίτητο για την αλληλεπίδραση των NRs με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές [Durand *et al.*, 1994].

Το μοτίβο υπογραφής εντοπίζεται στις έλικες 3, 4 και στο βρόχο ανάμεσά τους [Wurtz *et al.*, 1996]. Τυχόν μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή ελαττώνουν τη μεταγραφική ενεργότητα του NR. Πιο συγκεκριμένα, τυχόν μετάλλαξη ενός καλά συντηρημένου αμινοξέος Lys στο καρβοξυτελικό άκρο της έλικας 3, επηρεάζει σημαντικά μια και αποτελεί μέρος ενός φορτισμένου πεδίου (charge clamp), η δημιουργία του οποίου είναι απαραίτητη για την πρόσδεση των συνενεργοποιητών της μεταγραφής [Nolte *et al.*, 1998].

Η περιοχή F είναι απαραίτητη για τη δέσμευση ορμονών στους PR, GR, και AR, αλλά όχι στον ERα και είναι επίσης σημαντική για τη διάκριση μεταξύ ορμονικών προσδεμάτων των αγωνιστών και ανταγωνιστών [Nichols *et al.*, 1998].

1.3.4 Τρόπος δράσης των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς ακολουθούν μια σειρά σταδιακών βημάτων ούτως ώστε να ενεργοποιήσουν ή να απενεργοποιήσουν τα γονίδια στόχους τους. Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσδέτη και του πυρηνικού υποδοχέα.

Στην πρώτη εκ των κύριων περιπτώσεων, οι πυρηνικοί υποδοχείς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και είναι μεταγραφικά ανενεργοί εξαιτίας της σύνδεσής τους με πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπισή του στον πυρήνα, όπου προσδέεται σε HREs και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων-στόχων.

Στη δεύτερη εκ των κύριων περιπτώσεων, τα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων εντοπίζονται από την αρχή στον πυρήνα. Απουσία του προσδέτη είναι δυνατό να δεσμεύονται στο DNA και σε συνεργασία με συγκαταστολείς να εμποδίζουν την έκφραση γονιδίων [Tsai and O'Malley, 1994]. Οι συγκαταστολείς βρίσκονται σε πολυσύνθετα σύμπλοκα τα οποία διαθέτουν ενεργότητα αποακετυλίωσης ιστονών, οδηγώντας έτσι σε μια πιο συμπαγή δομή της χρωματίνης, που περιορίζει την πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.

Κατά τη σύνδεσή τους με τον κατάλληλο προσδέτη, οι υποδοχείς υφίστανται διαμορφωτικές τροποποιήσεις που επιτρέπουν την επανασυναρμολόγηση συμπλόκων πολλαπλών συνενεργοποιητών. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες είναι παράγοντες επαναδιάταξης χρωματίνης ή παράγοντες με δράση ακετυλίωσης ιστονών, ενώ άλλοι μπορεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Η στρατολόγηση συμπλόκων από συνενεργοποιητές στον υποδοχέα στόχο προκαλεί αποσυμπύκωση της χρωματίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής [McKenna and O'Malley, 2002]. Ο χαρακτηρισμός συμπλόκων από συγκαταστολείς και συνενεργοποιητές οδήγησε στη δημιουργία ενός γενικού μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου διάφοροι υποδοχείς επιτυγχάνουν τη μεταγραφική τους απόκριση στα γονίδια στόχους.

Αρκετές μελέτες κάνουν λόγο για εγγενή ύπαρξη πυρηνικών υποδοχέων ορμονών (Hormone nuclear receptors, HNRs) εντός των μιτοχονδρίων αρκετών κυτταρικών σειρών. Έχουν εντοπιστεί υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών ορμονών [Demonacos *et al.*, 1993; Scheller *et al.*, 2000; Moutsatsou *et al.*, 2001; Koufali *et al.*, 2003; Psarra *et al.*, 2003, 2005; Sionov *et al.*, 2006], υποδοχείς οιστρογόνων [Chen *et al.*, 2004; Solakidi *et al.*, 2005a, 2005b], υποδοχείς ανδρογόνων [Solakidi *et al.*, 2005b], υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών [Scheller *et al.*, 2003] κ.ά. Ωστε να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί δράσης τους απαιτούνται περαιτέρω μελέτες.

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων και με μηχανισμούς ανεξάρτητους της δέσμευσης σε ένα HRE. Μπορούν έτσι να τροποποιήσουν την έκφραση γονιδίων που δεν διαθέτουν HREs μέσω θετικής ή αρνητικής αλληλεπίδρασης με την ενεργότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων, ενός μηχανισμού που είναι γνωστός ως «διασταυρούμενη μεταγραφή» (transcriptional cross-talk) [Gottlicher *et al.*, 1998].

Η διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών δεν περιορίζεται στο μεταγραφικό ανταγωνισμό [Perez-Juste and Aranda, 1999]. Η φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων προσδίδει ένα

σημαντικό συνδετικό στοιχείο (δεσμό) μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών. Πολλαπλές κινάσες που ενεργοποιούνται από εξωκυττάρια σήματα που δένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς επηρεάζουν την ενεργότητα των υποδοχέων μέσω γεγονότων φωσφορυλίωσης. Παραδείγματα τέτοιων κινάσων είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinases, MAPKs), οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cell cycle-dependent kinases, CDKs), η κινάση καζεΐνης και η πρωτεϊνική κινάση A [Shao and Lazar, 1999].

Ανάλογα με τον υποδοχέα και το αμινοξύ που εμπλέκεται, υπάρχουν περιπτώσεις όπου η φωσφορυλίωση μπορεί να αναστείλει την προσδετο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων εξαιτίας της μείωσης της συγγένειας πρόσδεσης είτε του προσδέματος στον υποδοχέα είτε του συμπλόκου στο DNA. Εν τούτοις, σε άλλες περιπτώσεις η ενεργοποίηση των υποδοχέων μπορεί να γίνει απουσία των συγγενών προσδεμάτων από φωσφορυλίωση που προκύπτει ως αποτέλεσμα σημάτων από μεμβρανικούς υποδοχείς [Hermanson *et al.*, 2002].

Γλυκοκορτικοειδή και υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

1.4 Τα γλυκοκορτικοειδή

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

Σε ένα ζωντανό οργανισμό (*in vivo*), οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων, οι περισσότερες από τις οποίες καταλύονται από ένζυμα P450 του κυτοχρώματος κωδικοποιούμενα από γονίδια όπως το γονίδιο CYP11B1 (11-β-υδροξυλάση) [Nomura *et al.*, 1993], οι ορμόνες παραδίδονται στους ιστούς στόχους τους με μεταφορικές πρωτεΐνες [McKay and Cidlowski, 2003].

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

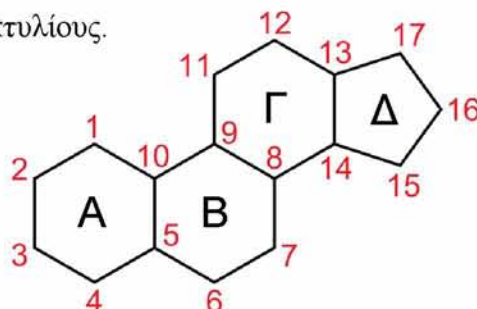
υποθάλαμο κατά τη διάρκεια στρες) εκκρίνεται (από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης) η ορμόνη κορτικοτροπίνη ACTH με έναν παλμικό και κικκαδικό τρόπο, με την ACTH να ελέγχει με τη σειρά της την έκκριση της κορτιζόλης η οποία με μηχανισμό ανάδρομης ρύθμισης ελέγχει την έκκριση των προαναφερθέντων ορμονών [Reichardt and Schütz, 1998; Balsalobre *et al.*, 2000; McKay and Cidlowski, 2003].

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

1.4.1 Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών

Οι δομές των γλυκοκορτικοειδών ορμονών, όπως και όλων των στεροειδών ορμονών, βασίζονται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων (Εικόνα 1.2). Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ και Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από τον δακτύλιο Α. Οι τρεις εξαμελείς δακτύλιοι, Α, Β και Γ, υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανάκλιτρου. Λόγω της δύσκαμπτης γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή δακτυλίων των κυκλοεξανίων.

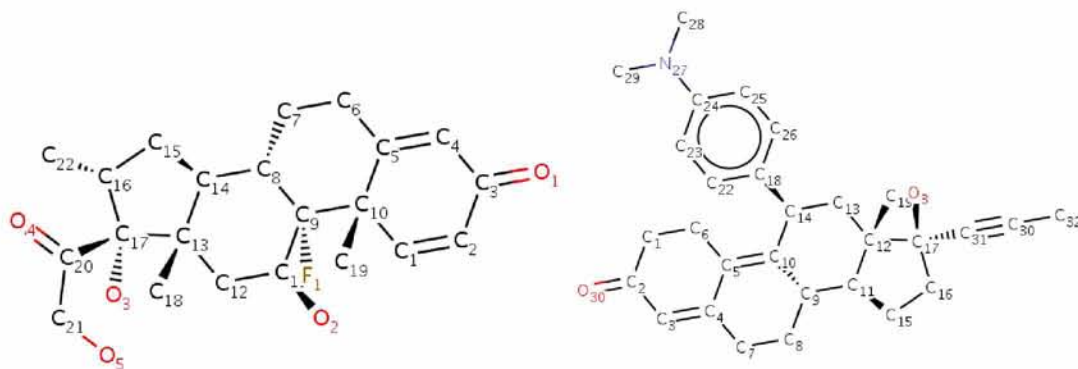
Συνήθως φέρουν μία μεθυλική ομάδα στους άνθρακες C-10 και C-13 και μία αλκυλική πλευρική αλυσίδα στον άνθρακα C-17. Η περαιτέρω διαφοροποίησή τους επιτυγχάνεται από τη σύσταση των πλευρικών τους αλυσίδων, τον αριθμό των επιπρόσθετων μεθυλικών ομάδων και από τις λειτουργικές ομάδες που είναι προσδεδεδεμένες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



Εικόνα 1.2. Αναπαρίσταται ο βασικός σκελετός ενός κοινού στεροειδούς.

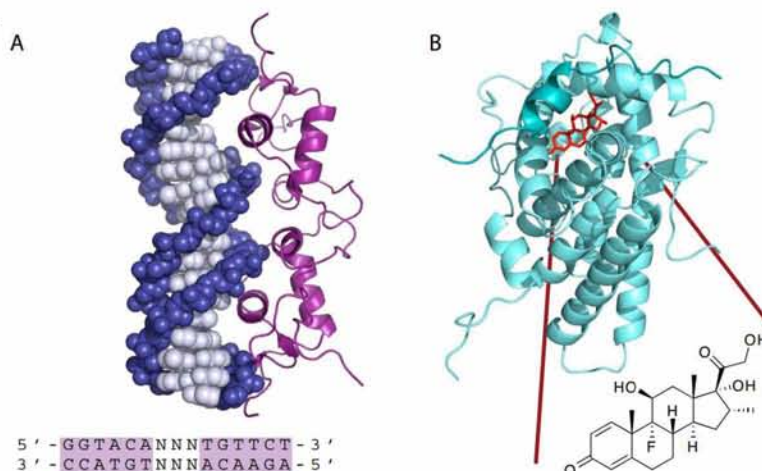
Εκτός από τις γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες που έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, χιλιάδες άλλες έχουν συντεθεί στα διάφορα φαρμακευτικά εργαστήρια, στα πλαίσια ερευνών για νέα φάρμακα. Η ερευνητική διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως τροποποίηση της δομής του μορίου μιας φυσικής ορμόνης με χημικές μεθόδους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

Στις πιο γνωστές συνθετικές μορφές γλυκοκορτικοειδών συγκαταλλέγονται οι ενώσεις δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX) και μifeπριστόνη (mifepristone ή RU-486). Η ουσία DEX (Εικόνα 3) είναι αγωνιστής του GR με 25 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον GR από ό,τι η κορτιζόλη και χαρακτηρίζεται για τις ισχυρά αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές της ιδιότητες. Η ουσία RU486 (Εικόνα 1.3) είναι μερικός ανταγωνιστής του GR και δρα ανασταλτικά στη δράση του.



Εικόνα 1.3. Αναπαρίστανται τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεξαμεθαζόνη (αριστερά) και RU486 ή μifeπριστόνη (δεξιά).

Με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έχουν προσδιοριστεί οι δομές της περιοχής πρόσδεσης LBD του GR συμπλοκοποιημένης με τον αγωνιστή δεξαμεθαζόνη (Εικόνα 1.4, B) [Bledsoe *et al.*, 2002; Kauppi *et al.*, 2003] και με τον ανταγωνιστή RU486 [Kauppi *et al.*, 2003]. Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας [Frego and Davidson, 2006].



Εικόνα 1.4. Κρυσταλλογραφικές δομές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

A) Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA του υποδοχέα συνδεδεμένη στο DNA (PDB 1R4O) με τη συνανετική θέση DBD να προβλέπεται. **B)** Η περιοχή σύνδεσης του προσδέματος (LBD) συνδεδεμένη με δεξαμεθαζόνη (PDB 1M2Z).

1.4.2 Γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών

Η λιπόφιλη φύση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών τους επιτρέπει να διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί δύο κύριοι υποδοχείς που δεσμεύουν κορτικοστεροειδή με υψηλή συγγένεια: ο MR ή ο τύπου I υποδοχέας κορτικοστεροειδών και ο GR ή ο τύπου II υποδοχέας κορτικοστεροειδών [Reul and de Kloet, 1985; Edwards *et al.*, 1988; Seckl and Walker, 2001]. Στον τύπου II έχουν εντοπιστεί δύο κύριες ισομορφές, οι α και β, εκ των οποίων μονάχα ο GRα έχει γενωμική δράση, ενώ ο GRβ πιθανολογείται να ασκεί ανταγωνιστική δράση στον GRα μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερών με τον GRα.

Της δέσμευσης του στεροειδούς στον υποδοχέα του εντός του κυτταροπλασματικού χώρου, έπεται μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, που έχει ως συνέπεια το διαχωρισμό του από το σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και την πυρηνική ή τη μιτοχονδριακή του μετατόπιση. Τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια οι υποδοχείς ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, δρώντας κυρίως ως προσδετο-εξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες.

Όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο GR δύναται να ρυθμίσει τα γονίδια στόχων του με ένα θετικό ή αρνητικό τρόπο. Η θετική ρύθμιση διαμεσολαβείται κυρίως από την άμεση σύνδεση του ενεργοποιημένου από προσδέτη ομοδιμερισμένου GR (GRα) επάνω στα επαγωγίμα στοιχεία ενισχυτών στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου στόχου, τα οποία είναι γνωστά ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs). Διαφορετικά, ο GR μπορεί να παρεμποδίσει τη δραστηριότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό δύναται να γίνει συνδεδεμένος σε αρνητικά GREs (nGREs), αλλά και με την αλληλεπίδρασή του με παράγοντες που δρουν ως συγκαταστολείς [Reichardt *et al.*, 2000; De Bosscher *et al.*, 2003].

Υπότυποι του GR που χαρακτηρίζονται από μοναδική έκφραση και ιδιαίζον προφίλ ρύθμισης γονιδίων συνεισφέρουν σε ιστο- και κυτταρο-ειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.

1.4.3 Μη γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών

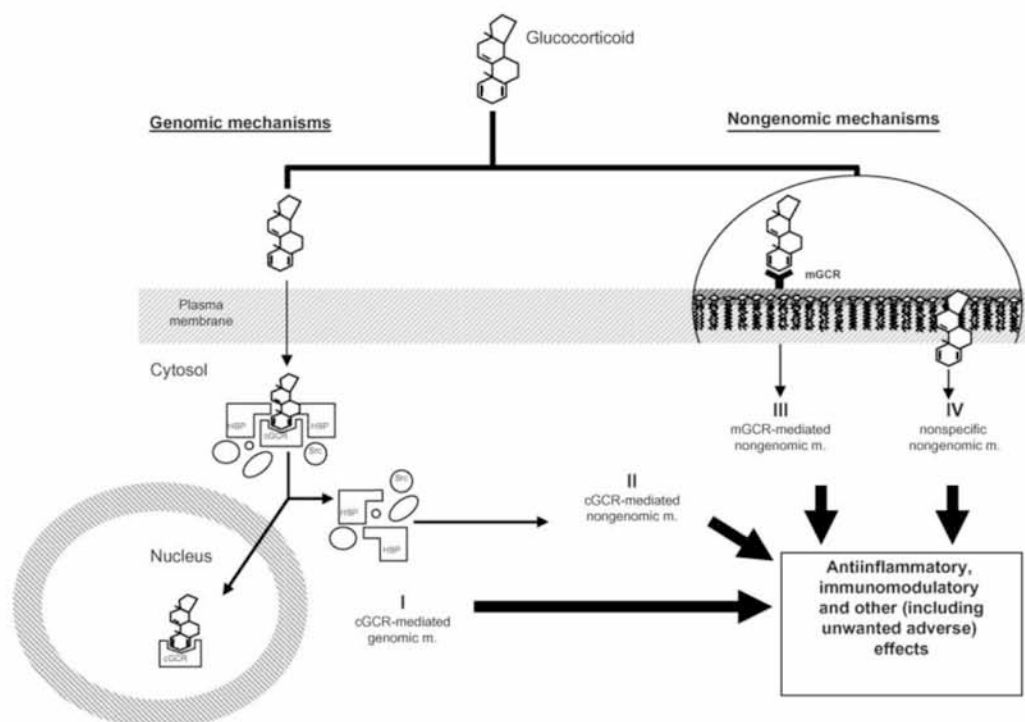
Εκτός από τον κλασσικό, αργό τρόπο δράσης των γλυκοκορτικοειδών, πειραματικά στοιχεία αποδεικνύουν και την ύπαρξη ταχείων, μη γενωμικών επιδράσεων των GCs στις κυτταρικές αποκρίσεις [Song and Buttgereit, 2006].

Η εξω-επινεφρίδια σύνθεση των κορτικοστεροειδών ορμονών δεν συμβάλλει ουσιαστικά στα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών των ορμονών, αλλά πιθανότατα μεσολαβεί διάφορες αυτοκρινείς και παρακρινείς επιδράσεις. Οι εν λόγω επιδράσεις των GCs πραγματοποιούνται με πολύ γρήγορο ρυθμό, γεγονός που υποδεικνύει πως η ρύθμισή τους δεν υφίσταται σε μεταγραφικό επίπεδο, γι' αυτό και καλούνται «μη γενωμικές», ώστε να διακριθούν από τον κλασσικό γενωμικό τρόπο δράσης των γλυκοκορτικοειδών (βλέπε Εικόνα 1.5).

Οι μη γενωμικές δραστηριότητες των GCs δεν χαρακτηρίζονται για την ομοιομορφία τους και γενικότερα έχουν περιγραφεί διάφοροι σχετικοί μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους [Buttgereit, 2004; Tasker *et al.*, 2006]. Η ιδέα σύμφωνα με την οποία ο GR θεωρήθηκε ότι ήταν κυρίως ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας και ότι η μη συνδεδεμένη με προσδέτη κυτταροπλασματική μορφή του GR (cGCR) ήταν απλά ανενεργή, έχει αναθεωρηθεί και έχει προταθεί ότι ο GR διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στο κυτταρόπλασμα ακριβώς λόγω αυτών των γρήγορων επιρροών.

Οι ταχείες επιδράσεις των GCs είναι δυνατό να εμφανίζονται λόγω πιθανής αλληλεπίδρασης των GCs με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Για παράδειγμα, έχει περιγραφεί ότι οι υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες (G protein coupled receptors, GPCRs) μπορούν να μεσολαβήσουν τις μη γενωμικές επιρροές των GCs [Maier *et al.*, 2005; Tasker *et al.*, 2006]. Θεωρείται πως για τη μεμβρανική τοποθέτηση και την ταχεία σηματοδότηση των στεροειδών είναι απαραίτητη μια αλληλουχία παλμιτουΐλωσης που εντοπίζεται τόσο στον GR όσο και σε αρκετούς άλλους στεροειδείς υποδοχείς [Marino and Ascenzi, 2006; Pedram *et al.*, 2007].

Έχει αναφερθεί πως οι μη γενωμικές δράσεις των GCs διαμεσολαβούνται μέσω μιας μορφής του GR η οποία είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη (mGCR). Εντοπίστηκε σε B κύτταρα και σε μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος [Gametchu *et al.*, 1999] καθώς επίσης και σε νευρικά κύτταρα [Orchinik *et al.*, 1991; Iwasaki *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1998] και έχει προταθεί πως η συγκεκριμένη μορφή του GR μπορεί να προκαλέσει μια αλυσίδα ενδοκυτταρικών γεγονότων [Bartholome *et al.*, 2004].



Εικόνα 1.5. Επισκόπηση των γενωμικών και των μη γενωμικών μηχανισμών δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Τα λιπόφιλα γλυκοκορτικοειδή διαπερνούν με απλή διάχυση την κυτταρική μεμβράνη και δεσμεύονται στον cGCR, ο οποίος διαμεσολαβεί γενωμικές (I) και μη γενωμικές (II) επιδράσεις. Οι μη γενωμικές επιδράσεις προτείνεται ότι μεσολαβούνται επίσης μέσω του μεμβρανικά συνδεδεμένου GCR (III) και μέσω αλληλεπιδράσεων με τις κυτταρικές μεμβράνες (IV). Όπου cGCR: κυτταροπλασματικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, mGCR=μεμβρανικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών. [Από: Stahn *et al.*, 2007].

1.4.4 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών

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

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

Εκτός από τις μεταβολικές δράσεις έχουν περιγραφεί και επιρροές των GCs σε σχέση με τη συμπεριφορά και τη λειτουργία του εγκεφάλου, τη διατήρηση του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού (HPA) άξονα και τον έλεγχο της απόκρισης στο

στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι τα τελικά προϊόντα του άξονα HPA και έχουν κεντρικό ρόλο στην απόκριση στο στρες. Κατά τη διάρκεια της οξείας απόκρισης στο στρες, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν βραχυπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως είναι η κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων. Επίσης, εμπλέκονται στις μακροπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως η διαμόρφωση και η ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

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

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

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

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

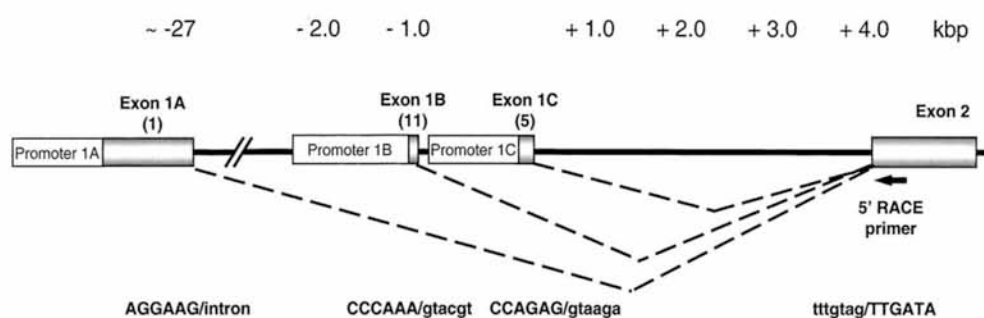
Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της αρθρίτιδας, της ρευματικής καρδίτιδας, των αλλεργιών, καθώς και για τη θεραπεία της ανεπάρκειας των επινεφριδίων. Ωστόσο, αρκετά από τα αποτελέσματα από θεραπείες όπου χορηγούνται γλυκοκορτικοειδή είναι πράγματι

ανησυχητικά [Belvisi *et al.*, 2001; Miner, 2002; Schäcke *et al.*, 2002] και εφίστανται ενδελεχούς μελέτης.

1.5 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

1.5.1 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το cDNA του hGR κλωνοποιήθηκε το 1985 [Gehring *et al.*, 1985; Hollenberg *et al.*, 1985] και αργότερα χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q31-32 [Theriault *et al.*, 1989]. Μέχρι και σήμερα, έχει βρεθεί μόνο ένα γονίδιο για τον GR (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Αναπαρίσταται η δομή και η οργάνωση του γονιδίου του GR. [Από Breslin *et al.*, 2001].

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

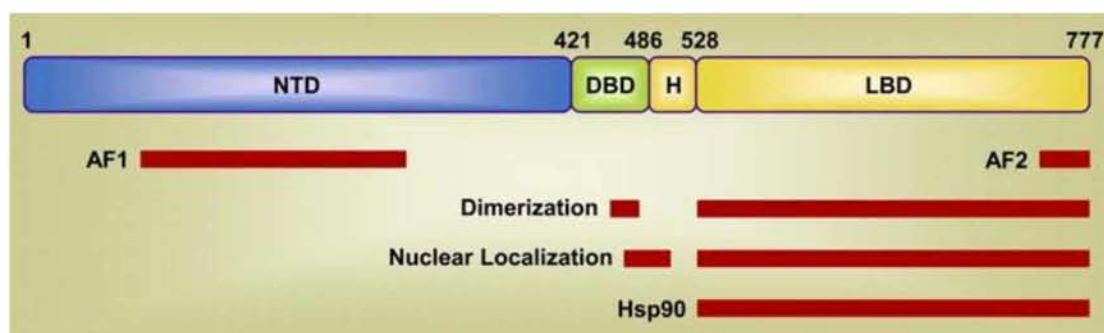
Τα δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA κωδικεύονται χωριστά από το εξόνιο 3 (167 bps) και το εξόνιο 4 (117 bps). Πέντε εξόνια (εξόνια 5, 6, 7, 8, 9α ή 9β) μαζί αποτελούν την περιοχή δέσμευσης του προσδέματος και την προσδετο-εξαρτώμενη περιοχή AF-2, καθώς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

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

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

1.5.2 Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Όπως κάθε μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ο GR είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που συνίσταται από (Εικόνα 1.7): μία N-τελική δομική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal transactivation domain, NTD), μία κεντρική δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) και μία C-τελική δομική περιοχή δέσμευσης προσδέτη (ligand-binding domain, LBD) [Kumar and Thompson, 2005]. Μια εύκαμπτη περιοχή του μορίου, αποκαλούμενη ως περιοχή «άρθρωσης», διαχωρίζει τις πρωτεϊνικές επικράτειες DBD και LBD.



Εικόνα 1.7. Ο GR συνίσταται από ένα αμινοτελικό άκρο (NTD), μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), την περιοχή άρθρωσης (hinge region ή H) και μία πρωτεϊνική επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Επισημαίνονται επίσης οι περιοχές που σχετίζονται με τη μεταγραφική ενεργότητα (AF1 και AF2), καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με το διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό και τη δέσμευση της πρωτεΐνης συνοδού HSP90. Οι αριθμοί των θέσεων αναφέρονται στην πρωτεϊνική αλληλουχία του ανθρώπινου GR. [Από Oakley and Cidlowski, 2011].

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

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

Η περιοχή LBD αποτελείται από 12 α-έλικες και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, δημιουργώντας ένα υδροφοβικό θυλάκιο για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών [Bledsoe et al., 2002]. Μια δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης (AF-2) η οποία

αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές κατά ένα προσδετο-εξαρτώμενο τρόπο εντοπίζεται στην περιοχή LBD. Δύο σήματα πυρηνικής τοποθέτησης, τα NL1 και NL2, βρίσκονται στο μεταίχμιο της σύνδεσης των περιοχών DBD/hinge και εντός του LBD αντίστοιχα.

1.5.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

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

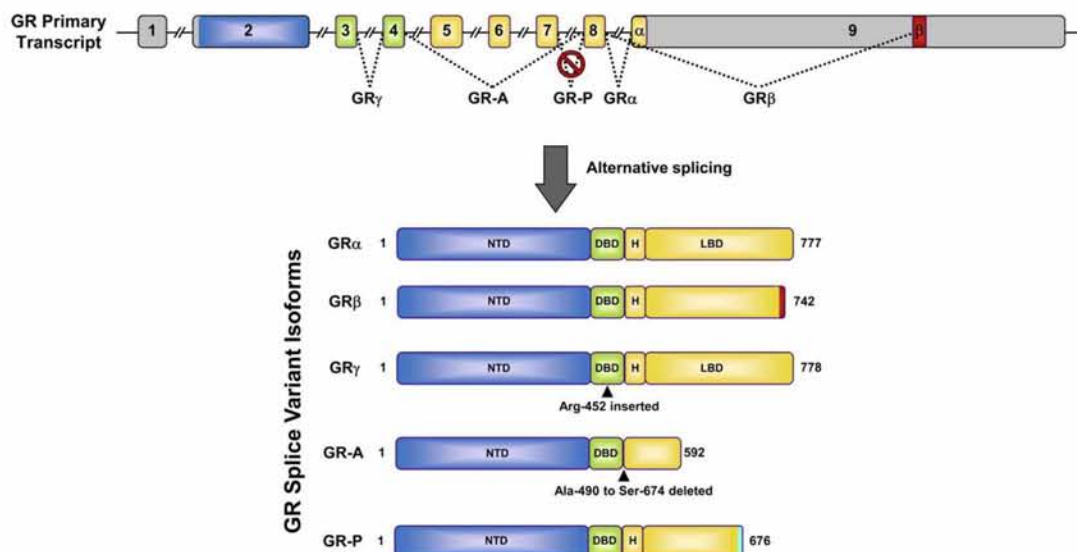
Το πρότυπο έκφρασης του GR δείχνει ότι ο υποδοχέας διανέμεται ευρέως σε όλα τα όργανα, αλλά είναι πιο επικρατής στο ήπαρ, στο νευρικό σύστημα και στους μυϊκούς ιστούς. Βέβαια, ανεξάρτητα από την ευρεία έκφραση του GR, η κυτταρική ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή είναι πολυσύνθετη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες [Bamberger *et al.*, 1996]. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να προσδιοριστεί στο σύνολό της με ένα συνδυασμό της συμπληρωματικής έκφρασης και της σύνθετης δράσης κάθε ισομορφής του GR.

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

1.5.3.1 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα

Όπως προαναφέρθηκε, το ανθρώπινο γονίδιο του GR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q31–32 και αποτελείται από 9 εξόνια. Εναλλακτικό μάτισμα κοντά στην ακρινή περιοχή του πρωτογενούς μεταγράφου δημιουργεί τις δύο κύριες ισομορφές

του υποδοχέα, τις GR α και GR β , οι οποίες διαφέρουν στο C-τελικό τους άκρο [Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006; Kino *et al.*, 2009].



Εικόνα 1.8. Ισομορφές του GR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.

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

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

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

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

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

[Από Oakley and Cidlowski, 2011].

1.5.3.1.1 Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GR α -A

Η κλασική πρωτεΐνη του GR α προέρχεται από την ένωση του τελικού άκρου του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9.

Βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 έδειξαν ότι ο GR α , όπως και οι περισσότεροι NRs, είναι οργανωμένος σε δομικές μονάδες και αποτελείται από τρεις κύριες δομικές περιοχές [Giguere *et al.*, 1986; Carlstedt-Duke *et al.*, 1987; Rusconi and Yamamoto, 1987]. Κάθε μία από αυτές τις

περιοχές εκτελεί μια ξεχωριστή λειτουργία σχετικά με τη ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων και σε ό,τι αφορά τις μεταγραφικές δραστηριότητες του GRα.

Η NH₂-τελική περιοχή των GRs (κατά προσέγγιση τα αμινοξέα 1-417) διαθέτει τη λειτουργία 1 ενεργοποίησης (AF-1), δραστηριότητα που διέπει ένα συστατικό μεταγραφικό ρόλο και αποτελεί στόχο διάφορων πρωτεϊνών αλληλεπίδρασης και κινασών [Hittelman *et al.*, 1999].

Τα αμινοξέα 418-487 αποτελούν την DNA προσδένουσα περιοχή (DBD) του GRα. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι αναδιπλώνεται σε μια διαμόρφωση τύπου δακτύλων ψευδαργύρου που χρησιμεύει στην άμεση ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA [Luisi *et al.*, 1991]. Επιπλέον, διαμορφώνεται μια καλά καθορισμένη μεσόφαση διμερούς, δεδομένου ότι δύο υπομονάδες DBD δεσμεύουν την έλικα του DNA στις παρακείμενες μείζονες αύλακες.

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

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

1.5.3.1.2 Ο GRβ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος

Ο GRβ προκύπτει ως εναλλακτικό προϊόν ματίσματος με το τελικό άκρο του εξονίου 8 να ενώνεται με αλληλουχίες καθοδικά του εξονίου 9. Η πρωτεΐνη του GRβ είναι πανομοιότυπη με την πρωτεΐνη του GRα στα πρώτα 727 αμινοξέα, ενώ διαφοροποιείται κατά μία επιπρόσθετη μη ομόλογη αλληλουχία των 15 αμινοξέων.

Η αλληλουχία που είναι μοναδική για τον GRβ προβλέπεται να προκαλεί μια δομική αλλαγή στον υποδοχέα, προσδίδοντας διάφορες διακριτές ιδιότητες στην ισομορφή. Ο GRβ δεν έχει ικανότητα δέσμευσης γλυκοκορτικοειδών, είναι σταθερά τοποθετημένος στο εσωτερικό του πυρήνα των κυττάρων και δεν δύναται να ρυθμίζει άμεσα τα γονίδια αναφοράς που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή. Σε τυχόν συνέκφρασή του μαζί με τον GRα, το εναλλακτικό μετάγραφο λειτουργεί κυρίως ως αναστολέας του GRα στα γονίδια που ρυθμίζονται τόσο θετικά όσο και αρνητικά από

τα γλυκοκορτικοειδή. Πολλαπλοί μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του συναγωνισμού για πρόσδεση στα GREs, του συναγωνισμού για μεταγραφικούς συν-ρυθμιστές και του σχηματισμού ανενεργών GR α /GR β ετεροδιμερών, έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την ανταγωνιστική δράση που παρατηρείται.

Η ικανότητα του GR β να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του GR α υποδεικνύει ότι τυχόν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την κυτταρική ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Ο GR β εκφράζεται ευρέως στους ιστούς, όπως και ο GR α , αλλά σε γενικές γραμμές βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ό,τι ο GR α . Ωστόσο, σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους όπως τα ουδετερόφιλα και μερικά επιθηλιακά κύτταρα, ο GR β βρίσκεται σε περίσσεια.

Επιπρόσθετα, τυχόν έκθεση των κυττάρων σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και άλλους ανοσολογικούς ενεργοποιητές μπορεί να αυξήσει με επιλεγμένο τρόπο την έκφραση του GR β , οδηγώντας σε αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή [Hauk *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2001; Tliba *et al.*, 2006]. Αντίθετα, παράγοντες που αυξάνουν την έκφραση του GR α έναντι του GR β , ευαισθητοποιούν τα κύτταρα στη δράση γλυκοκορτικοειδών [Goecke *et al.*, 2007]. Μερικοί ασθενείς με ανθεκτικές στα γλυκοκορτικοειδή μορφές άσθματος, ρευματοειδούς αρθρίτιδας, ελκωτικής κολίτιδας, ρινικό πολύποδα, συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και χρόνια λεμφοκυστική λευχαιμία παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα GR β [Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006].

Ένας ευρύτερος ρόλος για τον GR β στην κυτταρική σηματοδότηση και φυσιολογία προέκυψε τα τελευταία χρόνια. Αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης ευρείας κλίμακας έδειξαν ότι ο GR β μπορεί να προαγάγει και να αναστείλει άμεσα ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων τα οποία δεν υπόκεινται σε έλεγχο από τον GR α [Lewis-Tuffin *et al.*, 2007; Kino *et al.*, 2009]. Η ικανότητα του GR β να επάγει σταθερά την αποακετυλίωση ιστονών μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την ανασταλτική του δράση έναντι συγκεκριμένων γονιδίων [Kelly *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2009]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο GR β δεσμεύει τον ανταγωνιστή των γλυκοκορτικοειδών μιφεπριστόνη (RU-486) και αυτή η σύνδεση αποσιωπά την ενεργότητά του σε αρκετά από τα υπό ρύθμιση γονίδια [Lewis-Tuffin *et al.*, 2007]. Αθροιστικά, όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πως ο GR β έχει μια ουσιαστική ρυθμιστική λειτουργικότητα που πιθανόν να συντείνει σε μεταβολές στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών, οι οποίες είναι ανεξάρτητες του ανταγωνισμού του με τον GR α .

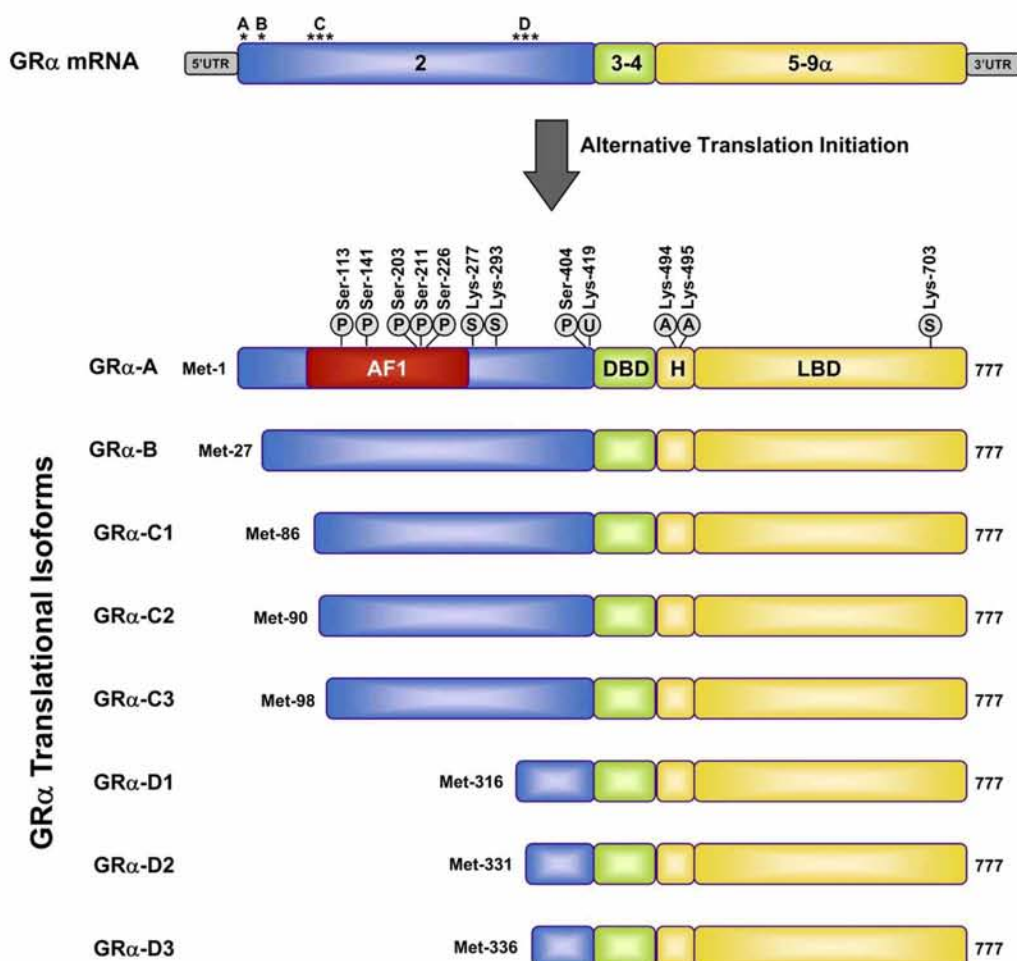
1.5.3.1.3 Ο GRγ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος

Επιπρόσθετες ισομορφές του GR προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα και επηρεάζουν τη σηματοδότηση από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο GRγ διαθέτει μια προσθήκη ενός μοναδικού αμινοξέος Arg μεταξύ των δύο δάκτυλων ψευδαργύρου (zf) της δομικής περιοχής DBD και προέρχεται από τη χρήση μιας θέσης εναλλακτικού τμήματος στο ιντρόνιο που διαχωρίζει τα εξόνια 3 και 4 [Ray *et al.*, 1996]. Αυτή η ευρέως εκφρασμένη ισομορφή προσδένεται στα γλυκοκορτικοειδή και στο DNA με ισχύ παρόμοια με αυτή του GRα, αλλά δεν διαθέτει ικανότητα διέγερσης γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή και παρουσιάζει ένα μεταγραφικό προφίλ που διαφέρει από τον GRα στο επίπεδο των συνηθών ρυθμιζόμενων γονιδίων [Ray *et al.*, 1996; Meijssing *et al.*, 2009]. Η έκφραση του GRγ σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή σε διάφορους κυτταρικούς τύπους [Ray *et al.*, 1996; Rivers *et al.*, 1999; Beger *et al.*, 2003].

1.5.3.1.4 Οι GR-A και GR-P ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος

Σε κύτταρα πολλαπλών μυελωμάτων ανθεκτικά στα γλυκοκορτικοειδή ανακαλύφθηκαν δύο πρωτεΐνες αποτέλεσμα εναλλακτικών μεταγράφων του GR. Δεν προσδένουν ορμόνες καθώς ελλείπονται μεγάλες περιοχές των LBD [Moalli *et al.*, 1993]. Η GR-A ισομορφή προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα που συνδέει το τέλος του εξονίου 4 με την αρχή του εξονίου 8 και υπολείπεται τη μισή αμινοτελική περιοχή του LBD που κωδικοποιείται από τα εξόνια 5-7. Η ισομορφή GR-P υπολείπεται των εξονίων 8 και 9, τα οποία κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό μισό του LBD εξαιτίας ανεπαρκούς ματίσματος στα όρια των εξονίων 7/8. Αν και λίγα είναι γνωστά για τον GR-A, ο GR-P έχει εντοπιστεί σε αρκετούς ιστούς και φαίνεται να είναι η επικρατέστερη εναλλακτική μορφή υποδοχέα σε αρκετά καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή [Gaitan *et al.*, 1995; Krett *et al.*, 1995; de Lange *et al.*, 2001]. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, ο GR-P φάνηκε είτε να αναστέλλει είτε να διεγείρει τη μεταγραφική ενεργότητα του GRα σε γονίδια που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [de Lange *et al.*, 2001].

1.5.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης



Εικόνα 1.9. Απεικονίζονται οι ισομορφές του GRα που δημιουργούνται από εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης καθώς και οι θέσεις εν δυνάμει μετα-μεταφραστικής του τροποποίησης. Η έναρξη της μετάφρασης από 8 διαφορετικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (AUG) σε ένα μοναδικό mRNA του GRα δημιουργεί ισομορφές του υποδοχέα με προοδευτικά βραχύτερα αμινοτελικά άκρα (NTDs). Οι κατά προσέγγιση τοποθεσίες των κωδικονίων έναρξης AUG στις αλληλουχίες του εξονίου 2 του mRNA του GRα σημειώνονται με αστερίσκους. Σημειώνονται επίσης οι εναρκτήριες μεθειονίνες (Met), η περιοχή AF1 (αμινοξέα 77-262) και θέσεις μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (P=φωσφορυλίωση, S=SUMO-λίωση, U=ουβικιτινίωση και A=Ακετυλίωση). [Από Oakley and Cidlowski, 2011].

Πέρα από την ύπαρξη διακριτών ισομορφών GR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, είναι επίσης δυνατό να παραχθούν διαφορετικές μορφές της πρωτεΐνης του υποδοχέα από εναλλακτική μετάφραση του mRNA ενός υποτύπου GR [Yudt and Cidlowski, 2001; Lu and Cidlowski, 2005].

Η στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών των γονιδίων GRs από άνθρωπο, μαϊμού, αρουραίο και ποντικό έδωσε 8 συντηρημένα εσωτερικά κωδικόνια έναρξης AUG τα οποία προέρχονται από το εξόνιο 2 και δείχτηκε πως παράγουν 8 GRα ισομορφές με προοδευτικά βραχύτερα άκρα NTDs (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-

C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2, and GR α -D3). Κάθε ένα από τα διαφορετικής εκδοχής προϊόντα ματίσματος του GR (GR β , GR γ , GR-A, and GR-P) αναμένεται επίσης να δίνει γένεση σε μεταφραστικές ισομορφές που έχουν συμπληρωματική δράση (Εικόνα 1.9). Ο GR α -A είναι ο κλασσικός ανθρώπινος υποδοχέας μήκους 777 aa που προκύπτει από το πρώτο κωδικόνιο ενάρξεως.

Η σημαντικότερη διαφορά των ισομορφών του GR έγκειται στα προφίλ των γονιδίων που ρυθμίζουν. Κάθε μεταφραστική ισομορφή του GR α διαθέτει ένα μοναδικό γενετικό αποτύπωμα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα προσδιορισμού της κυτταρικής απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή βάσει των υποτύπων του υποδοχέα που εκφράζονται και των δράσεων αυτών. Οι ισομορφές του υποδοχέα παρουσιάζουν μια εκτεταμένη κατανομή στους ιστούς, αλλά τα σχετικά επίπεδά τους διαφέρουν τόσο στο εσωτερικό όσο και αναμεταξύ των ιστών [Lu and Cidlowski, 2005].

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν χρονο-εξαρτώμενες και σηματο-εξαρτώμενες αλλαγές στο κυτταρικές συμπληρωματικές δράσεις των μεταφραστικών ισομορφών του GR α [Wang *et al.*, 2009].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα σχετικά επίπεδα των υποτύπων του GR α που εκφράζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο βρέθηκε να τροποποιούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαδικασίας της γήρανσης [Sinclair *et al.*, 2011]. Οι μοριακοί μηχανισμοί που καθοδηγούν το ποιες μεταφραστικές ισομορφές θα εκφραστούν δεν έχει ακόμη κατανοηθεί.

Η ύπαρξη πολυμορφισμών στο γονίδιο του GR, καθώς επίσης και η ετερογένεια στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA του GR α έχει αναφερθεί πως επηρεάζει την ικανότητα χρήσης εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης [Pedersen *et al.*, 2004, Russcher *et al.*, 2005]. Επιπλέον, οι αλλαγές στα σχετικά επίπεδα των υποτύπων του GR α μπορεί να προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οι οποίες δύνανται να επηρεάζουν διαφορετικά το χρόνο ημισείας ζωής του υποδοχέα.

Βάσει των παραπάνω υποδηλώνεται πως η εναλλακτική μετάφραση μπορεί να είναι ένας κοινός μηχανισμός μέσω του οποίου οι στεροειδείς υποδοχείς επιτυγχάνουν τις διαφορετικές σηματοδοτικές αποκρίσεις.

1.5.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Κάθε ξεχωριστή ισομορφή του GR υπόκειται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικόνα 1.9) που ρυθμίζουν περαιτέρω την ενεργότητα του υποδοχέα και επεκτείνουν το λειτουργικό απόθεμα των υποδοχέων που είναι ικανοί για σηματοδότηση μέσω γλυκοκορτικοειδών.

Η φωσφορυλίωση ήταν η πρώτη ομοιοπολική τροποποίηση του GR που ανακαλύφθηκε και αποτέλεσε το επίκεντρο αρκετών μελετών [Kumar and Calhoun, 2008; Beck *et al.*, 2009; Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009]. Τουλάχιστον 6 αμινοξέα σερίνης (Ser-113, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226, and Ser-404) είναι δυνατό να φωσφορυλιωθούν στον ανθρώπινο GR α , με τις θέσεις φωσφορυλίωσης να είναι συντηρημένες τόσο στους ποντικούς όσο και στους επίμυες [Wang *et al.*, 2002; Avenant *et al.*, 2010]. Οι κύριες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον GR α είναι οι MAPKs, οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και η κινάση-3 της συνθάσης του γλυκοκογόνου (glycogen synthase kinase-3, GSK-3).

Επιπλέον, ο GR α εξυπηρετεί ως υπόστρωμα για μια ποικιλία άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ο υποδοχέας ουβικουιτινώνεται [Wang and DeFranco, 2005] σε ένα συντηρημένο αμινοξύ Lys που εδράζεται στο μοτίβο αποικοδόμησης PEST (αλληλουχίες πλούσιες στα αμινοξέα P, E, S, T) στο τέλος της περιοχής NTD και αυτή η τροποποίηση στοχεύει τον υποδοχέα για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα [Wallace and Cidlowski, 2001; Deroo *et al.*, 2002]. Μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο αμινοξύ Lys εμποδίζει την προσδετο-εξαρτώμενη μειορρύθμιση του GR α και ενισχύει τη μεταγραφική του ενεργότητα σε γονίδια αναφοράς [Wallace and Cidlowski, 2001].

Ο GR α προσφέρεται επίσης ως υπόστρωμα για σουμολίωση, όπου τα πεπτίδια SUMO (small ubiquitin-related modifier) προσαρτώνται ομοιοπολικά στον υποδοχέα σε συγκεκριμένα αμινοξέα λυσίνης (Lys-277, Lys-293 και Lys-703) [Iñiguez-Lluhí and Pearce, 2000; Le Drean *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2002; Holmstrom *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2008; Holmstrom *et al.*, 2008]. Επιπλέον, τελευταίες αναφορές έχουν αναδείξει ότι ο GR α ακετυλιώνεται στα αμινοξέα Lys-494 και Lys-495 σε απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή και αυτή του η τροποποίηση εξασθενίζει τον ανταγωνισμό του έναντι του NF- κ B [Ito *et al.*, 2006].

Γενικότερα, είναι ξεκάθαρο πως ό,τι αφορά τη λειτουργικότητα του GRa μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, εφοδιάζοντας τα κύτταρα με επιπρόσθετη ετερογένεια υποδοχέων για τον έλεγχο των αποκρίσεων στα γλυκοκορτικοειδή και τη σύνδεση των δράσεων του GRa με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Το σε ποιο βαθμό όμως οι διάφορες ισομορφές (προερχόμενες είτε από εναλλακτικό μάτισμα είτε από εναλλακτική μετάφραση) του GR υπόκεινται σε τέτοιες τροποποιήσεις και ρυθμίζονται από αυτές απομένει να διερευνηθεί.

1.6 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο μη συνδεδεμένος με προσδέτη GR εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως μέρος ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου που συμπεριλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς όπως η συνοδός πρωτεΐνη HSP90 [Pratt and Toft 1997; Grad and Picard, 2007].

Η δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών προκαλεί μια αλλαγή διαμόρφωσης στον GR, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή του από το ετεροσύμπλοκο, την έκθεση των σημάτων πυρηνικής τοποθέτησης και την είσοδο εντός του πυρήνα διαμέσου των ιμπορτινών [Freedman and Yamamoto, 2004].

Εντός του πυρήνα, ο GR διμερίζεται και συνδέεται άμεσα σε αλληλουχίες GREs επάγοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων [Beato, 1989; Freedman, 1992]. Εναλλακτικά, ο υποδοχέας συνδέεται με τα λιγότερο μελετημένα αρνητικά GREs (negative GREs, nGREs) για την καταστολή της γονιδιακής ενεργοποίησης [Dostert and Heinzl, 2004].

Μετά τη δέσμευση στα GREs, ακολουθούν αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα που οδηγούν σε μια συντονισμένη στρατολόγηση συν-ρυθμιστικών μορίων και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που επηρεάζουν την ενεργότητα της RNA πολυμεράσης II και ρυθμίζουν το ρυθμό της μεταγραφής γονιδίων [Jenkins *et al.*, 2001; Rosenfeld and Glass 2001; Lonard and O'Malley, 2005]. Τόσο η φύση του συνδεδεμένου προσδέτη όσο και οι αλληλουχίες GREs από μόνες τους μπορούν να καθοδηγήσουν την ειδική συναρμολόγηση και λειτουργία συμπαραγόντων διαμέσου αλλαγών στη διαμόρφωση του υποδοχέα [Meijsing *et al.*, 2009; Ronacher *et al.*, 2009]. Ο υποδοχέας αλληλεπιδρά μόνο για σύντομα χρονικά διαστήματα με τα γονίδια στόχους του, αποσυνδεόμενος και επανασυνδεόμενος γρήγορα στις αλληλουχίες GREs, ώστε να επιτρέπεται η αλληλεπίδραση του GR με ένα μεγάλο αριθμό πιθανών

θέσεων δέσμευσης και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών [McNally *et al.*, 2000; Stavreva *et al.*, 2004].

Ο GR μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση με τη φυσική του αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση του GR με τους προφλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 (activator protein-1) και NF-κB αναστέλλει την ενεργότητά τους, ερμηνεύοντας τις κύριες αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών [Necela and Cidlowski, 2004; Newton and Holden, 2007]. Σε μερικά γονίδια αυτή η αναστολή μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο από την πρόσδεση του GR στις πρωτεΐνες που προσδέουν στο DNA, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις γονιδίων που απαιτούν από τον GR να δράσει με έναν συνεργιστικό τρόπο και να προσδεθεί τόσο στα GREs αλλά και σε μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αντίθεση με αυτές τις ανασταλτικές δράσεις, η φυσική αλληλεπίδραση του GR με μέλη της οικογένειας των STAT (signal transducer and activator of transcription) πρωτεϊνών, είτε ξέχωρα είτε συνδεδεμένα με GREs, μπορεί να προαγάγει τη μεταγραφική ενεργότητα συγκεκριμένων γονιδίων [Rogatsky and Ivashkin, 2006].

Αν και οι διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα των προσδεμάτων, τα επίπεδα έκφρασης του GR και η διαθεσιμότητα συμπαραγόντων συνεισφέρουν στις ιστοειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν πως η ετερογένεια των GRs ίσως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του προφίλ σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών.

1.7 Βιολογικές επιδράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

1.7.1 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και μιτοχόνδρια

Οι φυσιολογικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών δεν περιορίζονται στη δράση του ως πυρηνικός υποδοχέας, αλλά επιπλέον έχουν εντοπιστεί και λειτουργικοί υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [Solakidi *et al.*, 2007; Psarra and Sekeris, 2008a,b, 2009].

Η παρουσία των υποδοχέων τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια μαρτυρεί μια άμεση αλληλεπίδραση των δύο οργανιδίων σε ό,τι αφορά τις κοινές τους μεταβολικές διεργασίες που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή. Για παράδειγμα, διασφαλίζεται η συντονισμένη παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) της αναπνευστικής αλυσίδας, δεδομένου ότι για το σχηματισμό των

ολοένζυμων συστατικών στοιχείων της, που θα δώσουν ενεργά αναπνευστικά σύμπλοκα, απαιτούνται γονίδια που προέρχονται και από τα δύο γονιδιώματα.

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια ζωτικής σημασίας, τα οποία συμμετέχουν σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. Ενέχονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, αποτελούν βασικά συστατικά της απόκρισης στο στρες, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), συμμετέχουν στην ανοσορρύθμιση, στη κυτταρική διαφοροποίηση και στη διαδικασία της γήρανσης [Psarra *et al.*, 2006a].

Η σημαντικότερη ίσως λειτουργία των μιτοχονδρίων αναγνωρίζεται στη συνεισφορά τους σε ό,τι αφορά τον ενεργειακό μεταβολισμό. Μέσω του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) της αναπνευστικής αλυσίδας είναι δυνατό να καλύψουν περισσότερο από το 90 % των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων σε ATP. Το μιτοχόνδριο χρησιμεύει σαν ένας αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου και ανάλογα με αυτές επιτυγχάνει διάφορα επίπεδα ρύθμισης προσαρμόζοντας μεταξύ άλλων τη λειτουργία των ενζύμων της OXPHOS. Όταν οι ενεργειακές ανάγκες δεν επαρκούν, αυξάνει την απόδοση σε ATP μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης της OXPHOS της αναπνευστικής αλυσίδας [Psarra *et al.*, 2006 a,b].

Τα ένζυμα της OXPHOS είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας, με τις υπομονάδες τους να κωδικοποιούνται τόσο από πυρηνικά όσο και από μιτοχονδριακά γονίδια. Ως εκ τούτου, ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω ολοκλήρωσης και συντονισμού των λειτουργιών τους με εκείνες του πυρήνα των κυττάρων, αλλά και άλλων οργανιδίων και του κυτταροπλάσματος [Scheller *et al.*, 2000; Psarra *et al.*, 2006a, 2006b].

Σε περιπτώσεις ορμονικής επαγωγής, οι διαδικασίες που ακολουθούν απαιτούν κατανάλωση περισσότερης ενέργειας, οπότε το κύτταρο κάνει προσπάθειες ώστε να εξασφαλίσει την αναπλήρωση των ενεργειακών αποθεμάτων. Αυτό γίνεται με αυξημένη βιοσύνθεση των ενζύμων της OXPHOS ή/και με μιτοχονδριακή βιογένεση, μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS και της αύξησης της διαθεσιμότητας των γονιδίων.

Αρκετές δημοσιεύσεις αναφέρονται στις επαγωγικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στη μεταγραφή πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS σε διάφορα όργανα όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, ο νεφρός και ο εγκέφαλος [για άρθρο ανασκόπησης: Psarra and Sekeris, 2008b].

Η επαγωγή από τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να γίνει με άμεση ενεργοποίηση πυρηνικών γονιδίων OXPHOS που διαθέτουν GREs στη ρυθμιστική τους περιοχή ή έμμεσα, με επαγωγή πυρηνικών γονιδίων που φέρουν GREs και κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. NRF1 και NRF2) απαραίτητους για τη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων OXPHOS. Επιπλέον, οι ίδιοι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επάγουν την έκφραση πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες (TFAM, TFB1M, TFB2M). Αυτοί, με μετατόπισή τους στα μιτοχόνδρια, θα ενεργοποιήσουν μετέπειτα την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS κι έτσι εξασφαλίζεται με αυτό τον τρόπο ο απαραίτητος συντονισμός της μεταγραφής γονιδίων της OXPHOS από τη δράση ορμονών στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Η παρουσία στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αλληλουχιών όμοιων με τα πυρηνικά GREs [Demonacos *et al.*, 1995; Tsiriyotis *et al.*, 1997] και ο εντοπισμός υποδοχέων στεροειδών ορμονών στα οργανίδια αυτά υπέδειξε την ύπαρξη ενός επιπλέον άμεσου μηχανισμού για την επαγωγή των μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS και τη βιοσύνθεση του OXPHOS [Psarra and Sekeris, 2008a,b, 2009, 2011]. Η άμεση επίδραση των μιτοχονδριακών υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στη μιτοχονδριακή επαγωγή έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες [Demonacos *et al.*, 1995; Tsiriyotis *et al.*, 1997; Sionov *et al.*, 2006a, 2006b; Psarra and Sekeris, 2011].

1.7.2 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει και ρυθμίζει ποικιλία φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών και βιολογικών μονοπατιών ασκώντας τη δράση του είτε ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας, είτε δρώντας άμεσα ή έμμεσα στο μιτοχονδριακό γένωμα.

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες παραγράφους, μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες στην οποία εμπλέκεται είναι ο έλεγχος του ενεργειακού μεταβολισμού μέσω της επαγωγής ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Σημαντική ωστόσο είναι και η εμπλοκή του στη μεταγραφική ρύθμιση ενζύμων της γλυκονεογένεσης.

Η επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή σύνθεση ενζύμων της γλυκονεογένεσης, μεταξύ αυτών και της PEPCK, είναι μια σημαντική διαδικασία για

τη μακροχρόνια συντήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης κατά τη στρεσογόνο περίοδο στα σπονδυλωτά [Hanson and Reshef, 1997]. Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ενεργειακής ισορροπίας [La Fleur, 2006].

Η γλυκόζη χρησιμεύει ως μία από τις κύριες πηγές ενέργειας στο ανθρώπινο σώμα και ειδικά στον εγκέφαλο. Σε ένα ζωντανό οργανισμό, το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος, ελέγχοντας την ισορροπία μεταξύ της πρόσληψης γλυκόζης από το ήπαρ και της παραγωγής γλυκόζης από το ίδιο όργανο. Η ρύθμιση αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατάσταση της διατροφής του οργανισμού.

Εάν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι μεγαλύτερα από ό,τι χρειάζεται για τον κυτταρικό μεταβολισμό, η περίσσεια της γλυκόζης αποθηκεύεται υπό τη μορφή γλυκογόνου ή συντίθεται λίπος. Η ινσουλίνη και η γλυκόζη δρουν συνεργιστικά στην προώθηση της έκφρασης γονιδίων που χρησιμεύουν στη δέσμευση γλυκόζης και στη σύνθεση λιπαρών οξέων.

Αντίθετα, σε περιπτώσεις μειωμένης πρόσληψης υδατανθράκων τα αποθέματα γλυκογόνου καταβολίζονται για να δώσουν γλυκόζη, ενώ παράλληλα όταν η πρόσληψη υδατανθράκων είναι μειωμένη για μεγάλο διάστημα, απαιτείται η παραγωγή γλυκόζης, ώστε η συγκέντρωσή της να διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Αυτό δύναται να γίνει με προώθηση της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης.

Η γλυκονεογένεση αναφέρεται στο μεταβολικό μονοπάτι όπου μόρια γλυκόζης συντίθενται από μη υδατανθρακικά πρόδρομα μόρια, όπως το γαλακτικό, τα αμινοξέα και η γλυκερόλη. Ρυθμίζεται από την ενεργότητα τριών ενζύμων: της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), της φωσφοφρουκτοκινάσης και της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase). Δεν έχουν όλοι οι κυτταρικοί τύποι τη δυνατότητα της γλυκονεογένεσης, ενώ η όλη διαδικασία έχει μελετηθεί εκτενέστερα κυρίως σε ό,τι αφορά τους φυσιολογικούς ρόλους της PEPCK.

1.8 Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού

Η PEPCK καταλύει ένα περιοριστικό βήμα του ρυθμού της γλυκονεογένεσης, συνεπώς η ενεργότητα του ενζύμου καθορίζει το ποσό της γλυκόζης που δύναται να παραχθεί. Γι' αυτό, τόσο το γονίδιο όσο και η πρωτεΐνη της PEPCK φαίνεται να

υπόκεινται σε ρύθμιση από ένα αριθμό διάφορων φυσιολογικών καταστάσεων. Ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, το ποσό της πρωτεΐνης της PEPCK αυξάνεται ή μειώνεται δραματικά, με την κυτταροπλασματική ισομορφή του ενζύμου να είναι αυτή που ποικίλλει περισσότερο σε έκφραση.

Η κυριότερη ρύθμιση στην οποία υπόκειται η PEPCK πραγματοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο. Η μεταγραφή του γονιδίου της PEPCK αυξορρυθμίζεται από διάφορα φυσιολογικά σήματα, συμπεριλαμβανομένων ορμονών, την τιμή του ενδοκυτταρικού pH, τη μερική πίεση του οξυγόνου και πιθανότατα ακόμα και από τη γλυκόζη ή κάποιον από τους μεταβολίτες της. Ένα δίκτυο από ρυθμιστικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των HNF4α, GR, FoxO1 και PGC1-α, δείχτηκε πως συνεργάζονται στη ρύθμιση της έκφρασης της PEPCK σε κατάσταση δίαιτας.

Η μεταγραφή της PEPCK έχει μελετηθεί εκτενώς σε ιστούς όπως το ήπαρ, οι νεφροί και ο λιπώδης ιστός. Πιο πρόσφατα έχει παρατηρηθεί ενδιαφέρον και για την έκφρασή της στους πνεύμονες και στο έντερο. Παρ' όλα αυτά, ελάχιστα είναι γνωστά για τη μεταγραφική της ρύθμιση στον εγκέφαλο.

Οι ορμόνες που ελέγχουν τη μεταγραφή της PEPCK είναι η γλυκαγόνη, τα γλυκοκορτικοειδή (τόσο τα φυσικά στεροειδή όπως η κορτιζόλη, όσο και τα συνθετικά στεροειδή όπως η δεξαμεθαζόνη), οι ορμόνες του θυρεοειδούς και το ρετινοϊκό οξύ, παρουσιάζοντας μια ισχυρή γλυκονογενετική δράση. Η γλυκαγόνη αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού cAMP, το οποίο αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της PEPCK, δρώντας μέσω ενός στοιχείου που αποκρίνεται στο cAMP (cAMP Response Element, CRE). Το “αποκρινόμενο στοιχείο” αναφέρεται σε ένα τμήμα του DNA ανοδικά της κωδικής περιοχής για την πρωτεΐνη PEPCK, που αυξάνει τη μεταγραφή όταν κατάλληλος συνδυασμός μορίων cAMP και συνδετικών πρωτεϊνών παρίστανται στον πυρήνα. Παρομοίως, οι στεροειδείς ορμόνες δρουν μέσω ενός στοιχείου που αποκρίνεται στα γλυκοκορτικοειδή (GRE), το οποίο εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της PEPCK.

Η PEPCK είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των λυασών. Υπάρχουν δύο ισομορφές του ενζύμου PEPCK: η μιτοχondριακή (PEPCK-M) και η κυτταροπλασματική (PEPCK-C) [Nordlie and Lardy, 1963], που κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά πυρηνικά γονίδια, το *Pck-1* και το *Pck-2* αντίστοιχα [Hanson, 2009]. Οι δύο ισομορφές επιδεικνύουν 70 % νουκλεοτιδική ομοιότητα μεταξύ των ανθρώπων και των επιμύων με τους ποντικούς και 62 % με την όρνιθα.

Το σχετικό ποσό των ενζύμων PEPCK-C και PEPCK-M στο ήπαρ διαφορετικών ειδών διαφέρει. Στο ήπαρ των ποντικών και των επιμύων, η PEPCK-C καταλαμβάνει το 95 % του ολικού ενζύμου, ενώ το ήπαρ των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών διαθέτει ίσες ποσότητες των δύο ισομορφών [Hanson, 2009].

Τόσο η PEPCK-C όσο και η PEPCK-M συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης, καταλύοντας την αντιστρεπτή εξαρτώμενη από GTP (ή ITP) αποκαρβοξυλίωση και μετατροπή του οξαλοξικού σε φωσφοενολ-πυροσταφυλικό [Hod *et al.*, 1986], ελευθερώνοντας CO₂ και ADP. Η PEPCK-C είναι γενικότερα αποδεκτή ως η κύρια ισομορφή που εμπλέκεται στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης, αν και ο ρόλος της στην ομοιόσταση της γλυκόζης δεν έχει αποσαφηνισθεί εντελώς [Burgess *et al.*, 2007; Samuel *et al.*, 2009].

Ακόμη λιγότερα είναι γνωστά για τη λειτουργία και τη ρύθμιση της PEPCK-M [Yang *et al.*, 2009]. Πιστεύεται ότι η αντίδραση παραγωγής φωσφοενολ-πυροσταφυλικού (PEP) από γαλακτικό στα μιτοχόνδρια, που καταλύεται από την PEPCK-M, βοηθάει στη διατήρηση της αναγωγικής ισορροπίας [Yang *et al.*, 2009]. Η PEPCK-M εκφράζεται ιδιосύστατα στα ενήλικα ζώα [Hanson and Reshef, 1997], αλλά η έκταση της συνεισφοράς της στη γλυκονεογένεση ή η ρύθμισή της από σήματα που προέρχονται από την τροφή δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί [Agca *et al.*, 2002]. Ο Start και οι συνεργάτες του [2009] έχουν προτείνει ένα πιθανό ρόλο της PEPCK-M σε ό,τι αφορά την έκκριση ινσουλίνης.

Έχει αποδειχτεί πως τα δύο ένζυμα ρυθμίζονται ανεξάρτητα. Σε κύριο λόγο, τα επίπεδα της PEPCK-C ελέγχονται από μεταγραφικές τροποποιήσεις ως απόκριση σε σήματα που προέρχονται από ορμόνες ή τη διατροφή [Hanson and Reshef, 1997; Chakravarty *et al.*, 2005].

Μεγάλη σημασία έχει αρχίσει να δίνεται και σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της PEPCK. Έχει αναφερθεί ότι αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης [Walker *et al.*, 2002] και ακετυλίωσης [Lin *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010]. Επιπλέον, η ακετυλίωση της PEPCK-C φαίνεται να προάγει την διάσπασή της μέσω πρωτεόλυσης [Jiang *et al.*, 2011]. Επιπρόσθετα, και οι δύο μορφές της PEPCK επιδέχονται ADP-ριβοσυλίωση [Diani-Moore *et al.*, 2013].

Εκτός από τη σημαντική συνεισφορά της στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, η PEPCK έχει μια πιο ευρεία μεταβολική λειτουργία αφού εμπλέκεται και στην καταπλήρωση των ενδιάμεσων προϊόντων που προκύπτουν από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (απομάκρυνση των ανιόντων), η οποία απαιτείται τόσο στη

γλυκονεογένεση όσο και στη γλυκερονεογένεση [Owen *et al.*, 2002]. Σε ιστούς οι οποίοι δεν παράγουν γλυκόζη, αλλά το ένζυμο παρίσταται λειτουργικά ενεργό θεωρείται πως καταλύει τις διαδικασίες της γλυκερονεογένεσης και της καταπλήρωσης [Reshef *et al.*, 1970; Hahn and Novak, 1975; Tannen, 1978; Zimmer and Magnuson, 1990; Owen *et al.*, 2002; Burgess *et al.*, 2004; Stark *et al.*, 2009].

Σχετικά πρόσφατα έχει αναφερθεί ο συσχετισμός του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 με τον υποκινητή του γονιδίου της PEPCK [Charest-Marcotte *et al.*, 2010].

1.9 Ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1

1.9.1 Γενικά για τον Prox1

Ο Prox1 είναι μέλος της οικογένειας των ομοιοτικών γονιδίων, οι οποίοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Τα ομοιοτικά γονίδια είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη, καθώς ρυθμίζουν αρκετά διαφορετικά γεγονότα κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Εντοπίζονται πρακτικά σε κάθε ευκαρυωτικό οργανισμό, είναι υψηλά συντηρημένα κατά την εξέλιξη και υπολογίζεται πως υπάρχουν ~200 ομοιοτικά γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα [Stein *et al.*, 1996; Tupler *et al.*, 2001].

Οι ομοιοτικοί παράγοντες είναι μεταγραφικοί ρυθμιστές (ενεργοποιητές ή καταστολείς) των οποίων η ενεργότητα διαμεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις με το DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες. Η μεταγραφική τους λειτουργία εξαρτάται ισχυρά από παράγοντες όπως τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τον κυτταρικό τους εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (τα οποία επάγουν την ειδικότητα και τη συγγένεια δέσμευσης στο DNA) [Abate-Shen *et al.*, 2002].

Οι ομοιοτικές πρωτεΐνες είναι γνωστές για το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου και την ανάπτυξη του σώματος. Αρκετά ομοιοτικά γονίδια αποτελούν στόχους χρωματοσωματικής μετατόπισης σε κακοήθεις όγκους και πιστεύεται ότι είναι εν δυνάμει ογκογονίδια. Τυχόν απορρύθμιση τέτοιων ομοιοτικών γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση στο όργανο-στόχο.

Το ομοιοτικό γονίδιο *Prox1* συγγενεύει με το γονίδιο *Prospero* στην *Drosophila melanogaster*, το οποίο διαμεσολαβεί σε αποφάσεις κυτταρικού καθορισμού στους νευροβλάστες [Hong and Detmar, 2003]. Έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα και ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο εντοπίζεται, ο Prox1

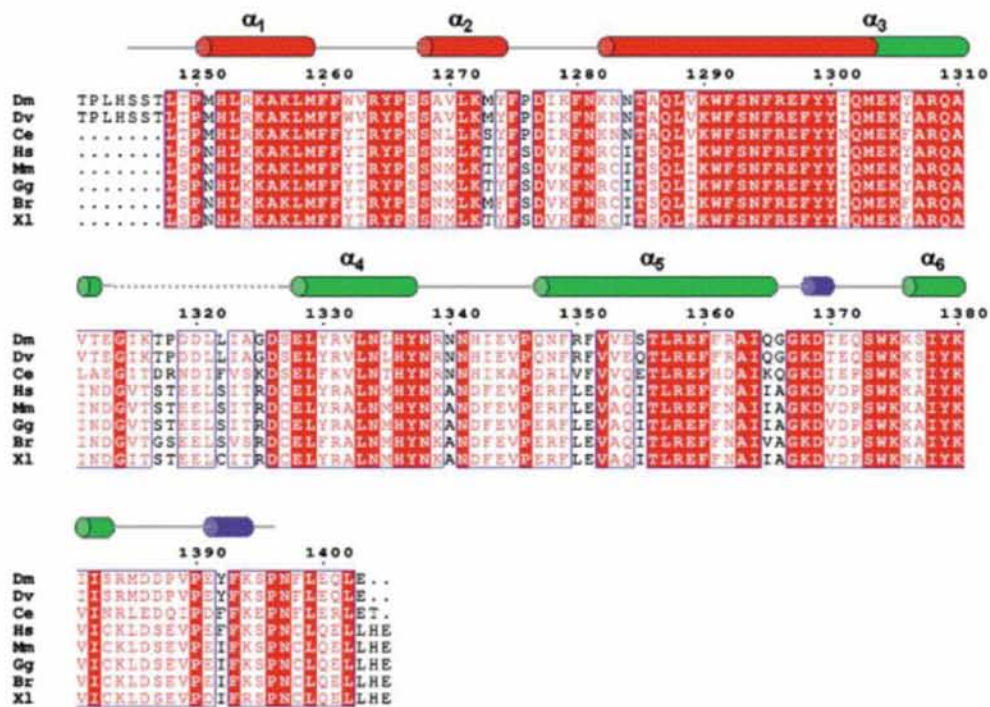
μπορεί να δράσει είτε ως ένας μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως ένας μεταγραφικός συγκαταστολέας.

1.9.2 Η δομή του Prox1

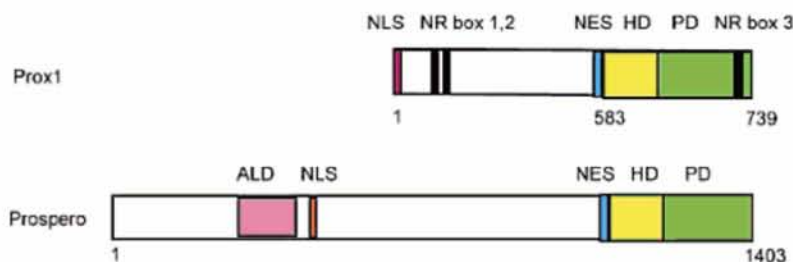
Το γονίδιο *Prox1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 737 αα σε μήκος και έχει μοριακό βάρος ίσο με 84 kDa.

Το γονίδιο του *Prox1* περιλαμβάνει αρκετές υποτιθέμενες λειτουργικές περιοχές, με κυριότερη την ομοιοεπικράτεια αλληλεπίδρασης με το DNA. Σε γενικές γραμμές η πρωτεΐνη διαθέτει ένα NH₂-τελικό σήμα πυρηνικού εντοπισμού, τρία πεπτιδικά μοτίβα «κουτιά πυρηνικών υποδοχέων», ένα σήμα εξόδου από τον πυρήνα και μία υψηλά συντηρημένη C-τελική επικράτεια που περιέχει μία αποκλίνουσα ομοιοεπικράτεια και μία νέα επικράτεια Prospero [Burglin, 1994; Tomarev *et al.*, 1998].

Μια πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών των αμινοξέων της C-τελικής περιοχής των πρωτεϊνών Prospero/Prox1 φαίνεται στην Εικόνα 1.10, ενώ στην Εικόνα 1.11 αναπαρίσταται η δομή των επικρατειών του Prox1.



Εικόνα 1.10. Η πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών των αμινοξέων της C-τελικής περιοχής των πρωτεϊνών Prox1/Prospero από διάφορα είδη έδειξε σημαντική συντήρηση (φαίνεται με κόκκινο). Οι άλφα έλικες αριθμούνται ως α1-α6. Με κόκκινο χρώμα χράζονται σημειώνεται η ομοιοεπικράτεια, με πράσινο η επικράτεια Prospero και με μπλε οι έλικες 3. Οι αλληλουχίες συμπεριλαμβάνουν περίπου 160 αμινοξέα από την *Drosophila melanogaster* (Dm, αμινοξέα 1241-1403) *Drosophila virilis* (Dv, αμινοξέα 1394-1556), *Ceanorhabditis elegans* (Ce, αμινοξέα 430-586), *Xenopus laevis* (Xl, αμινοξέα 583-740), *Zebrafish* (Br, αμινοξέα 582-739), όρνιθα (Gg, αμινοξέα 579-736), ποντικός (Mm, αμινοξέα 580-737) και άνθρωπος (Hs, αμινοξέα 579-736). Η αρίθμηση στο σχήμα έγινε βάσει της αλληλουχίας από την *D. melanogaster*. [Ανατύπωση από Jodi M. Ryter *et al.*, 2002].



Εικόνα 1.11. Σύγκριση των δομών του Prox1 και της Prospero. Μοιράζονται στο C-τελικό τους άκρο τις υψηλά συντηρημένες δομές: επικράτεια Prospero και ομοιοεπικράτεια. Ο Prox1 διαθέτει ένα αμινοτελικό σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), στην καρβοξυτελική του περιοχή έχει μια καρβοξυτελική ομοιοεπικράτεια (HD), μια επικράτεια Prospero (PD) και ένα σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES), μαζί με τρία κουτιά πυρηνικού υποδοχέα (NR 1-3). Όπου ALD=επικράτεια ασύμμετρου εντοπισμού (άτυπη επικράτεια). [Από τη διδακτορική διατριβή του δρ Xiaoren Chen, 2007].

Το NH₂-τελικό άκρο του Prox1 περιλαμβάνει δύο κουτιά (boxes) πυρηνικού υποδοχέα (NR), με γενικό πεπτιδικό μοτίβο: I/LXXLL, όπου “L” είναι το αμινοξύ λευκίνη, “I” για το αμινοξύ ισολευκίνη και “X” για οποιοδήποτε αμινοξύ. Τα NR boxes χρησιμεύουν για την αλληλεπίδραση του Prox1 με την περιοχή σύνδεσης προσδέτη (LBD) των πυρηνικών υποδοχέων. Στην ίδια περιοχή εντοπίζεται επίσης ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού NLS και η ομοιοεπικράτεια prospero 1.

Η COOH-τελική περιοχή του Prox1 είναι η περισσότερο συντηρημένη εξελικτικά περιοχή της πρωτεΐνης. Στο ακραίο της τμήμα (αμινοξέα 733-737) εντοπίζεται μία δομή NR box με μοτίβο πεπτιδικής αλληλουχίας LQELL. Διαθέτει επίσης μία άτυπη ομοιοεπικράτεια και μία συνοριακή πρωτεϊνική ομοιοεπικράτεια που θυμίζει την prospero (prospero-like domain) [Demidenko *et al.*, 2001; Ryter *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 2003; Nishijima and Ohtoshi, 2006; Elsir *et al.*, 2012]. Η ομοιοεπικράτεια Prospero (homeo-Prospero domain ή HDPD) του Prox1 είναι αρκετά συντηρημένη ανάμεσα στα περισσότερα σπονδυλωτά, αποτελείται από ~60 αμινοξέα και χρησιμεύει στην πρόσδεση στο DNA [Gehring *et al.*, 1994].

Η ομοιοεπικράτεια είναι ένα κοινό δομικό μοτίβο που συναντάται σε αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες. Χαρακτηρίζεται από 3 α-έλικες, με τις δύο από αυτές να είναι παράλληλες μεταξύ τους, ενώ η τρίτη τοποθετείται διαγώνια στις δύο σχηματίζοντας μια αναδίπλωση έλικα-θηλιά-έλικα-στροφή-έλικα. Η τρίτη έλικα καλείται «έλικα αναγνώρισης» και διαθέτει μία θέση αναγνώρισης DNA. Είναι η πιο συντηρημένη περιοχή και συνδέεται άμεσα στη διπλή έλικα του DNA, με εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεΐνης στη μείζονα αύλακα [Gruschus *et al.*, 1997]. Η θηλιά που ενώνει τις έλικες I και II συνδέεται με το φωσφορικό σκελετό του DNA σταθεροποιώντας περαιτέρω την όλη αλληλεπίδραση [Gehring *et al.*, 1994; Yousef and Matthews, 2005].

Αν και η ομοιοεπικράτεια του Prox1 δεν μοιράζεται σημαντικές ομοιότητες αλληλουχίας με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ομοιοεπικρατειών, φαίνεται πως είναι δυνατό να αναδιπλωθεί με τον ίδιο ακριβώς τρόπο [Banerjee-Basu *et al.*, 1999]. Αυτή η πρόβλεψη επιβεβαιώθηκε με την ολοκλήρωση της δομής τριών διαστάσεων της Prospero, η οποία υιοθετεί μια διαμόρφωση άτυπης ομοιοεπικράτειας. [Ryter *et al.*, 2002; Yousef and Matthews, 2005]. Η αντίστοιχη δομή για τον Prox1 δεν έχει ακόμη επιλυθεί.

Η τρισδιάστατη δομή της Prospero έδειξε πως η πρωτεϊνική επικράτεια Prospero μπορεί να δημιουργήσει επιπρόσθετες συνδέσεις με το DNA. Επίσης, λειτουργεί καλύπτοντας ένα σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal, NES) εντός της ομοιοεπικράτειας [Yousef and Matthews, 2005], με αποτέλεσμα τον πυρηνικό εντοπισμό της πρωτεΐνης.

1.9.3 Prox1 και κύτταρα νευροβλαστών

Η πρωτεΐνη Prox1 των σπονδυλωτών είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη Prospero της *Drosophila melanogaster*, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς. Η Prospero, όπως και ο Prox1, είναι ένας ομοιοτικός μεταγραφικός παράγοντας και ως τέτοιος χρησιμεύει σε αρκετές διαφορετικές λειτουργίες στη *D. melanogaster*.

Πρωταρχικά, η Prospero είναι υπεύθυνη για τον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου των νευροβλαστών [Doe *et al.*, 1991] και κυττάρων progenitors (είναι κύτταρα που έχουν εξειδικευτεί για να δώσουν γένεση σε συγκεκριμένους υπότυπους κυττάρων) των αισθητικών οργάνων [Manning and Doe, 1999; Reddy and Rodrigues, 1999] καθώς επίσης και για την ανάπτυξη των φωτοϋποδοχέων στη *D. melanogaster* [Cook *et al.*, 2003].

Κατά τη νευρογένεση, τα βλαστικά κύτταρα νευροβλαστών διαιρούνται ασύμμετρα για να δώσουν γένεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα: ένα μητρικό γαγγλιακό κύτταρο (GMC) και ένα βλαστικό κύτταρο νευροβλαστών [Doe *et al.*, 1991; Doe, 1992; Jan and Jan, 1998; Myster and Duronio, 2000]. Το θυγατρικό βλαστικό κύτταρο νευροβλαστών επαναλαμβάνει αυτή την ασύμμετρη μιτωτική διαίρεση (διατηρώντας την ιδιότητα του νευροβλάστη), ενώ το μητρικό γαγγλιακό κύτταρο διαιρείται δίνοντας γένεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε νευρώνες ή γλοία [Jan and Jan, 1998]. Η ασύμμετρη διαίρεση οφείλεται στην ασύμμετρη μηνοειδή κατανομή της Prospero στο κυτταρόπλασμα των βλαστικών κυττάρων νευροβλαστών,

ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη προσαρμογέα Miranda [Spana and Doe, 1995; Shen *et al.*, 1997].

Κατά τη διαίρεση, τόσο το RNA όσο και η πρωτεΐνη της Prospero διανέμονται στο εσωτερικό μόνο ενός από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, του γνωστού ως γαγγλιακό μητρικό κύτταρο [Hirata *et al.*, 1995; Knoblich *et al.*, 1995; Spana and Doe, 1995]. Εντός του γαγγλιακού μητρικού κυττάρου, η Prospero μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και επάγει τη διαφοροποίηση του γαγγλιακού μητρικού κυττάρου σε νευρώνα ή γλοία, ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας συγκεκριμένα γονίδια ειδικών κυτταρικών τύπων. Βάσει αυτού, πιστεύεται πως η Prospero εξαναγκάζει το γαγγλιακό μητρικό κύτταρο να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο και να ξεκινήσει ένα πρόγραμμα νευρικής διαφοροποίησης.

Επίσης έχει βρεθεί πως η Prospero ρυθμίζεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη του κυτταρικού κύκλου κυκλίνη E. Όπως προαναφέρθηκε, η ασύμμετρη κατανομή της Prospero στα κύτταρα νευροβλαστών οδηγεί σε διαφοροποίηση σε γλοιακό κυτταρικό πεπρωμένο. Ωστόσο, απώλεια της κυκλίνης E προκαλεί μια ισοκατανομή της Prospero και επάγει όλα τα κύτταρα των νευροβλαστών να διαφοροποιηθούν σε γλοιακά κύτταρα [Berger *et al.*, 2005]. Αυτή η άμεση συσχέτιση μεταξύ της κυκλίνης E και της Prospero βοηθά στην ερμηνεία του ρόλου της Prospero στον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου.

Μια παρόμοια κατάσταση συμβαίνει και με τον Prox1 στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών, όπου συμμετέχει στη ρύθμιση της διαδικασίας διαφοροποίησης των νευρώνων μέσω άμεσης καταστολής της μεταγραφής του γονιδίου του *Notch1* [Kaltezioti *et al.*, 2010]. Η σηματοδότηση Notch προαγάγει τη νευροβλαστική ιδιότητα των κυττάρων [Wang *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2008; Weng *et al.*, 2010] και οδηγεί σε διαφοροποίηση προς αστροκύτταρα [Louví and Artavanis-Tsakonas, 2006]. Συνεπώς η δράση του Prox1 προωθεί τη νευρογένεση και αναστέλλει την αστρογλιογένεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [Kaltezioti *et al.*, 2010].

1.9.4 Λειτουργικές δράσεις και βιολογικές επιδράσεις του Prox1

Ο Prox1 λειτουργεί είτε ως ένας ενεργοποιητής της γονιδιακής μεταγραφής με το να προσδένεται άμεσα σε συγκεκριμένα στοιχεία του DNA μέσω της ομοιοεπικράτειάς του είτε δρα ως συγκαταστολέας [Ryter *et al.*, 2002; Yousef and Matthews, 2005; Elsir *et al.*, 2012]. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με αρκετούς

μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι και οι HNF4α [Song *et al.*, 2006], SF1 [Steffensen *et al.*, 2004] και Ets-1 [Yoshimatsu *et al.*, 2011].

Ο Prox1 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και λειτουργία ως η κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη της νευρογένεσης και της ανάπτυξης της καρδιάς, των προσοφθάλμιων φακών, του ήπατος, του παγκρέατος και του λεμφικού συστήματος [Sosa-Pineda *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2011; Karalay *et al.*, 2011; Westmoreland *et al.*, 2011]. Το *Prox1* είναι ένα κυρίαρχο γονίδιο της λεμφαγγειογένεσης, αλλά εκφράζεται επίσης και στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα, στα κύτταρα του κώνου της ομμάτων, στους R7 φωτούποδοχείς και στο μεσέντερο [Doe *et al.*, 1991; Vaessin *et al.*, 1991; Oliver *et al.*, 1993]. Επιπλέον, η έκφρασή του εντοπίζεται και σε εμβρυϊκούς ηπατοβλάστες και σε ενήλικα ηπατοκύτταρα [Dudas *et al.*, 2004].

Σε αρκετές περιπτώσεις, η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κι ως εκ τούτου φαίνεται να έχει ένα πιθανό ρόλο στην ογκογένεση [Foskolou *et al.*, 2013]. Παράλληλα, τροποποιήσεις στην έκφραση ή στη λειτουργία του Prox1 έχουν συσχετιστεί με αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους [Petrova *et al.*, 2008; Elsir *et al.*, 2012].

Μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο του Prox1 έχουν συσχετιστεί με την παχυσαρκία και το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, υποδεικνύοντας ένα σημαντικό ρόλο για τον Prox1 στη ρύθμιση μεταβολικών και ενδοκρινικών λειτουργιών [Dupuis *et al.*, 2010; Ohshige *et al.*, 2011; Lecompte *et al.*, 2013].

Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν την εμπλοκή του Prox1 στη ρύθμιση της δράσης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών [Edvardsson *et al.*, 2001; Charest-Marcotte *et al.*, 2010]. Ο Prox1 και ο ER έχουν αντίθετες δράσεις σε κοινά γονίδια στόχους, επηρεάζοντας μεταβολικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.

1.9.4.1 Δράση του Prox1 στον έλεγχο του ενεργειακού μεταβολισμού

Αρκετές μελέτες έχουν συσχετίσει τον Prox1 με το μεταβολισμό, εξαιτίας της ευρείας του επίδρασης στο μονοπάτι του ενεργειακού μεταβολισμού, ενώ πρόσφατα έχει φανεί πως δρα ως ρυθμιστής του συγκεκριμένου μονοπατιού.

Περισσότερο από το 40 % των γονιδιακών στόχων του Prox1 είναι κοινοί με τον ERRα και δείχτηκε πως ο Prox1 μπορεί να στρατολογηθεί σε θέσεις δέσμευσης

στην πρωτεΐνη του ERR α και να δράσει ως αρνητικός ρυθμιστής του μονοπατιού ERR α /PGC-1 α [Charest-Marcotte *et al.*, 2009].

Ο ERR α μαζί με τον συνενεργοποιητή PGC-1 α είναι γνωστό ότι διακατέχουν ένα κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, κυρίως σε καρδιακούς και σκελετικούς μύες. Ο PGC-1 α ενεργοποιεί ισχυρά την έκφραση του ERR α μέσω του στοιχείου αυτορρυθμιζόμενης απόκρισης σε ορμόνη που βρίσκεται στη ρυθμιστική περιοχή του υποδοχέα του ανθρώπινου ERR α [Laganiere *et al.*, 2004], με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης αρκετών γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στο μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό.

Επιπλέον στοιχεία μαρτυρούν πως ο Prox1 εμπλέκεται στο ρυθμικό έλεγχο των προϊόντων του μεταβολισμού. Σε μία μελέτη όπου εξετάστηκαν τα μόρια ERR α , PROX1 και BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1), ένα εγγενές συστατικό του μοριακού ρολογιού, η γονιδιακή σύγκλιση της μεταγραφικής ενεργότητας των τριών παραγόντων, ανέδειξε ένα νέο κομβικό σημείο στο μοριακό κύκλωμα που ελέγχει τον καθημερινό συγχρονισμό των μεταβολικών διαδικασιών. Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενης μεταγραφικής ρύθμισης μεταξύ των, καθώς και οι εκτεταμένες επικαλύψεις των γονιδίων-στόχων τους, εμπλέκουν τους τρεις αυτούς παράγοντες στον έλεγχο των δικτύων των γονιδίων μεταβολισμού και καρδιακού ρυθμού [Dufour *et al.*, 2011].

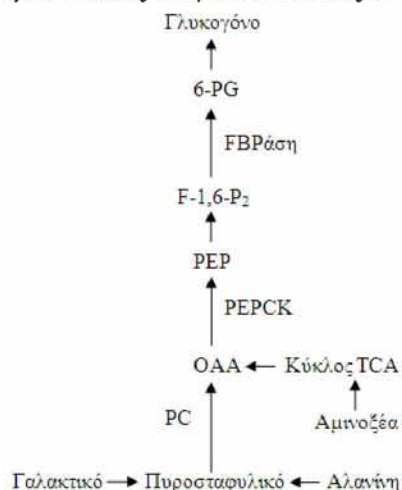
Ο Prox1 είναι επίσης γνωστό πως ρυθμίζει την ενεργότητα συγκεκριμένων υποτύπων των πυρηνικών υποδοχέων [Qin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Yamazaki *et al.*, 2009]. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η δράση του Prox1 στη ρύθμιση της ενεργότητας του HNF4 α (NR2A1) και του ομολόγου-1 του υποδοχέα ήπατος (LRH-1, NR5A2) στους υποδοχείς των *CYP7A1* και *PCK1*, προτείνοντας ένα πιθανό ρόλο του Prox1 στη ρύθμιση της σύνθεσης του χολικού οξέος και της γλυκονεογένεσης αντίστοιχα στο ήπαρ [Qin *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006]. Το κατά πόσο ο Prox1 διαδραματίζει έναν πιο πολυσήμαντο ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού παραμένει άγνωστο προς το παρόν [Charest-Marcotte *et al.*, 2010].

1.10 Νευρικά κύτταρα και ενεργειακός μεταβολισμός

Στοιχεία από διάφορες μελέτες μαρτυρούν πως είναι δυνατό η διαδικασία της γλυκονεογένεσης να πραγματοποιείται και στον εγκέφαλο. Η υπόθεση αυτή στηρίχθηκε σε πρώτο λόγο στον εντοπισμό των γλυκονεογενετικών ενζύμων σε

εγκεφαλικά κύτταρα. Εντοπίστηκαν η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού (pyruvate carboxylase, PC) [Yu *et al.*, 1983; Shank *et al.*, 1985; Faff-Michalak and Albrecht, 1991], η καρβοξυκινάση του φωσφοενολ-πυροσταφυλικού (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) [Zimmer and Magnuson, 1990], η φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (fructose 1,6-biphosphatase, FBPase) [Philips and Coxon, 1975; Majumder and Eisenberg, 1977; Hevor and Gayet, 1978, 1981; Carter, 1983; Hevor *et al.*, 1985; Chatteraj and Majumder, 1986; Liu and Fromm, 1988] και η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (glucose 6-phosphatase, G6Pase) [Anchors and Karnovsky, 1975].

Επιπλέον στοιχεία που συνέτειναν επίσης στην αποδοχή της παραπάνω άποψης είχαν να κάνουν με τη σύνθεση ενεργοποιημένων παραγώγων γλυκόζης, καταλοίπων του γλυκογόνου, από πρόδρομα γλυκονεογενετικά μόρια σε ιστούς του κεντρικού νευρικού συστήματος [Ide *et al.*, 1969; Phelps, 1975; Phillips and Coxon, 1975; Goldman and Witkovsky, 1987; Goldman, 1988]. Βάσει των τελευταίων δεδομένων, τροποποιήθηκε ο όρος της γλυκονεογένεσης ώστε πλέον να θεωρείται πως πέρα από την παραγωγή μορίων ελεύθερης γλυκόζης να αποτελεί γενικότερα τη διαδικασία σύνθεσης ενεργοποιημένων παραγώγων γλυκόζης με χρήση πρόδρομων γλυκονεογενετικών μορίων όπως το γαλακτικό οξύ.

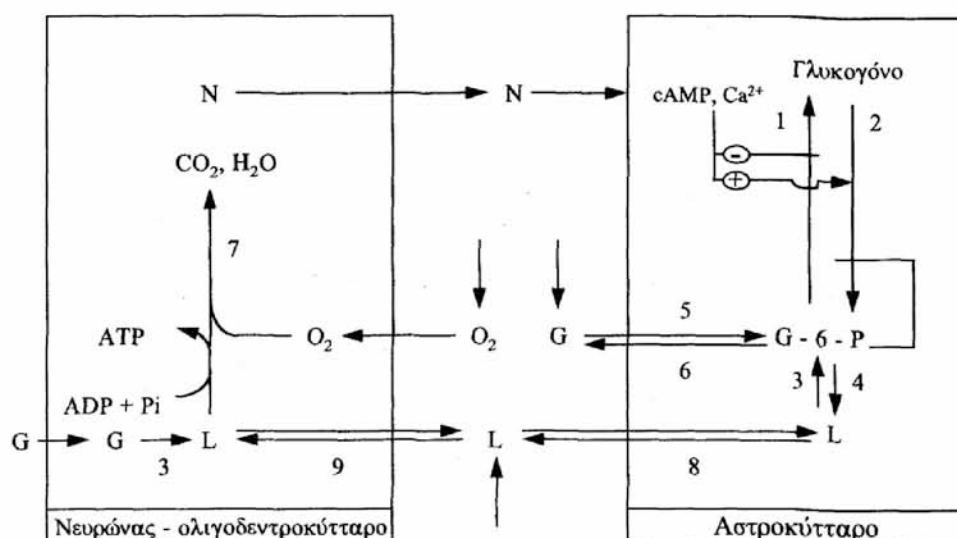


Εικόνα 1.12. Σχηματική απεικόνιση της γλυκονεογένεσης στα αστρογλοιακά κύτταρα. Τα ενδιάμεσα ενζυματικά βήματα παραλείφθηκαν χάριν απλότητας. Όπου PC=πυροσταφυλική καρβοξυλάση, TCA=τρικαρβοξυλικό οξύ, OAA=οξαλοξικό οξύ, PEP=φωσφοενολοπυροσταφυλικό, PEPCK=καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού, F-1,6-P2=1,6 διφωσφορική φρουκτόζη, G-6-P=6-φωσφορική γλυκόζη, FBPάση=φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης. [Από Kettenmann and Ransom, 1995].

Βέβαια, η παρουσία και μόνο των ενζύμων της γλυκονεογένεσης στα εγκεφαλικά κύτταρα δεν μπορεί να είναι από μόνο του επαρκές στοιχείο για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης, μια και είναι απαραίτητο τα

ένζυμα αυτά να συνυπάρχουν εντός του ίδιου κυττάρου. Βάσει αυτού θεωρείται μέχρι και σήμερα πως τα αστρογλοϊακά κύτταρα είναι τα γλυκονεογενετικού τύπου κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος [Shank *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 1983; Cesar and Hamprecht, 1993a, 1993b]. Ο Cruz και οι συνεργάτες του [1998] κάνουν επίσης αναφορά για γλυκονεογενετική συμπεριφορά των συναπτοσωμάτων. Μελέτες μαρτυρούν πως η ρύθμιση της γλυκονεογένεσης στα αστρογλοϊακά κύτταρα πραγματοποιείται διαφορετικά σε σχέση με τη ρύθμισή της στα ηπατοκύτταρα [Schmoll *et al.*, 1993a]. Επιπλέον πιθανολογείται πως η δράση των γλυκοκορτικοειδών ίσως να μην έχει τις ίδιες μεταβολικές επιδράσεις σε αστροκύτταρα και νευρικά κύτταρα [Poitry *et al.*, 2000; Psarra *et al.*, 2003].

Τα αστροκύτταρα κατέχουν θέση κλειδί στον εγκέφαλο μια και εντοπίζονται μεταξύ τριχοειδών αγγείων από τη μία και νευρικών κυττάρων και ολιγοδεντροκυττάρων από την άλλη. Έτσι η διέλευση όλων των θρεπτικών συστατικών (γλυκόζης, οξυγόνου και αμινοξέων) που είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας γίνεται διαμέσου των αστροκυττάρων. Επίσης η ύπαρξη του μεγαλύτερου ποσοστού γλυκογόνου στα κύτταρα αυτά, τα καθιστά πιθανές αποθήκες και μηχανές παραγωγής ενέργειας για τα ίδια ή/και για γειτονικά κύτταρα. Σε ό,τι αφορά τα νευρικά κύτταρα και τα ολιγοδεντροκύτταρα η κύρια μεταβολική οδός είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση [Psarra, 1998].



Εικόνα 1.13. Υποθετικό σχήμα ενεργειακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων νευρικού ιστού. Οι αριθμοί αναπαριστούν ένζυμα ή μεταβολικές οδούς: (1) γλυκονεογένεση, (2) γλυκογονόλυση, (3) γλυκονεογένεση, (4) γλυκόλυση, (5) εξοκινάση, (6) φωσφατάση της φωσφορικής γλυκόζης, (7) μεταβολισμός γαλακτικού οξέος είτε μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος είτε μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, (8) μεταφορέας γαλακτικού οξέος σε αστρογλοϊακά κύτταρα, (9) μεταφορέας γαλακτικού οξέος σε νευρικά κύτταρα. Τα βέλη έξω από τα κύτταρα υποδηλώνουν προσέλευση της ουσίας είτε από άλλους ιστούς είτε στην περίπτωση των ορμονών και νευροδιαβιβαστών από γειτονικά νευρικά κύτταρα. Όπου L=γαλακτικό οξύ ή ιόντα γαλακτικού οξέος, G=γλυκόζη, G-6-P=6-φωσφορική γλυκόζη, N=νευροδιαβιβαστές και ορμόνες. [Από τη διδακτορική διατριβή της δρ Ψαρρά, 1998].

Η λειτουργία της γλυκονεογένεσης στο νευρικό σύστημα παραμένει μέχρι και σήμερα αινιγματική. Παρατηρείται πως το ίδιο κύτταρο μπορεί όχι μόνο να παράξει γαλακτικό οξύ, αλλά και να το χρησιμοποιήσει για τη σύνθεση γλυκογόνου. Πιθανολογείται πως ένα αστροκύτταρο του εγκεφάλου μπορεί να εναλλάξει ταχύτητα τη λειτουργική του δραστηριότητα μεταξύ της παραγωγής και κατανάλωσης του γαλακτικού, ανάλογα με τις διεργασίες και ανάγκες των γειτονικών του νευρώνων και πιθανότατα εξαρτώμενο επιπλέον και από τις συνακόλουθες απαιτήσεις των παρακείμενων ολιγοδενδροκυττάρων.

Να σημειωθεί πως σε περιπτώσεις υψηλών ρυθμών παραγωγής και απελευθέρωσης γαλακτικού οξέος στο εγγύς τους περιβάλλον, τα αστροκύτταρα θα ήταν δυνατό να μπορούν να απαλλαχθούν από το δηλητηριώδες οξύ χρησιμοποιώντας το στη γλυκονεογενετική διαδικασία. Αυτό θα σήμαινε ταυτόχρονη επιτέλεση τριών σκοπών: ρύθμιση της τιμής του pH και έλεγχο της ωσμωμοριακότητας του ενδοκυτταρικού υγρού, καθώς επίσης και ανακύκλωση των προϊόντων μεταβολισμού που δημιουργούνται από τα γειτονικά τους κύτταρα κατά την (ηλεκτρική) δραστηριότητά τους [Kettenmann and Ransom, 1995; Wiesinger *et al.*, 1997].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένης της σημασίας των σηματοδοτικών μονοπατιών των γλυκοκορτικοειδών στις Επιστήμες της Βιολογίας και την Ιατρική, στρέψαμε την προσοχή μας στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης του κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1, στη μεταβολική διαδικασία της γλυκονεογένεσης στα νευρικά κύτταρα.

Η γλυκονεογένεση έχει συσχετιστεί τόσο με τη δράση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχει ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR), όσο και με τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα Prox1. Σημαντικό ένζυμο για την επιτέλεση της γλυκονεογένεσης είναι η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), η έκφραση της οποίας δεν περιορίζεται στα κατ' εξοχήν γλυκονεογενετικά όργανα, ήπαρ και νεφροί, αλλά εντοπίζεται μεταξύ άλλων και σε νευρικά κύτταρα.

Δεδομένου ότι τα νευρικά κύτταρα δεν πραγματοποιούν γλυκονεογένεση μολαταύτα εκφράζουν τόσο τον GR όσο και την PEPCK, η μελέτη της πιθανής συνομιλίας των μεταγραφικών παραγόντων GR και Prox1 σε νευρικά κύτταρα και η διερεύνηση των πιθανών ρυθμιστικών μηχανισμών δράσης τους στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου στόχου τους που κωδικοποιεί για την PEPCK, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες νευρικών κυττάρων κυτταρικής σειράς mN(euro)2A τροποποιημένες κατάλληλα (από την ομάδα του δρ Πολίτη), ώστε να υπερεκφράζουν κατά συνθήκη το μεταγραφικό παράγοντα Prox1 και εφαρμόστηκαν μια σειρά πειραμάτων προσδιορισμού α) της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο της λουσιφεράσης, β) της πιθανής αλληλεπίδρασης των δύο μορίων, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης και γ) ελέγχου μεταβολών των επιπέδων έκφρασης της PEPCK, με μεθόδους ανοσοαποτυπώσεως Western και ανοσοϊστοχημείας, παρουσία και απουσία του Prox1 και ειδικών αγωνιστών και ανταγωνιστών του GR.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Ακολουθεί μια λίστα με τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και αναφέρονται οι εταιρείες από τις οποίες προέρχονταν. Όσα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας σημειώνονται με αστερίσκο (*).

3.1.1 Αντιδραστήρια

3.1.1.1 Χημικά

Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)

APS (Sigma)

Bradford protein assay (Bio-Rad)

BSA (Sigma)

Charcoal, dextran coated (Sigma)

DEX (Riedel-de Haën) *

DMSO (Panreac) *

DOX (Sigma) *

DTT (SERVA)

EDTA (Panreac)

FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *

HCl (Merck)

KCl (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen) *

Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen) *

MitoTracker® Red CMXRos (CMX) (Molecular Probes Inc)

Na₂HPO₄ (Merck)

NaCl (Panreac)

NaHCO₃ (Merck)

NaOH (Merck)

ONPG (Sigma)

Opti-MEM ® (Life Technologies - Invitrogen) *

PMSF (SERVA)

PVA (Sigma)
 SDS (SIGMA)
 Skimmed milk powder (Regilait)
 TEMED (Research Organics)
 Tris base (Merck)
 Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco) *
 Tween 20 (Euroclone)
 Αιθανόλη (Panreac και Merck)
 β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
 Γλυκερόλη (Panreac)
 Γλυκίνη (AppliChem)
 Ισοπροπανόλη (Scharlau)
 Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
 Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ThermoScientific Fermentas)
 Μεθανόλη (Merck)
 Μembrάνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
 Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
 Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega) *

3.1.1.2 Θρεπτικά υλικά

Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *
 LB Broth (Scharlau)
 LB Agar (Scharlau)

3.1.1.3 Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα:

Μονοκλωνικό αντίσωμα 2F8 από κόνικλο. Αποτελεί ευγενική προσφορά του δρ Αλέξη Μιχάλη, καθηγητή του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) στο Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΕΒ).

Μονοκλωνικό αντίσωμα β-ακτίνης από ποντικό (Sigma)

Μονοκλωνικό αντίσωμα β-ακτίνης από κόνικλο (Sigma)

Μονοκλωνικό αντίσωμα Prox1 από κόνικλο (ReliaTech)

Πολυκλωνικό αντίσωμα PEPCK H-300 από κόνικλο (Santa-Cruz), με τον επίτοπο να αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα.

Δευτερογενή αντισώματα:

Αντίσωμα για mouse IgG-HRP (Jackson Laboratories).

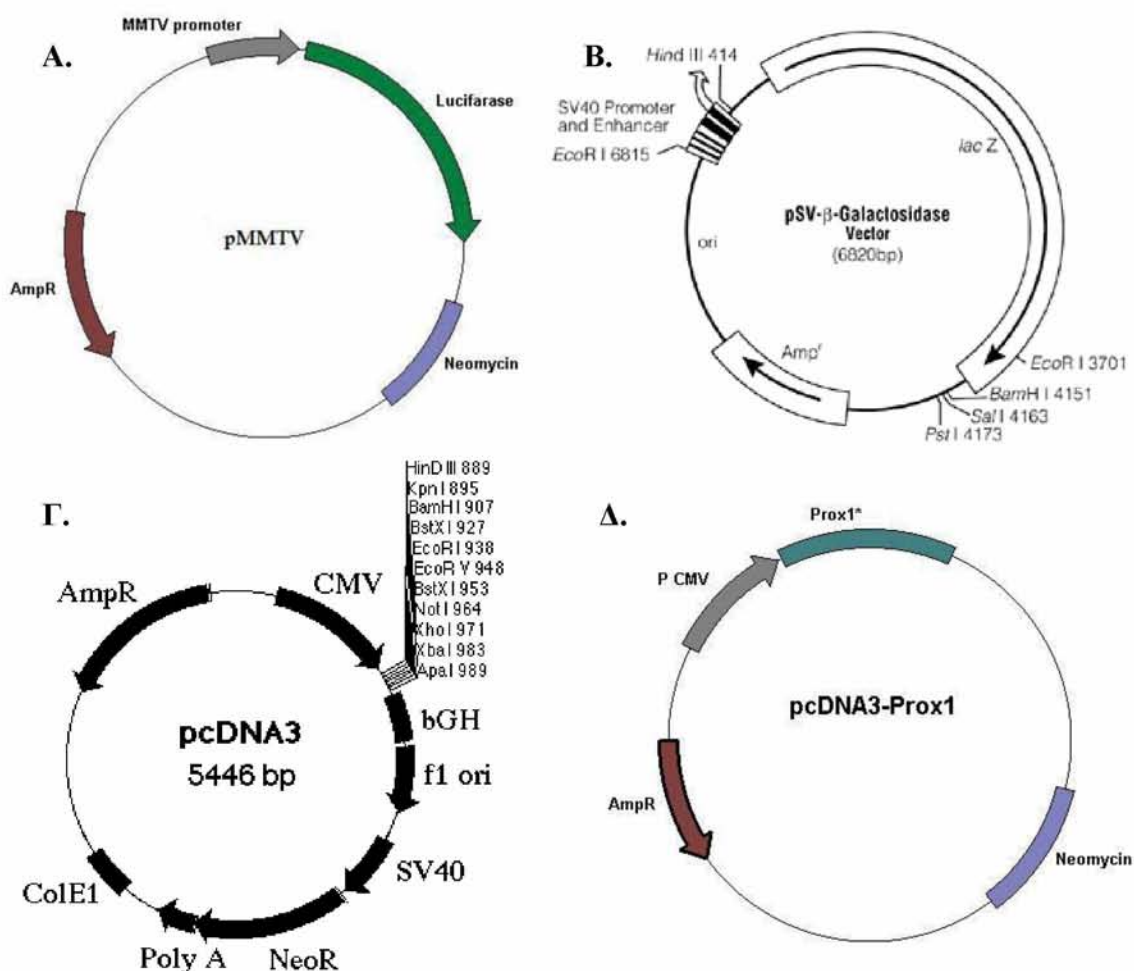
Αντίσωμα για rabbit IgG-HRP (Jackson Laboratories).

3.1.1.4 Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia coli* στελέχους DH5aTM (Life Technologies - Invitrogen), ο γονότυπος των οποίων περιγράφεται στους Sambrook *et al.* [1989]. Τα δεκτικά στελέχη αποτελούν ευγενική προσφορά της Αφροδίτης Κροκιά, υποψήφιας διδάκτορα του ΤΒΒ στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

3.1.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς

Στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων mN(euro)2A χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pMMTV-GRE-Luc, pSV40-β-Gal, pcDNA₃ και pcDNA₃-Prox1.



Εικόνα 3.1. Αναπαρίστανται οι μοριακές κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων mN(euro)2A. Α) Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-Luc, με τον υποκινητή να φέρει GREs αλληλουχίες. Β) Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της β-Gal. Γ) Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pcDNA₃. Δ) Πλασμιδιακός φορέας pcDNA₃ που φέρει ως ένθεμα το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον Prox1.

3.1.1.6 Διαλύματα

DEX:

Είναι διαλυμένη σε EtOH 100 % και αποθηκεύεται στους 20 °C σε συγκέντρωση 1 mM. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1 μ M.

RU486:

Είναι διαλυμένο σε DMSO. Είναι φωτοευαίσθητο και αποθηκεύεται στους -20 °C σε συγκέντρωση 10^{-1} M. Περαιτέρω αραιώνεται σε 100 % EtOH ώστε να προκύψει συγκέντρωση 10 mM. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10^{-5} M.

Υδατικά διαλύματα DOX:

Ζυγίζεται σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (μέχρι και 4 δεκαδικά) η κατάλληλη ποσότητα DOX (4 °C, φωτοευαίσθητο) και διαλύεται σε ddH₂O. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα DOX συγκεντρώσεως 1 mg/mL, τα οποία τοποθετούνταν στους 4 °C και η χρήση τους ήταν άμεση.

RIPA Buffer:

Περιέχει 1 % v/v 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 % v/v 150 mM NaCl, 0.02 % v/v 1 mM EDTA και 0.1 % v/v NP-40 σε ddH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

PMSF 200 mM:

Για την παρασκευή 2 mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200 μ L και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):

Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 μ L PMSF 20 mM (20 °C) και 2 μ L DTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

Διάλυμα Bradford:

Stock 5×. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1×, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

Sample Buffer 4×:

Αποτελείται από 1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20 °C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

Tris 20 mM pH 7.5:

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου eppendorf (1.5 mL) αναμειγνύονται 20 μL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980 μL ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:

Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

TEMED:

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

APS 10 %:

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1 mL ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

Μάρτυρας μοριακών μεγεθών:

Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος μάρτυρας μοριακών μεγεθών που καλύπτει ένα εύρος πρωτεϊνικών μεγεθών από 10 έως 170 kDa και διαθέτει προσημασμένη με πορτοκαλί χρώμα τη ζώνη των 70 kDa και με πράσινο χρώμα τη ζώνη στα 10 kDa.

Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σεσημασμένες σε διάλυμα που αποτελείται από 62.5 mM Tris- H_3PO_4 (pH 7.5 στους 25 °C), 1 mM EDTA, 2 % SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN_3 και 33 % γλυκερόλη [ThermoFisher Scientific Inc., 2013].

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10×:

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται σε όγκο 1 L ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. [Ornstein, 1964; Davis, 1964].

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1×:

Για την παρασκευή του R.B. 1× αραιώνονται 100 mL R.B. 10× σε 900 mL dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. [Laemmli, 1970]. Διατηρείται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:

Αποτελείται από 10 % Running Buffer 10×, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:

Αποτελείται από 91 mM Na_2HPO_4 , 17 mM NaH_2PO_4 και 1500 mM NaCl. Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:

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

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH_2PO_4 0.2 M και διβασικού Na_2HPO_4 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H₂O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O.

3.1.2 Οργανολογία

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

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

Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (KRÜSS)

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

Επωαστικός κλίβανος CO₂ (Galaxy 170S, New Brunswick)

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

Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Nuova, Thermolyne)

Θερμαντική πλάκα heat-block (Thermoleader)

Κάθετος αναδευτήρας (SB3 stuart®)

Κυκλομείκτες (vortex)

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

Ξηρός κλίβανος (WTB binder)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)

Συσκευές υπερήχων (water bath sonicator; Labsonic® M, sartorius AG)

Υδατόλουτρο

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

Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός (Spectronic® 20 GENESYS™)

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

3.1.2.1 Αναλώσιμα

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

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* στελέχους DH5a τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε 30-40 % γλυκερόλη στους -80 °C με τη μέθοδο θερμικού σοκ (heat-shock). Σε πλαστικό σωληνάριο erpendorf (1.5 mL) που περιέχει 80 μ L *E. coli* DH5a κυττάρων προστίθεται 1 μ L του επιθυμητού πλασμιδίου (stock, -20 °C), δουλεύοντας στον πάγο. Αφήνονται προς επώαση στους 4 °C για \geq 30 min. Ακολούθως το erpendorf μεταφέρεται για 1 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42 °C. Έπειτα τοποθετείται στους 4 °C για 2 min και ακολουθεί η προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου LB. Στη συνέχεια τοποθετούνται στους 37 °C για 1 h και κατόπιν γίνεται επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τριβλίο με LB-άγαρ το οποίο είναι επιστρωμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη amp ή καναμυκίνη kan, σε συγκέντρωση 100 μ g/mL ή 50 μ g/mL, αντίστοιχα. Υπό στείρες συνθήκες εφαρμόζεται η μέθοδος της διασποράς με γυάλινο διανομέα και η επώαση των βακτηριακών κυττάρων γίνεται στους 37 °C για ~16 h.

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

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

Απομονώθηκαν τα πλασμίδια: pSV40-βGal και pMMTV-GRE-Luc για την κλωνοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* στελέχους DH5a. Τα stock διαλύματα πλασμιδιακού DNA ελέγχονται για την καθαρότητά τους και ποσοτικοποιείται η περιεκτικότητά τους σε pDNA με φασματοφωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1:200. Αποθηκεύονται στους -20 °C.

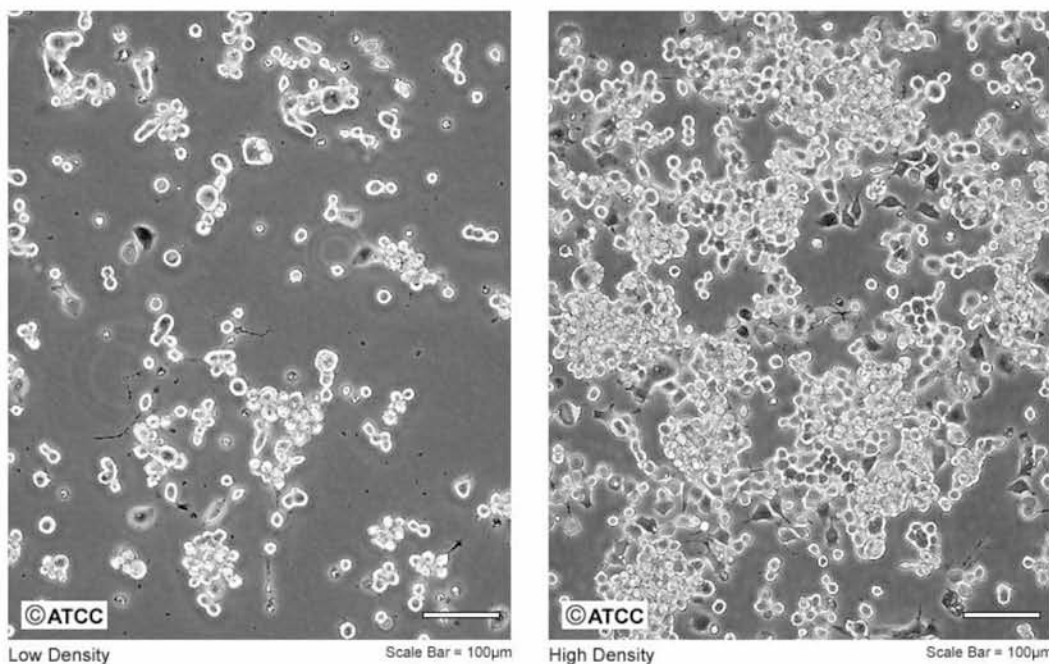
3.2.3 Διαχείριση Κυτταροκαλλιιεργειών

3.2.3.1 Καρκινική κυτταρική σειρά mN(euro)2A

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά mN(euro)2A ή mN2A που προέρχεται από ποντικίσια κύτταρα νευροβλαστώματος (ATCC, reference: CCL-131). Χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές Prox1-Tet mN(euro)2A και mN(euro)2A WT.

Οι κυτταρικές σειρές αποτελούν ευγενική προσφορά του δρ. Πολίτη Παναγιώτη, ερευνητή Δ' βαθμίδος στο ΙΒΕΑΑ, τον οποίο και ευχαριστώ.

ATCC Number: **CCL-131**
Designation: **Neuro-2a**



Εικόνα 3.2. Κύτταρα της καρκινικής σειράς mN(euro)2A, όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο σε μικρό (αριστερά) και σε μεγάλο (δεξιά) ποσοστό πληρότητας. [Από την επίσημη ιστοσελίδα του ATCC].

Σε αντιδιαστολή με τα mN(euro)2A WT, τα Prox1-Tet mN(euro)2A υπερεκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Prox1 παρουσία του αναλόγου της τετρακυκλίνης, δοξυκυκλίνης, που επάγει τη μεταγραφή του (σύστημα tet-on). Για την

πλήρη ενεργοποίηση του συστήματος απαιτούνται συγκεντρώσεις DOX 0.01-1 µg/mL. Το αντιβιοτικό δοξυκυκλίνη (doxycycline, DOX) χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις πολύ πιο κάτω από τα επίπεδα εμφάνισης κυτταροτοξικότητας στις κυτταροκαλλιέργειες και έχει χρόνο ημισείας ζωής 24 h.

3.2.3.2 Απόψυξη κυττάρων

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

3.2.3.3 Καλλιέργεια κυττάρων mN(euro)2A

Για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων mN(euro)2A χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο DMEM w/ P.R., L.G εμπλουτισμένο με 10 % v/v FBS, 1 % v/v 200 mM L-Glut και 1 % v/v Pen/Strept (πλήρες θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία 37 °C και ποσοστό CO₂ ίσο με 5 %.

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

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

3.2.3.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων

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

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται περίπου 2 φορές ανά εβδομάδα, ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Σε κάθε ανακαλλιέργεια ο αριθμός του περάσματος (passage) των κυττάρων αυξάνεται κατά +1 την φορά και είναι δείκτης της γήρανσης των κυττάρων.

3.2.3.5 Ψύξη κυττάρων

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

3.2.3.6 Μέτρηση κυττάρων

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

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

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

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

3.2.3.7 Μόνιμη διαμόλυνση κυττάρων

Τα κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A έχουν υποστεί μόνιμη διαμόλυνση με πλασμιαδικό φορέα που, πέρα από το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον Prox1, φέρει και το γονίδιο επιλογής neo εκατέρωθεν ενός ιδιόσυστατα ενεργού υποκινητή. Το neo κωδικοποιεί για την φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης (NPT). Τα μόνιμα διαμολυσμένα κύτταρα απομονώνονται έπειτα από πολλούς κύκλους ανακαλλιέργειας και επιλογής με το αντιβιοτικό G418. Το αμινογλυκοσίδιο γενετικήνη (G418) δρα ως τοξικός παράγοντας για τα κύτταρα, μια και παρεμποδίζει τη διαδικασία της μετάφρασης. Κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με το πλασμίδιο εκφράζουν την πρωτεΐνη NPT η οποία φωσφορυλιώνει το G418, καθιστώντας το ανενεργό κι έτσι επιτυγχάνεται η επιβίωσή τους.

Η όλη διαδικασία επιλογής και απομόνωσης μόνιμα διαμολυσμένων κυττάρων Prox1-Tet mN(euro)2A πραγματοποιήθηκε από την εργαστηριακή ομάδα του δρ. Πολίτη Παναγιώτη (ΠΒΕΑΑ).

3.2.3.8 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

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

Εντός των λιποσωμάτων εσωκλείεται κατάλληλο πλασμιδιακό DNA και δεδομένης της λιπιδικής φύσεως της κυτταρικής μεμβράνης, συντήκονται με αυτή απελευθερώνοντας εντός της το περιεχόμενό τους. Επίσης, τα λιποσώματα είναι δυνατό να διεισδύσουν στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική διάχυση ή ακόμη και να εισαχθούν με διαδικασίες ενδοκυττάρωσης κ.ά. [Torchilin, 2005].

Έγινε χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000. Η αναλογία του λόγου γ pDNA : λ χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη ήταν 1 : 0.5, καθώς τα mN(euro)2A διαμολύνονται αρκετά εύκολα. Γενικότερα ο χρησιμοποιούμενος λόγος συγκεντρώσεων υφίσταται τροποποιήσεις, για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της διαμόλυνσης [Dalby *et al.*, 2004].

Η διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια της παραγράφου πρωτοεφαρμόστηκε με παρόμοιο τρόπο και σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A τα οποία διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια για β -Gal και GRE-Luc. Το πρωτόκολλο για τα Prox1-Tet mN(euro)2A διαφοροποιείται στο ότι ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων προς ανάπτυξη ήταν 50.000 κύτταρα/κελί και ο λόγος γ pDNA: λ χρησιμοποιούμενης λιποφεκταμίνης ήταν 1:1. Επιπλέον, μετά τη διαδικασία της διαμόλυνσης τα κύτταρα εκτέθηκαν ή όχι σε συγκεντρώσεις 1 μ g/mL DOX για την επαγόμενη έκφραση του Prox1.

Εργαστηριακό Πρωτόκολλο διαμόλυνσης των mN(euro)2A WT:

Ημέρα 0: Σε 18 κελιά ενός 24 \times wells-plate προστίθενται 10⁶ κύτταρα mN(euro)2A ανά well σε θρεπτικό υλικό DMEM w/ P.R., L.G., +FBS, +L-G, -P/S και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂.

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

Σε πρώτο βήμα, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων με 200 μ L/well αντιδραστηρίου OptiMEM (δεν διαθέτει αντιμυκωτικά-αντιβιοτικά ούτε FBS), τοποθετώντας το τουλάχιστον μισή ώρα προτού ξεκινήσει η διαμόλυνση των κυττάρων.

Ακολουθως ετοιμάζονται τέσσερα διαλύματα (2× μείγμα I και 2× μείγμα II): Το μείγμα I αποτελείται από το σύνολο των επιθυμητών πλασμιδιακών DNA μαζί με OptiMEM και το μείγμα II συνίσταται από την κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης με OptiMEM. Τα δύο μείγματα II είναι πανομοιότυπα, ενώ τα μείγματα I διαφοροποιούνται στο ότι στο ένα εισάγεται ο πλασμιδιακός φορέας pCDNA₃ με ενσωματωμένη τη νουκλεοτιδική ακολουθία του γονιδίου του Prox1 και στο άλλο εισάγεται μόνο ο φορέας pCDNA₃. Το κάθε μείγμα I διαθέτει ίση ποσότητα από τους πλασμιδιακούς φορείς pSV40 με ένθεμα τη β-γαλακτοσιδάση (β-Gal) και τον pMMTV με ένθεμα το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση υπό έναν υποκινητή που φέρει GREs αλληλουχίες (GRE-Luc).

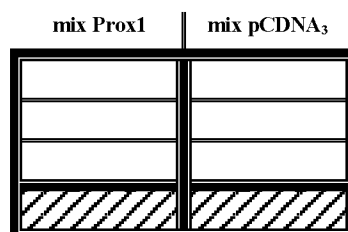
Στον Πίνακα 3.1 αναγράφονται οι συστάσεις των μειγμάτων που περιγράφηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1.

ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΤΩΝ mN(euro)2A WT

	Mix I:		Mix I:
mix Prox1	pSV40-βGal: 0.15 μg/well	mix pCDNA₃	pSV40-βGal: 0.15 μg/well
	pMMTV-GRE-Luc: 0.15 μg/well		pMMTV-GRE-Luc: 0.15 μg/well
	pCDNA ₃ -Prox1: 1 μg/well		pCDNA ₃ : 1 μg/well
	OptiMEM: 25 μL/well		OptiMEM: 25 μL/well
	Mix II:		Mix II:
	Lipofectamine: 0.65 μL/well		Lipofectamine: 0.65 μL/well
	OptiMEM: 25 μL/well		OptiMEM: 25 μL/well

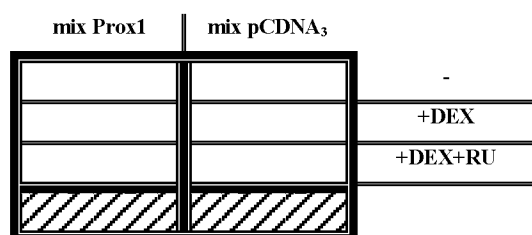
Τα επιμέρους μείγματα αφήνονται προς επώαση για 10 min (R.T., σκοτάδι). Ακολουθως αναμειγνύονται και επωάζονται για 30 min στο σκοτάδι, σε R.T.. Το ολικό μείγμα διαμοιράζεται με σταδιακή ροή στα wells (+50 μL/well) και τα κύτταρα αφήνονται προς επώαση για 4 h στον επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5 % CO₂). Έπειτα, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων αντικαθίσταται με πλήρες θρεπτικό υλικό cis DMEM w/o P.R., L.G. και αφήνονται στον κλίβανο για 24 h.



Εικόνα 3.3. Παρουσιάζεται ενδεικτικά το πώς διαχωρίστηκαν τα κελιά στην πλάκα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε στην παροδική διαμόλυνση των κυττάρων mN(euro)2A WT. Εννιά δείγματα διαμολύνθηκαν με το μείγμα που περιείχε τον φορέα έκφρασης pCDNA₃ με το γονίδιο του Prox1 (mix Prox1) και εννιά δείγματα με το μείγμα που περιείχε έναν άδειο φορέα pCDNA₃ (mix pCDNA₃). Και τα δύο μείγματα περιείχαν ίσες ποσότητες των πλασμιδίων που φέρουν τις κωδικές ακολουθίες για β-Gal και GRE-Luc.

Ημέρα 2: Τα κύτταρα επωάζονται για 6 h με τις ουσίες DEX και RU486 (RU) σε πλήρες θρεπτικό υλικό cis DMEM w/o P.R., L.G.. Έχουμε εις τριπλούν δείγματα μάρτυρες (controls), δείγματα που έχουν επωαστεί μόνο με DEX 10^{-6} M και δείγματα που έχουν επωαστεί με μείγμα DEX 10^{-6} M και RU 10^{-5} M.

Οι εν λόγω συγκεντρώσεις έχουν επιλεγεί ως οι καταλληλότερες βάσει αποτελεσμάτων από παλαιότερες μελέτες μας. Ο χρόνος έκθεσης επιλέγηκε επίσης βάσει προηγούμενων αποτελεσμάτων που αποδεικνύουν πως η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση του GR παρουσία της DEX παρατηρείται στις 5 με 16 h έκθεσης [Nehmé *et al.* 2009].



Εικόνα 3.4. Παρουσιάζονται οι παράγοντες στους οποίους εκτέθηκαν τα διαμολυσμένα είτε με Prox1 είτε με άδειο φορέα pCDNA₃ κύτταρα mN(euro)2A WT. Τα δείγματα διακρίνονται σε κύτταρα μάρτυρες που δεν εκτέθηκαν σε κανένα παράγοντα (-), σε κύτταρα που εκτέθηκαν στην ουσία DEX σε τελική συγκέντρωση 1 μ M και σε κύτταρα που εκτέθηκαν σε συνδυασμό των παραγόντων DEX+RU σε συγκεντρώσεις 1 μ M και 10 μ M αντίστοιχα.

3.2.3.9 Λύση κυττάρων

Στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης τα κύτταρα λύνονται σε Lysis Buffer 1 \times . Αρχικά πραγματοποιείται έκπλυση των wells με PBS 1 \times (παγωμένο, αποστειρωμένο). Ακολούθως προστίθενται 70 μ L L.B./well και το plate τοποθεείται προς επώαση στους 4 $^{\circ}$ C υπό ήπια ανακίνηση για 30 min ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση. Η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο των wells γίνεται με απόξεση (scraping) με το ρύγχος της πιπέτας και ο όγκος που προκύπτει μεταφέρεται σε eppendorfs (1.5 mL). Τα eppendorfs φυγοκεντρώνονται στις 13.000 rpm, 4 $^{\circ}$ C για 30 min και το υπερκείμενο διάλυμα συλλέγεται σε νέα eppendorfs (1.5 mL) όπου και αποθηκεύεται στους -80 $^{\circ}$ C.

3.2.3.10 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων για Western Blot

Προηγήθηκε η εφαρμογή εργαστηριακού πρωτοκόλλου για την προετοιμασία των κυττάρων που θα αποτελέσουν την πηγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για την ανοσοαποτύπωση Western.

Ημέρα 0: Στα κελιά ενός 6× wells-plate προστίθενται 200.000 κύτταρα N2a ανά κελί σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM w/ P.R., L.G. και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂.

Ημέρα 2: Τα κύτταρα εκτίθενται για 48 h σε παρουσία και απουσία 1 µg/mL DOX σε θρεπτικό μέσο DMEM w/o P.R., L.G., εμπλουτισμένο με 10% FBS, το οποίο έχει απενεργοποιηθεί μετά από κατεργασία με ζωάνθρακα (cis DMEM).

Ημέρα 4: Τα κύτταρα παραμένουν είτε ως δείγματα μάρτυρες είτε επωάζονται με 1 µM DEX ή στο συνδυασμό 1 µM DEX και 10 µM RU486, παρουσία και απουσία 1µg/mL DOX σε θρεπτικό μέσο cis DMEM w/o P.R., L.G. για 48 h.

Την έκτη ημέρα, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων με την όλη διαδικασία να πραγματοποιείται στους 4 °C. Αρχικά απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και γίνεται η έκπλυση των wells με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS. Με τη χρήση ειδικού scraper (για 1× και 6× wells-plates) ή ρύγχου πιπέτας (για 24× wells-plate) πραγματοποιείται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων τα οποία μεταφέρονται σε falcon των 15 mL (για 1× well-plate) ή σε σωληνάριο τύπου eppendorf των 1.5 mL (για 6× και 24× wells-plates). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 1000 rpm στους 4 °C και αφού γίνει η απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80 °C.

3.2.3.11 Ομογενοποίηση κυττάρων

Στα πειράματα ανοσοαποτυπώσεως Western το ίζημα των κυττάρων (-80 °C) αφήνεται αρχικά να αποψυχθεί στους 4 °C. Έπειτα αναδιαλύεται σε Sonication Buffer και γίνεται λύση των κυττάρων με υπερήχους με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonicator). Πραγματοποιούνται τρεις επαναλήψεις των 20 sec με ενδιάμεσο διάλειμμα του 1 min, δουλεύοντας στον πάγο (4 °C). Σε επόμενο βήμα, τα κυτταρικά εκχυλίσματα υπόκεινται σε προσδιορισμό της πρωτεϊνικής τους συγκέντρωσης.

3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford [1976], χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Rad. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1 µg/mL έως 1500 µg/mL.

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματική μέθοδος που στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής Coomassie® Brilliant Blue G-250. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με αμινοξέα πρωτεϊνών, οπότε και δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε $\lambda=595$ nm. Τυχόν αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm, είναι ενδεικτική του ποσού της συνδεδεμένης χρωστικής κι ως εκ τούτου της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Σε πρώτο βήμα παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιώντας μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μ L από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα (0 – 20 mg/mL) προστέθηκαν 980 μ L αντιδραστηρίου Bradford 1 \times . Τα διαλύματα (όγκου 1 mL) αναδεύτηκαν και αφέθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, R.T.) στο σκοτάδι. Μετά το πέρας ~30 min (χρονικό όριο ανάπτυξης χρώματος: από 5 έως 60 min), έγινε καλή ανάδευση των διαλυμάτων και ακολούθησε η φασματοφωτομέτρησή τους σε $\lambda=595$ nm.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.ΙΙ.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ BSA

BSA 1 mg/mL (μ L)	Tris 10 mM pH 7.4 (μ L)	Αντιδραστήριο Bradford 1 \times (μ L)	BSA (μ g)	BSA (μ g/ μ L)
0	20	980	0	0
1	19	980	1	1
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Σχεδιάστηκε ένα καρτεσιανό επίπεδο συντεταγμένων, με τις τιμές των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης να αποτελούν τον άξονα των τετμημένων (οριζόντιος άξονας x'x), ενώ οι τιμές των απορροφήσεων που προέκυψαν συνιστούν τον άξονα των τεταγμένων (κατακόρυφος άξονας y'y).

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων είναι δυνατό να υπολογιστεί με βάση την εξίσωση που προκύπτει από τις τιμές της πρότυπης καμπύλης αναφοράς $OD_{595nm}=f(C)$ και εκφράζεται σε μονάδες $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.4 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου κατά Bradford, προετοιμάζονται τα διαλύματα φόρτωσης (loading samples) ώστε να περιέχεται σε αυτά μια σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης ίση με 50 $\mu\text{g}/\text{well}$. Σε eppendords (1.5 mL) προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ομογενοποιημένου εκχυλίσματος κυττάρων, Tris 20 mM pH 7.5 και Sample Buffer 4 \times , ώστε η τελική συγκέντρωση σε διάλυμα φόρτωσης του δείγματος να είναι 1 \times . Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση (loading samples) αποθηκεύονται στους -20 °C.

3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του βιολογικού εκχυλίσματος των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτυπώσεως Western. Απαραίτητο πρώτο βήμα είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, που έγινε σύμφωνα με ένα πρωτοκόλλο ασυνεχούς ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS.

Το SDS καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, φορτίζοντάς τες αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Ως εκ τούτου, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που επιτυγχάνεται με τη κίνησή τους κατά μήκος του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου βασίζεται στη μοριακή τους μάζα (MW). Οι πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μέγεθος παρουσιάζουν αυξημένη τριβή κι έτσι έχουν ελαττωμένη κινητικότητα [John *et al.*, 1991].

Σε πρώτο βήμα προετοιμάζεται η πηκτή της ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή διακρίνεται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το πήκτωμα συσσώρευσης χρησιμεύει για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μια μικρή ζώνη, ώστε κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία αυτές να φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA (Bis-Acrylamide ή bis) σε R.T. με τη βοήθεια των πολυμεριστικών παραγόντων: APS και TEMED. Το TEMED δρα ως επιταχυντής της αντίδρασης πολυμερισμού καταλύοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών θείου που προκύπτουν από το APS, με το τελευταίο να δρα έτσι ως ο απαρχυντής της αντίδρασης.

Η μήτρα εντός της οποίας σχηματίζεται η πηκτή είναι μια επίπεδη διάταξη δύο τζαμιών (επίπεδη ηλεκτροφόρηση) που απέχουν μεταξύ τους 1.0 mm. Οι θέσεις υποδοχής (slots ή wells) δημιουργούνται με την τοποθέτηση ειδικής χτένας στο πήκτωμα συσσώρευσης όσο αυτό είναι ακόμη σε υγρή μορφή.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1×), τόσο στο επάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, έτσι ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πηκτή.

Τα προς φόρτωση δείγματα, αφού αποψυχθούν, υπόκεινται σε θέρμανση (95 °C, για 5 min) σε θερμαντική πλάκα για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και του DNA. Ακολουθεί το φόρτωμά τους στις ειδικές αύλακες, ενώ παράλληλα σε ένα από τα wells φορτώνεται ποσότητα από τον μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό, δημιουργώντας ένα κλειστό σύστημα, στο οποίο διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης ίσο με 0.02 mA.

Πειραματική διαδικασία:

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε μείγμα ακρυλαμιδίου : bis acrylamide αναλογίας 37.5 : 1 (40 % w/v). Οι συστάσεις των πηκτωμάτων αναγράφονται στον Πίνακα 3.III που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.III.

ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ (ΣΤΑΘΕΡΗ = 4%) ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (7.5 % ΓΙΑ IP ΚΑΙ 10 % ΓΙΑ W.B.)

Διαλύματα	Πήκτωμα συσσώρευσης		Πήκτωμα διαχωρισμού	
	4 %	7.5 %	7.5 %	10 %
ddH ₂ O	2025 μL	2738 μL	2738 μL	2425 μL
Tris-HCl 1.5 M pH 6.8	210 μL	-	-	-
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	-	1250 μL	1250 μL	1250 μL
SDS 10 %	25 μL	50 μL	50 μL	50 μL
Bis/Acrylamide 40 %	250 μL	938 μL	938 μL	1250 μL
TEMED	2,5 μL	2,5 μL	2,5 μL	2,5 μL
APS 10 %	12,5 μL	25 μL	25 μL	25 μL

Στην ανοσοαποτύπωση Western το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν πυκνότητας 10%. Η πυκνότητα 10 % χρησιμοποιείται για τον καλύτερο διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού μεγέθους 15-70 kDa. Φορτώθηκαν 20 μ L loading sample/well και 1-2 μ L από το μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών.

Στην ανοσοκατακρήμνιση το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν πυκνότητας 7.5 % και φορτώθηκαν 50 μ L loading sample/well.

3.6 Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blotting)

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται προς εξισορρόπηση εντός ενός παγωμένου (4 °C) διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς ή Transfer Buffer (mild used) για χρονική διάρκεια \geq 10 min. Παράλληλα εμποτίζονται σε παγωμένο διάλυμα Transfer Buffer (new) τέσσερα χαρτιά νιτροκυτταρίνης (W.B. filter papers) και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατάλληλων διαστάσεων, καθώς επίσης και δύο υδροαπορροφητικά σφουγγάρια ίδιων διαστάσεων.

Αφού περάσει ο χρόνος εξισορρόπησης του πηκτώματος διαχωρισμού, ετοιμάζεται η ειδική κασέττα με τα επιμέρους υλικά να τοποθετούνται σε μια διάταξη τύπου sandwich. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η πηκτή τοποθετούνται σε άμεση επαφή μεταξύ τους, ευρισκόμενα ανάμεσα στα υπόλοιπα υλικά. Κατά τη συνάρμοση των υλικών που θα απαρτίσουν την κασέττα, αφαιρούνται οι τυχόν φυσαλίδες με ήπια μηχανική πίεση, ώστε να μην παρεμβληθούν στο σύστημα και επηρεάσουν τη διέλευση των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η κασέττα τοποθετείται με κατάλληλο προσανατολισμό εντός της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, ούτως ώστε η μεταφορά των πρωτεϊνών να γίνεται από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς βρίσκεται τοποθετημένη μέσα σε ένα κουτί από διογκωμένο πολυστυρένιο και περιτριγυρίζεται από παγοκύστες για την αποφυγή της αυξήσεως της θερμοκρασίας κατά την ηλεκτρομεταφορά.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτελείται παρουσία παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Transfer Buffer (new) με την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 350 mA για χρονικό διάστημα 70 min. Ο χρόνος μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς, την πυκνότητα του πηκτώματος και το μέγεθος των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Ακολουθεί σύντομη έκπλυση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε PBS-T (1×, σε ddH₂O) και σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των ζωνών του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10 % σε PBS-T (1×, σε ddH₂O) για 1 h υπό ανάδευση σε R.T., ώστε να δεσμευτούν και να αποκλειστούν οι θέσεις μη ειδικής σύνδεσης. Η μεμβράνη εκπλένεται στιγμιαία με PBS-T (1×, σε ddH₂O) και ακολουθεί η O/N υπό ανάδευση επώασή της στους 4 °C με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Έπειτα, πραγματοποιούνται 4 εκπλύσεις των 5 min σε PBS-T και η μεμβράνη επώαζεται για 1 h σε R.T. με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε 2 % διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά έναντι σταθερών επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι χημικά προσδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Γίνονται 4 εκπλύσεις των 5 min σε PBS-T και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ με κατάλληλο υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP).

Για την αντίδραση εμφάνισης σήματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit της Pierce το οποίο περιλαμβάνει τα διαλύματα ECL A και ECL B. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επώαζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μιας πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέττα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός.

Η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ γίνεται σε σκοτεινό δωμάτιο με χρήση των αντιδραστηρίων του εμπορικού kit της Kodak. Κομμάτι του φιλμ εκτίθεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με επώαση για ~1 min στο διάλυμα Developer, ενδιάμεση έκπλυση σε νερό, επώαση για ~1 min στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) και ξανά έκπλυση σε νερό.

Αφού παρθεί φιλμ με σήμα κατάλληλης έντασης, η μεμβράνη εκπλένεται με PBS-T και αποθηκεύεται στους -20 °C. Είναι σημαντικό η μεμβράνη να μην ξηραίνεται, γι' αυτό και τυλίγεται σε πλαστική διαφανή μεμβράνη πριν από την αποθήκευσή της.

3.7 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS

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

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

3.8 Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

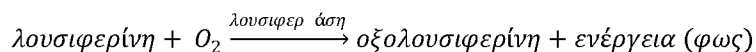
Συνίσταται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες: τη δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης και αυτή της β-γαλακτοσιδάσης. Βάσει των αποτελεσμάτων και των δύο δοκιμασιών, εξάγονται οι τιμές σε κανονικοποιημένη μορφή.

A) Δοκιμασία λουσιφεράσης

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

Αρχή της μεθόδου:

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



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

Πειραματική διαδικασία:

Έπεται της διαδικασίας της διαμολύνσεως (βλέπε § 3.2.3.8 «Παροδική διαμολύνηση κυττάρων»). Όγκος 20 μL από το κυτταρικό εκχύλισμα κάθε δείγματος αναμειγνύεται με 100 μL διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης είναι φωτοευαίσθητο και συνίσταται από 470 μM λουσιφερίνη, 530 μM ATP, 270 μM συνενζύμου A, 20 mM Tris pH 8.0, 2.67 mM

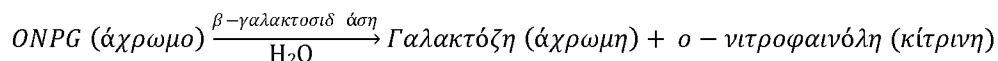
MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, και dH₂O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου.

B) Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν υπόκειται σε έλεγχο μεταγραφής από τον P_{rox1} ούτε από τον GR. Προσδιορίζεται η ενεργότητά της ούτως ώστε να είναι εφικτή η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου της GRE-λουσιφεράσης.

Αρχή της μεθόδου:

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



Η αντίδραση καταστέλλεται με προσθήκη διαλύματος Na₂CO₃ 1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση απενεργοποιείται και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος [Miller, 1972].

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

Πειραματική διαδικασία:

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Bongs και Leonhardt [2000] και έπεται της μεθόδου της διαμολύνσεως (βλέπε § 3.2.3.8 «Παροδική διαμόλυνση κυττάρων»). Όγκος 20 μL κυτταρικού εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα αναμειγνύεται με 0.3 μL διαλύματος ιόντων Mg²⁺ 100× και 201 μL διαλύματος sodium phosphate, δουλεύοντας στην εστία. Το διάλυμα ιόντων Mg²⁺ αποτελείται από 31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v MgCl₂ και 58.5 % v/v ddH₂O. Τελευταίο προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, όγκου 66 μL. Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος (30 min – O/N). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μL διαλύματος Na₂CO₃ 1 M. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε λ=420 nm, αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του μηχανήματος με τον τυφλό σωλήνα. Ο τυφλός σωλήνας περιέχει ό,τι και τα

υπόλοιπα διαλύματα με τη διαφορά πως αντί για δείγμα έχουν προστεθεί 20 μL από το χρησιμοποιηθέν Lysis Buffer.

3.9 Ανοσοκυτταροχημεία

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

Εφαρμόστηκε για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης PEPCK σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A, παρουσία και απουσία του μεταγραφικού παράγοντα Prox1.

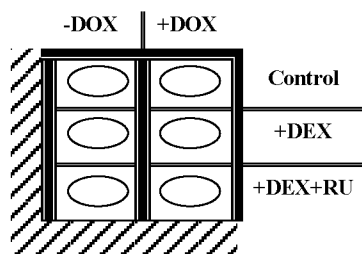
Πειραματική διαδικασία:

Σε 6 wells ενός $24 \times$ wells-plate τοποθετούνται καλυπτρίδες coverslips (1 coverslip/well) και το well αποστειρώνεται με $2 \times$ εκπλύσεις με EtOH 70 % (χημική απολύμανση) και έκθεση σε UV ακτινοβολία για 30 min (αποστείρωση με ακτινοβολία). Η πλάκα ανάπτυξης κυττάρων (plate) τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου (37°C , 5 % CO_2) μέχρι την ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου.

Πειραματικό πρωτόκολλο:

Ημέρα 0: Σε κάθε well της πλάκας ανάπτυξης τοποθετούνται 5×10^4 (10×10^4 cells/mL) κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A σε εμπλουτισμένο (με FBS, L-Glut και P/S) θρεπτικό μέσο DMEM w/ P.R., L.G. και αφήνονται προς ανάπτυξη για 48 h στον κλίβανο (37°C , 5 % CO_2).

Ημέρα 2: Γίνεται επώαση των Prox1-Tet mN(euro)2A με τις ουσίες DEX (1 μM) και το μείγμα ουσιών RU (10 μM) και DEX (1 μM), σε πλήρες θρεπτικό υλικό cis DMEM w/o P.R., L.G. για ≥ 48 h, παρουσία και απουσία DOX τελικής συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Εικόνα. Τα κύτταρα mN(euro)2A αναπτύσσονται επάνω σε καλυπτρίδες coverslips. Τα πηγάδια (wells) στην πλάκα ανάπτυξης διαχωρίζονται ανάλογα με την κατεργασία που θα υποστούν τα κύτταρα. Χωρίζονται ανά ζεύγη σε κύτταρα μάρτυρες, κύτταρα που εκτέθηκαν σε +DEX 1 μM και κύτταρα που εκτέθηκαν στο συνδυασμό +DEX+RU 1 μM και 10 μM , αντίστοιχα. Τα ζεύγη διαχωρίζονται περαιτέρω σε δείγματα που εκφράζουν τον Prox1 ως αποτέλεσμα της επαγωγής του από την ουσία DOX και σε δείγματα που δεν εκφράζουν τον Prox1 (-DOX).

Ημέρα 5: Τα κύτταρα επωάζονται για 30 min στους 37 °C με 200 nM ζωτικής χρωστικής CMX (1:5000), η οποία ενσωματώνεται μόνο από βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων κι έπειτα εφαρμόζεται το πρωτόκολλο μονιμοποίησης. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS κι ακολουθεί η μονιμοποίησή τους με έκθεση σε μεθανόλη (MeOH) στους -20 °C για 10 min. Κατόπιν, γίνεται επώαση με ακετόνη για 2 min στους -20 °C κι ακολουθούν 2× εκπλύσεις με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS.

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

Γίνονται 2× εκπλύσεις σε PBS για 5 min σε R.T., στο σκοτάδι και έπεται επώαση (1 h, R.T., απουσία φωτός) με τα δευτερογενή αντισώματα anti-rabbit Alexa 488 σε αναλογία 1:500 με PBS-T (1×, σε ddH₂O) και Hoechst 33342 σε τελική συγκέντρωση 1 µg/mL μετά από αραιώση 1:1000 αρχικού διαλύματος 1 mg/mL.

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

Σε μετέπειτα χρόνο τα δείγματα αναλύονται σε διάφορες μεγεθύνσεις με μικροσκόπιο φθορισμού DM 2000 της εταιρείας LEICA, εξοπλισμένο με κάμερα DFC420C-234422307 και 2^ο/3^ο-φθάλμιους φακούς 11501500 Phototube HC L1T 4/5/7 Manual-Tube (1-POS), προσοφθάλμιο φακό 11507807 Eyepiece HC PLAN 10×/22 Br. M VISUAL και αντικειμενικούς φακούς N PLAN.

3.10 Ανοσοκατακρήμνιση

Με τη βιοχημική μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης είναι δυνατό να αποφανθούμε για την αλληλεπίδραση ή όχι μεταξύ δύο πρωτεϊνών. Ο συνεντοπισμός των δύο αποτελεί μια καλή ένδειξη για την μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

Καλλιέργεια κυττάρων:

Ημέρα 0: Κύτταρα Prox1-Tet N2a μπαίνουν προς καλλιέργεια σε τρία τρυβλία διαμέτρου 15 cm² σε εμπλουτισμένο (με FBS, L-Glut και P/S) θρεπτικό μέσο DMEM w/ P.R., L.G. και αφήνονται προς ανάπτυξη για 48 h στον κλίβανο (37 °C, 5 % CO₂).

Ημέρα 2: Τα κύτταρα εκτίθενται σε 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DOX για 48 h εντός του επωαστικού κλίβανου (37 °C, 5 % CO₂).

Ημέρα 4: Τα κύτταρα εκπλένονται με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS και μαζεύονται με απόξεση. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1000 rpm στους 4 °C για 5 min και το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80 °C μέχρι την ημέρα εφαρμογής του πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμνισης.

Πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης:

Όλες οι ενέργειες πραγματοποιούνται δουλεύοντας στον πάγο. Σε πρώτο βήμα παρασκευάζεται κατάλληλη ποσότητα μείγματος από σφαιρίδια αγαρόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνες A/G (τα οποία φυλάσσονται σε διαλύτη EtOH 70 %) σε αναλογία 1:1.

Σε τέσσερα eppendorfs (1,5 mL) αναγράφονται οι ενδείξεις "IgG", "2F8 (a)", "2F8 (b)" και "preclearing" και προστίθενται σε κάθε ένα από αυτά από 40 μL μείγματος σφαιριδίων A/G. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 2.000 rpm στους 4 °C για 2 min και απομακρύνεται το υπερκείμενο διάλυμα.

Ακολουθούν 2 \times εκπλύσεις με RIPA Buffer. Η διαδικασία της έκπλυσης (2^ο βήμα) έχει ως εξής: Προστίθεται 1 mL RIPA/eppendorf και τα δείγματα τοποθετούνται στον αναδευτήρα κάθετης ανάδευσης (rotator) στους 4 °C όπου υποβάλλονται σε κυκλική ανακίνηση για 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 2.000 rpm για 2 min στους 4 °C, με το υπερκείμενο διάλυμα να αφαιρείται.

Στα τρία (IgG, 2F8a, 2F8b) εκ των τεσσάρων eppendorfs προστίθενται (3^ο βήμα) τα αντίστοιχα αντισώματα αραιωμένα στην κατάλληλη αναλογία με RIPA Buffer (400 μL RIPA Buffer και 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για τα 2F8 και το mIgG) και υπόκεινται σε κυκλική ανακίνηση στους 4 °C για 4 h.

Σε 4^ο βήμα τα ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύονται σε Lysis Buffer (2100 μL RIPA Buffer, 1 % αναστολείς πρωτεασών από κοκτεϊλ αναστολέων της εταιρείας Roche, 0.2 % DTT και 0.05 % PMSF) και υφίστανται κατεργασία με υπερήχους (sonication). Ακολουθούν 2 \times φυγοκεντρήσεις στις 13.000 rpm στους 4 °C για 30 min, με το υπερκείμενο διάλυμα να μεταφέρεται σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο.

Κατόπιν, εφαρμόζεται η διαδικασία για preclearance (5^ο βήμα). Τα beads του eppendorf με την ένδειξη "preclearing" διαλυτοποιούνται με ποσότητα από το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα και αναδεύονται για 1 h υπό κυκλική ανακίνηση στους 4 °C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις ~7.000 rpm

στους 4 °C για 10 min, με το υπερκείμενο που προκύπτει να καλείται δείγμα προς έκλυση από τη χρωματογραφική στήλη σφαιριδίων αгарόζης προσδεδεμένων με πρωτεΐνες A/G ή δείγμα «load». Εφαρμόζεται η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής του δείγματος «load» σε πρωτεΐνη και μέρος του αποθηκεύεται στους -20 °C.

Αφού περάσει το 4ωρο (βήμα #3) για τα υπόλοιπα δείγματα (IgG, 2F8a, 2F8b), αυτά υπόκεινται σε φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm στους 4 °C για 2 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και σε κάθε erpendorf φορτώνεται ισόποσος όγκος από το δείγμα «load». Τα δείγματα σφαιριδίων και εκχυλίσματος κυττάρων αφήνονται προς επώαση όλη τη νύχτα (O/N) στους 4 °C υπό κυκλική ανακίνηση (rotation).

Μετά από 16-18 h ανακίνηση, τα δείγματα υπόκεινται σε φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm στους 4 °C για 2 min. Τα υπερκείμενα διαλύματα που προκύπτουν αποτελούν τα μη προσδεδεμένα («Unbounded») δείγματα. Αυτά αποθηκεύονται στους -20 °C αφού προηγουμένως εφαρμοστεί η μέθοδος Bradford.

Ακολουθούν εκπλύσεις των ιζημάτων με RIPA Buffer για 5 min στους 4 °C υπό κυκλική ανακίνηση. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 2.000 rpm στους 4 °C για 2 min, με το υπερκείμενο να απορρίπτεται και το βήμα να επαναλαμβάνεται από την αρχή (για σύνολο 4× εκπλύσεις).

Στην τελευταία έκπλυση, με το που αφαιρείται το υπερκείμενο προστίθενται +20 μ L Sample Buffer \times 2 και γίνεται καλό vortexing. Τα δείγματα θερμαίνονται στους 95 °C για 3 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm στους 4 °C για 2 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα erpendorfs και το βήμα επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Τα υπερκείμενα διαλύματα που προκύπτουν σε αυτό το βήμα αντιστοιχούν στα δείγματα ανοσοκατακρήμνισης «IP» και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στα παραπάνω δείγματα πραγματοποιήθηκε σε επόμενο χρόνο πείραμα ανοσοαποτυπώσεως Western σε 7,5 % SDS-PAGE.

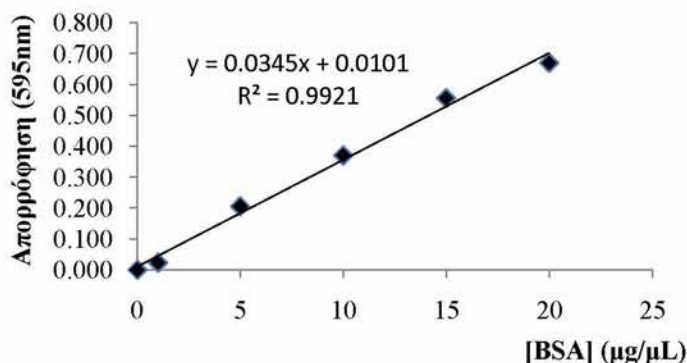
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA

Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάζεται με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 4.1 και στηρίζεται στις απορροφήσεις που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (BSA).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1.
ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ
ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ

BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	OD _{595nm}
0	0
1	0.023
5	0.205
10	0.370
15	0.555
20	0.669



Διάγραμμα 4.1. Πρότυπη καμπύλη $OD_{595nm} = f([BSA])$

Ο συντελεστής συσχέτισης που προκύπτει από τη γραμμή τάσης υποδηλώνει την καλή γραμμικότητα των σημείων. Η πρότυπη καμπύλη έχει εξίσωση ευθείας $y = 0.0345x + 0.0101$.

Βάσει της παραπάνω εξίσωσης ευθείας υπολογίστηκε η πρωτεϊνική συγκέντρωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων και παρασκευάστηκαν τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση.

4.2 Διερεύνηση της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του GR

Για τη μελέτη της επίδρασης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του GR σε νευρικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων mN(euro)2A WT και Prox1-tet mN(euro)2A με τα κατάλληλα πλασμίδια και προσδιορίστηκε η μεταγραφική ενεργότητα του GR μέσω προσδιορισμού της δραστηριότητας της λουσιφεράσης. Με χρήση λιποφεκταμίνης τα κύτταρα mN(euro)2A WT διαμολύνθηκαν: α) με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της β -Gal υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού ιδιοσυστάα ενεργού υποκινητή, β) με πλασμίδιο (MMTV-GRE-Luc) που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή MMTV ο οποίος διαθέτει επαναλαμβανόμενα την ειδική αλληλουχία GRE και γ) με πλασμίδιο pCDNA₃ είτε

χωρίς ένθεμα (control), είτε με ένθεμα το ακέραιο γονίδιο του Prox1, που απαντάται σε ποντίκια. Τα κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια της β-Gal και MMTV-GRE-Luc, αφού με κατάλληλη διαχείριση εκφράζουν ή όχι τον Prox1, με την επαγωγή της μεταγραφής και έκφρασής του να ελέγχεται από την παρουσία της ουσίας δοξυκυκλίνη (DOX). Κατά την καλλιέργειά τους τα κύτταρα εκτέθηκαν στους παράγοντες DEX και RU486, ώστε να μελετηθεί η σχετική μεταγραφική ενεργότητα του GR παρουσία και απουσία αυτών, υπό την επίδραση του Prox1, σε σχέση με κύτταρα μάρτυρες. Η δεξαμεθαζόνη (DEX) είναι ισχυρός αγωνιστής του GR, ενώ η μifeπριστόνη (RU486 ή RU) είναι ανταγωνιστής του.

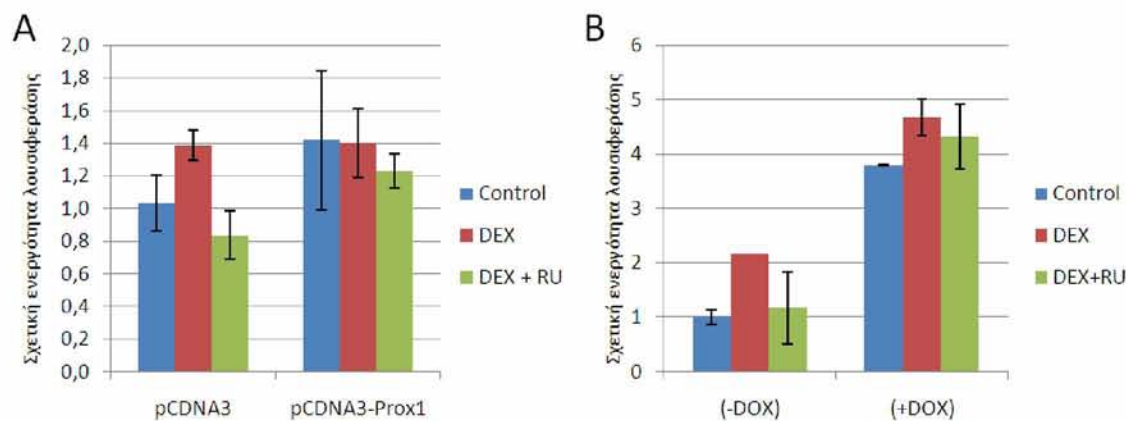
Η β-Gal εκφράζεται με σταθερό ρυθμό σε όλα τα διαμολυσμένα κύτταρα και χρησιμεύει στην κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Η έκφραση της λουσιφεράσης επηρεάζεται από την παρουσία ή απουσία γλυκοκορτικοειδών, αφού υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από το στοιχείο GRE που βρίσκεται στον υποκινητή ανοδικά του γονιδίου της.

Τα αποτελέσματα για τα κύτταρα mN(euro)2A WT φαίνονται στην Εικόνα 4.1, A, ενώ για τα Prox1-Tet mN(euro)2A στην Εικόνα 4.1, B.

Παρουσία DEX παρατηρήθηκε σχετικά αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα της λουσιφεράσης σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες, που υποδεικνύει αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα του GR. Στα κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A η διαφορά αυτή είναι περισσότερο εμφανής σε σχέση με τα κύτταρα mN(euro)2A WT.

Παρουσία RU παρατηρήθηκε καταστολή της από την DEX επαγόμενης ενεργότητας του GR τόσο στα κύτταρα mN(euro)2A WT όσο και στα Prox1-Tet mN(euro)2A.

Παρουσία του Prox1 παρατηρείται επαγωγή της σχετικής μεταγραφικής ενεργότητας του GR είτε απουσία είτε παρουσία των παραγόντων DEX και RU. Η ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Prox1, ακόμα και παρουσία του ανταγωνιστή του GR, αυξάνεται στατιστικά σημαντικά αυξανόμενων των συγκεντρώσεων του Prox1, όπως αποδεικνύεται από την αυξημένη επαγωγή του GR, στις μόνιμα διαμολυσμένες Prox1-Tet mN(euro)2A κυτταρικές σειρές, υπό την επίδραση της δοξυκυκλίνης.



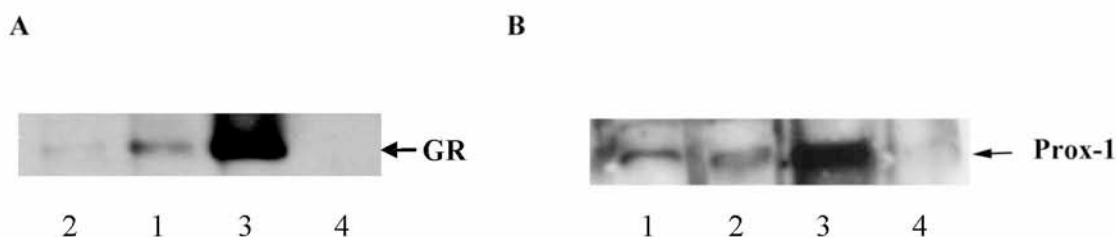
Εικόνα 4.1. Μελέτη της πιθανής επίδρασης του Prox1 στη μεταγραφική ενεργότητα του GR.
A) Κύτταρα mN(euro)2A WT. Έχουν υποστεί παροδική διαμόλυνση με τα πλασμίδια β-Gal, GRE-Luc και με το φορέα έκφρασης pCDNA3 άδειο ή με ένθεμα το γονίδιο του Prox1.
B) Κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A. Η επαγωγή της έκφρασης του Prox1 γίνεται παρουσία της ουσίας DOX. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδια β-Gal και GRE-Luc για τις ανάγκες του πειράματος.

4.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης του GR με το μεταγραφικό παράγοντα Prox1

Με σκοπό τη διερεύνηση του μηχανισμού ελέγχου της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1 πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση κυτταρικού εκχυλίσματος κυττάρων Prox1-Tet mN(euro)2A, τα οποία είχαν υποβληθεί στη δράση δοξυκυκλίνης, με αντίσωμα 2F8 έναντι του GR. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2, η διαδικασία ήταν επιτυχής.

Το δείγμα «load» του κυτταρικού εκχυλίσματος που δεν υποβλήθηκε στη διαδικασία της ανοσοκατακρήμισης (1) διαθέτει μια ποσότητα GR. Το κυτταρικό εκχύλισμα μετά την πραγματοποίηση της ανοσοκατακρήμισης (δείγμα «Unbounded, μη προσδεδεμένο» ή 2) διαθέτει ποσότητα GR μικρότερη από ό,τι το ακατέργαστο εκχύλισμα (δείγμα «load»). Η συγκέντρωση του GR στο δείγμα του προϊόντος ανοσοκατακρήμισης (δείγμα «IP 2F8» ή 3) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από όλα τα υπόλοιπα δείγματα. Στο δείγμα που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα (δείγμα «IP IgG» ή 4) δεν εντοπίζεται GR, όπως και αναμενόταν.

Ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 παρουσιάζει την ίδια εικόνα όπως και ο GR. Μια και ο Prox1 συνανοσοκατακρήμισε με τον GR, αποδεικνύεται πως στις συνθήκες που εκτελέστηκε το πείραμα οι πρωτεΐνες των δύο μεταγραφικών παραγόντων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.



Εικόνα 4.2. Μελέτη παράλληλης ανοσοκατακρήμνισης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 με χρήση αντισώματος έναντι του GR. **A)** Ανοσοαποτύπωση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR. **B)** Ανοσοαποτύπωση με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του μεταγραφικού παράγοντα Prox1. Φαίνονται τα δείγματα 1, 2, 3 και 4.

(1) Εκχύλισμα κυττάρων mN(euro)2A που δεν υποβλήθηκε στη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης. (2) Εκχύλισμα κυττάρων mN(euro)2A μετά την πραγματοποίηση της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης με αντίσωμα έναντι του GR. (3) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων mN(euro)2A με αντίσωμα έναντι του GR (2F8). (4) Προϊόν ανοσοκατακρήμνισης εκχυλίσματος κυττάρων mN(euro)2A με αντισώματα μη ανοσοποιημένου ζώου.

4.4 Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της από GR επαγόμενης PEPCK παρουσία και απουσία Prox1 σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A με ανοσοαποτύπωση Western

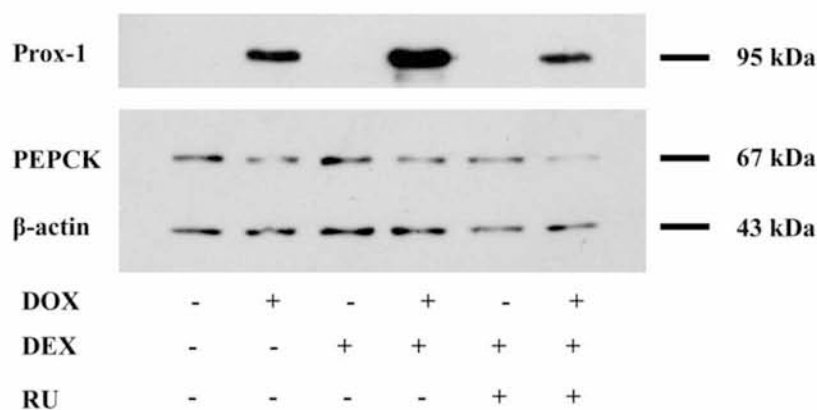
Με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης της αλληλεπίδρασης και συνομιλίας των δύο μεταγραφικών παραγόντων στην έκφραση γνωστών γονιδίων στόχων, μελετήθηκε ο ρόλος δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την PEPCK, γονίδιο στόχο τόσο για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όσο και για τον μεταγραφικό παράγοντα Prox1, όπως αποδεικνύεται από δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας.

Τα κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A εκτέθηκαν σε κατάλληλους συνδυασμούς (παρουσία και απουσία DOX) με σκοπό την επαγωγή ή όχι της υπερέκφρασης του Prox1, παρουσία ή απουσία των παραγόντων DEX και μείγματος DEX+RU σε κατάλληλες συγκεντρώσεις (1 μ M DEX και 10 mM RU). Στη συνέχεια ακολούθησε συλλογή των κυττάρων, λύση τους και συλλογή του κυτταρικού τους εκχυλίσματος. Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη αναφοράς BSA με εξίσωση ευθείας $y = 0.0345x + 0.0101$. Τα δείγματα (25 μ g πρωτεΐνης/lane) διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10 % χρησιμοποιώντας το ασυνεχές σύστημα διαλυμάτων του Laemmli [1970]. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα διαχωρισμού στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης όπου ακολούθησε ο ανοσοεντοπισμός τους με επώαση με κατάλληλα αντισώματα.

Η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Prou1 στις κυτταροκαλλιέργειες Prou1-Tet mN(euro)2A ελεγχόταν από την απουσία ή την παρουσία του αντιβιοτικού DOX σε ένα σύστημα tet-on. Ο προσδέτης DOX προκαλεί την αποδέσμευση του καταστολέα από το DNA, επιτρέποντας τη μεταγραφή και έκφραση του Prou1.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι των Prou1 και PEPCK και τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση το σήμα που έδωσε η ακτίνη, αφού εκφράζεται σταθερά σε όλα τα κύτταρα και τα επίπεδα έκφρασής της δεν υπόκεινται σε έλεγχο από το μεταγραφικό παράγοντα Prou1 ούτε επηρεάζονται από τις ουσίες στις οποίες εκτίθενται τα κύτταρα.

Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης Western φαίνεται στην Εικόνα 4.3. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε τουλάχιστον 2 φορές, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν σταθερή επαναληψιμότητα.



Εικόνα 4.3. Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών PEPCK και Prou1 από εκχυλίσματα κυττάρων Prou1-Tet mN(euro)2A. Η επαγωγή της έκφρασης του Prou1 γίνεται κατά συνθήκη, παρουσία της ουσίας DOX. Η έκφραση της πρωτεΐνης ακτίνης, όπως αποτυπώνεται από τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές ζώνες κατά την ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Διαφαίνεται πως η παρουσία του Prou1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της PEPCK.

Να σημειωθεί πως το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργούνταν τα κύτταρα Prou1-Tet mN(euro)2A είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε συγκέντρωση γλυκόζης, προωθώντας έτσι τη γλυκονογενετική πορεία στα κύτταρα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό χωρίς ερυθρό της φαινόλης, μια και έχει αποδειχτεί πως η χρωστική αυτή παρουσιάζει δράση ασθενούς αγωνιστή για τον GR [Picard and Yamamoto, 1987]. Το θρεπτικό μέσο ήταν εμπλουτισμένο με cis-FBS, για την αποφυγή αποτελεσμάτων που θα παρέπεμπαν ψευδώς σε αγωνιστική δράση των υπό μελέτη παραγόντων.

Παρουσία της δοξυκυκλίνης επαληθεύεται η υπερέκφραση του Prox1 σε σχέση με τα ανερέθιστα κύτταρα.

Παρουσία του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς DEX παρατηρείται μια μικρή αύξηση της συγκέντρωσης της PEPCK σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το ρόλο της δεξαμεθαζόνης στη γλυκονεογενετική διαδικασία ως αγωνιστή του GR.

Παρουσία RU παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της PEPCK. Μάλιστα, συγκρινόμενη με τα δείγματα-μάρτυρες έχει σχεδόν την ίδια συγκέντρωση όπως και στα φυσιολογικά επίπεδα. Από το επίπεδο έκφρασης του γλυκονεογενετικού ενζύμου PEPCK επιβεβαιώνεται ο *in vitro* φαρμακολογικός ανταγωνισμός του GR με την RU (mifepristone), αφού φαίνεται να αναιρεί την επίδραση της από την DEX ενεργοποίησης του GR.

Παρουσία του Prox1 παρατηρείται σαφώς μειωμένη συγκέντρωση της PEPCK είτε απουσία είτε παρουσία των παραγόντων DEX και RU. Η παρουσία του Prox1 αναιρεί και την από τα γλυκοκορτικοειδή αναμενόμενη επαγωγή της έκφρασης της PEPCK. Η μειωμένη συγκέντρωση της PEPCK ανά ζεύγη (+/- Prox1) υποδηλώνει τη συσχέτιση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 με το σηματοδοτικό μονοπάτι της γλυκονεογένεσης στο οποίο εμπλέκεται και ο GR. Φαίνεται πως ο Prox1 επιδρά αρνητικά στη γλυκονεογενετική πορεία, είτε μέσω της μεταγραφικής μειορρύθμισης του GR, είτε/και μέσω ανεξάρτητων κυτταρικών βιοχημικών οδών. Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως ο Prox1 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της γλυκονεογένεσης.

4.5 Έλεγχος των επιπέδων ενδοκυτταρικής έκφρασης της από GR επαγόμενης PEPCK παρουσία και απουσία Prox1 σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A με τη μέθοδο ανοσοκυτταροχημείας

Με σκοπό την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης μελετήθηκε η επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Prox1 στην από γλυκοκορτικοειδή επαγόμενη έκφραση της PEPCK, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A, παρουσία και απουσία της δοξυκυκλίνης. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν επάνω σε καλυπτρίδες σε θρεπτικό υλικό χωρίς ερυθρό της φαινόλης και παρουσία χαμηλής περιεκτικότητας γλυκόζης (1 mg/mL) και από ζωάνθρακα

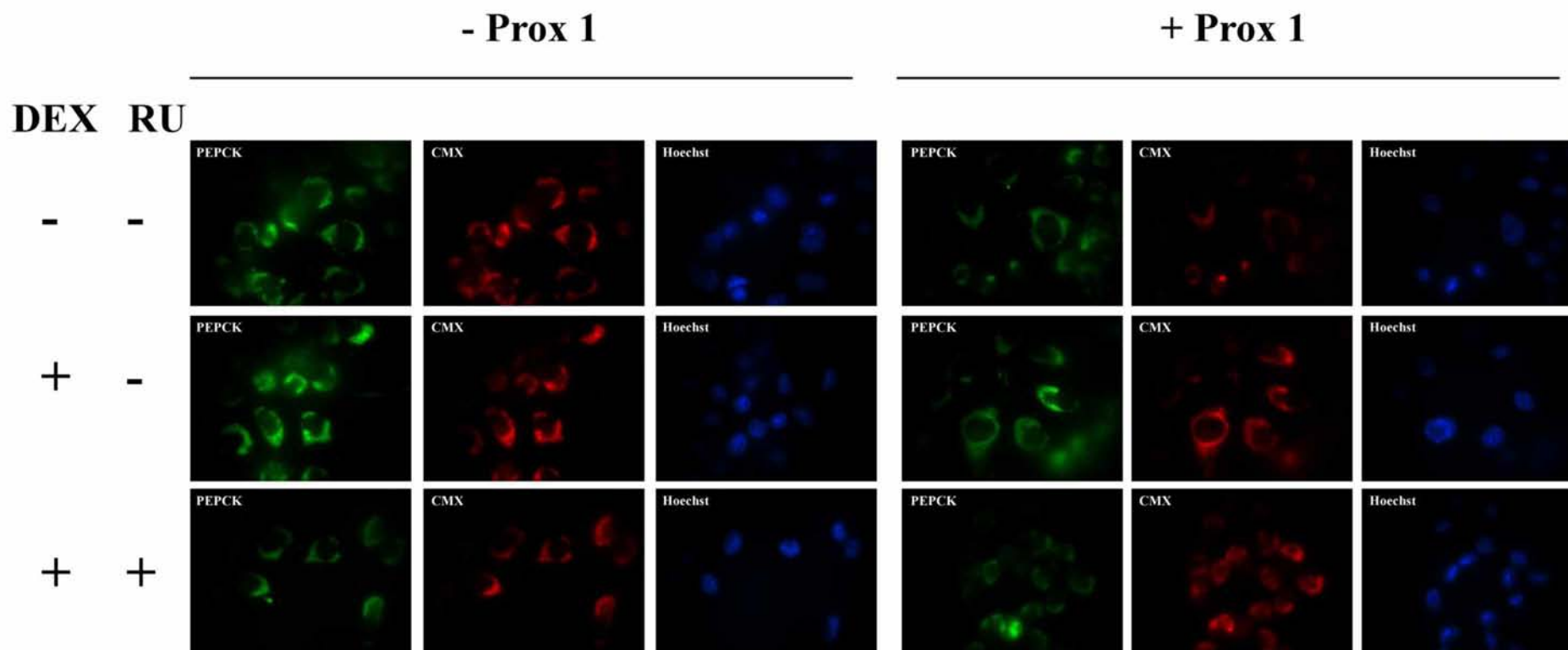
απενεργοποιημένο ορό (cis-FBS). Τα κύτταρα εκτέθηκαν σε κατάλληλες συγκεντρώσεις ουσιών DEX και συνδυασμού RU+DEX για ~72 h.

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

Στην Εικόνα 4.4 των αποτελεσμάτων είναι χαρακτηριστική η κοκκιοειδής τοποθέτηση της PEPCK που μαρτυρεί τον υποκυτταρικό της εντοπισμό στα μιτοχόνδρια.

Η παρουσία και η απουσία του Prol1 έπειτα από επαγωγή της έκφρασής του ως αποτέλεσμα της επώασης ή όχι των κυττάρων με την ουσία DOX επηρέασε σε αισθητό βαθμό τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης της PEPCK, όπως φαίνεται από την ένταση του φθορισμού. Η παρουσία του Prol1 είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, όπως διαφαίνεται από τη μείωση στην ένταση φθορισμού.

Επιπλέον, η συνέκθεση των κυττάρων σε 10 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση RU486 (10 μ M) από ό,τι DEX (1 μ M) είχε ως αποτέλεσμα εμφανή ανασταλτική επίδραση σε ό,τι αφορά την έκφραση του γονιδίου της PEPCK.



Εικόνα 4.4. Αποτελέσματα ανοσοφθορισμού κυττάρων Prox1-Tet mN(euro)2A, παρουσία και απουσία Prox1 και έκθεση στις ουσίες DEX και στο συνδυασμό DEX+RU σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τη χρωστική CMX, μονιμοποιήθηκαν σε MeOH-Acetone και επώαστηκαν σε πρωτογενές αντίσωμα έναντι της PEPCK, με επακόλουθη επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG και Hoechst 33342. Κόκκινη χρώση των μιτοχονδρίων (CMX). Πράσινη χρώση της PEPCK. Μπλε χρώση του πυρήνα (Hoechst).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πληθώρα των βιολογικών διεργασιών οι οποίες ρυθμίζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των γλυκοκορτικοειδών καθιστά τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) ένα μόριο ιδιαίτερης βιοχημικής σημασίας. Δρώντας συνεργιστικά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να ρυθμίζει είτε θετικά είτε αρνητικά την έκφραση γονιδίων στόχων, άμεσα ή έμμεσα, συμμετέχοντας ενεργά στη διατήρηση της φυσιολογίας του οργανισμού [Freedman, 1992; Gupta and Lalchhandama, 2002; Lonard and O'Malley, 2005; Ronacher *et al.*, 2009; Ratman *et al.*, 2012].

Ο GR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πληθώρας βασικών βιολογικών διαδικασιών όπως η ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση και η επαγωγή κυτταρικής απόπτωσης, ενώ παράλληλα μια από τις σημαντικότερες διεργασίες στις οποίες εμπλέκεται είναι ο έλεγχος του μεταβολισμού μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης -μεταξύ άλλων και- ενζύμων της γλυκονεογένεσης [Hanson and Reshef 1997; van Schaftingen and Gerin, 2002; Lee *et al.*, 2010]. Εκφράζεται στην πλειοψηφία των κυτταρικών τύπων ασκώντας γενωμικές ή μη γενωμικές δράσεις. Μέσα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει, δύναται να ασκεί τη μεταγραφική του δραστηριότητα δρώντας ως βασικός ρυθμιστής της μεταγραφής πληθώρας γονιδίων [McKay and Cidlowski, 1999; Le *et al.*, 2005]. Η δράση του GR επιτυγχάνεται κυρίως μέσω ενός συντηρημένου στοιχείου GRE ή nGRE το οποίο εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων του [Beato, 1989; Freedman, 1992; Reichardt *et al.*, 2000; De Bosscher *et al.*, 2003; Dostert and Heinzl, 2004].

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αποτελεί πρωτεϊνικό μόριο που επιδέχεται ρύθμιση της ενεργότητάς του με μηχανισμούς όπως πρόσδεση με ειδικούς αγωνιστές ή ανταγωνιστές, διμερισμό του μορίου του, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια [Reichardt *et al.*, 2000; De Bosscher *et al.*, 2003; Oakley *et al.*, 2011]. Η ρύθμιση αυτή επηρεάζει το αποτέλεσμα έκβασης αρκετών βιολογικών διεργασιών γι' αυτό και η μελέτη της παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ο Prox1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει μεγάλο αριθμό βασικών μεταβολικών διεργασιών, με τη δράση του να εντοπίζεται απαραίτητη από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού [Torri *et al.*, 1999; Wigle and Oliver,

1999; Wigle *et al.*, 1999; Sosa-Pineda *et al.*, 2000; Wigle *et al.*, 2002; Dyer *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2005; Risebro *et al.*, 2009]. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η κατά συνθήκη επαγόμενη έκφραση του Prox1 σε κύτταρα mN(euro)2A οδηγεί σε μείωση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας σε επίπεδο καλλιέργειας [Foskolou *et al.*, 2013].

Η μεταγραφική λειτουργία του Prox1 εξαρτάται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που τυχόν υφίσταται, από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, καθώς και από τον κυτταρικό του εντοπισμό. Αρκετές από τις δράσεις του επιτυγχάνονται μέσω κοινών με τον GR βιολογικών οδών, γι' αυτό και είναι σημαντική η μελέτη της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης. Μεταξύ άλλων, έχει αναφερθεί πως ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 συσχετίζεται με τον υποκινητή του γονιδίου της PEPCK, ενζύμου του οποίου η ρύθμιση ελέγχεται άμεσα από τη μεταγραφική λειτουργική ενεργότητα του GR [Song *et al.*, 2006].

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη δράση του Prox1 έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε νευρικά κύτταρα mN(euro)2A διερευνώντας πιθανούς μηχανισμούς δράσης. Μελετήσαμε τις λειτουργικές συνέπειες που προκύπτουν ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων, στοχεύοντας περαιτέρω σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση της μεταγραφής ενός κοινού τους γονιδίου στόχου, αυτού που κωδικοποιεί για την PEPCK.

Σε προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου μας [Διπλωματική εργασία Κωδούνης, 2011] πειράματα παροδικής διαμόλυνσης καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων ενδομητρίου, κύτταρα HeLa, έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Prox1 ασκεί κατασταλτική δράση στην έκφραση της μεταγραφικής ενεργότητας του ενδογενούς υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Πειράματα χαρακτηρισμού της περιοχής του Prox1, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση της κατασταλτικής αυτής δράσης, έδειξαν ότι χαρακτηριστικές περιοχές του μορίου, όπως η περιοχή σύνδεσης του μορίου με το DNA (DBD), η περιοχή που ευθύνεται για την εκδήλωση της κατασταλτικής του δράσης καθώς και η περιοχή αλληλεπίδρασής του με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς δεν είναι απαραίτητα για την εκδήλωση της εν λόγω δράσης του Prox1. Επιπλέον πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, στον ίδιο τύπο κυττάρων, τα οποία εκφράζουν ενδογενή επίπεδα τόσο GR όσο και Prox1, δεν επέτρεψαν τη διαπίστωση της δυνατότητας αλληλεπίδρασης των δύο μορίων. Παρ' όλα αυτά, πρωταρχικά πειράματά μας επαλήθευσαν την κατασταλτική δράση του Prox1 στην έκφραση της PEPCK σε νευρικά κύτταρα mN(euro)2A.

Η μελέτη της πιθανής συνομιλίας των δύο μεταγραφικών παραγόντων και η διερεύνηση των πιθανών ρυθμιστικών μηχανισμών ελέγχου βασικών κυτταρικών λειτουργιών, που ελέγχονται και από τα δύο μόρια, σε νευρικά κύτταρα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μία από αυτές τις λειτουργίες αποτελεί η διαδικασία της γλυκονεογένεσης [Song *et al.*, 2006] η οποία δεν είναι ενεργοποιημένη σε νευρικά κύτταρα [Shank *et al.*, 1985; Yu *et al.*, 1983; Cesar and Hamprecht, 1993a, 1993b]. Βάσει πληθώρας βιβλιογραφικών δεδομένων τα νευρικά κύτταρα καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες σε γλυκόζη από τα γειτονικά τους αστρογλοϊκά κύτταρα, τα οποία δρουν ως τροφοδότες γλυκόζης ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς της γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης [Psarra *et al.*, 1998; Wiesinger *et al.*, 1997]. Εν τούτοις είναι εξακριβωμένη η παρουσία σε νευρικά κύτταρα τόσο της PEPCK [Zimmer and Magnuson, 1990], σημαντικού ενζύμου της γλυκονεογένεσης ήπατος και άλλων ιστών [Modaressi *et al.*, 1998; Chakravarty *et al.*, 2005], όσο και του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος αποτελεί βασικό ενεργοποιητή της έκφρασης του γονιδίου του μορίου στους αντίστοιχους τύπους κυττάρων. Ο λόγος της παρουσίας της PEPCK σε νευρικά κύτταρα δεν είναι εξακριβωμένος και αποτελεί αντικείμενο μελέτης [Sharma and Patnaik, 1983; Bhattacharya and Datta, 1993; Cruz *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2009]. Η παρουσία της πιθανότατα να σχετίζεται με την κάλυψη ιδιαίτερα αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων υπό μη φυσιολογικές συνθήκες. Βάσει αυτών των βιβλιογραφικών δεδομένων αλλά και των πρωταρχικών μας παρατηρήσεων, η υπόθεση εργασίας μας ήταν ότι η πιθανή κατασταλτική δράση του Prox1 στη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών θα μπορούσε να αποτελέσει ένα βασικό ρυθμιστικό μηχανισμό καταστολής της έκφρασης της PEPCK, ενός μορίου που υπό φυσιολογικές συνθήκες το νευρικό κύτταρο δεν δείχνει να έχει άμεση ανάγκη.

Για την εξακρίβωση της ορθότητας της υπόθεσης αυτής, στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε σε νευρικά κύτταρα η επίδραση του Prox1 στον έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, η πιθανότητα αλληλεπίδρασης των δύο μορίων και η επίδραση του Prox1 στην έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την PEPCK, παρουσία και απουσία ειδικών ενεργοποιητών και απενεργοποιητών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα mN(euro)2A κατάλληλα τροποποιημένα ώστε να υπερεκφράζουν κατά συνθήκη το μεταγραφικό παράγοντα Prox1, Prox1-Tet mN(euro)2A.

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων τα κύτταρα Prox1-Tet mN(euro)2A διατηρούνταν σε καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη. Εξαιτίας του περιβαλλοντικού αυτού ερεθίσματος αστίας, αναμένεται ότι τα κύτταρα θα ενεργοποιήσουν κατά το δυνατό το μηχανισμό της γλυκονεογένεσης προς εξασφάλιση των απαραίτητων επιπέδων γλυκόζης για την κάλυψη των ενεργειακών τους αναγκών και την επιβίωσή τους.

Για την εξακρίβωση της συσχέτισης της δράσης των δύο μεταγραφικών παραγόντων Prox1 και GR, ο έλεγχος της δράσης τους έγινε παρουσία ειδικών αγωνιστών (DEX) και ανταγωνιστών (RU) του GR. Προς αποφυγή παρεμβολής της δράσης κορτικοστεροειδών, που περιλαμβάνονται στον ορό του μέσου ανάπτυξης των κυττάρων, ο ορός είχε υποστεί ειδική κατεργασία προς απομάκρυνση των ενδογενών ορμονών του.

Η διερεύνηση της δράσης τόσο του GR όσο και του Prox1 στην έκφραση του γονιδίου της PEPCK επιτεύχθηκε τόσο με πειράματα ανοσοαποτυπώσεως Western όσο και με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Στα αποτελέσματα και των δύο πειραματικών μεθόδων παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PEPCK υπό την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα Prox1, παρουσία ή απουσία των ειδικών αγωνιστών ή ανταγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα πρωταρχικά αποτελέσματα προηγούμενων μελετών μας.

Οι βελτιωμένες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων μας επέτρεψαν να παρακολουθήσουμε την επαγωγή της έκφρασης της PEPCK παρουσία του κορτικοστεροειδούς DEX, η οποία όμως εκδηλώνεται σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με άλλους κατ' εξοχήν γλυκονεογενετικούς ιστούς όπως το ήπαρ και οι νεφροί. Πιθανόν αυτό να οφείλεται σε ειδικούς μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης της PEPCK στο νευρικό ιστό, οι οποίοι δεν είναι γνωστοί και αποτελούν αντικείμενο διερεύνησης [Yang *et al.*, 2009]. Η μειωμένη επαγωγή της PEPCK παρουσία DEX, πιθανόν να οφείλεται και στην ανταγωνιστική τάση σύνδεσης των κορτικοστεροειδών μεταξύ υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και υποδοχέα αλατοκορτικοειδών σε νευρικά κύτταρα [Joëls and de Kloet, 1998; Chantong *et al.*, 2012]. Όπως αναμενόταν, παρουσία του ανταγωνιστή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης PEPCK. Η μιτοχονδριακή εντόπιση της PEPCK όπως αποδεικνύεται και από τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας, όπου χρησιμοποιήθηκε ειδική χρώση για την εντόπιση των μιτοχονδρίων, αποδεικνύουν επίσης πέρα από την

επαναληψιμότητα των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων και την εξειδίκευση του αντισώματος έναντι της PEPCK.

Προς έκπληξή μας, εφαρμόζοντας τη δοκιμασία προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου της λουσιφεράσης με παροδική διαμόλυνση κυττάρων mN(euro)2A, παρατηρήσαμε ότι ο Prox1 δρα επαγωγικά στη σχετική μεταγραφική ενεργότητα του GR. Η μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης κι επομένως τα επίπεδα έκφρασής της ελέγχονταν από τη λειτουργική δράση του GR, αφού η κωδική της αλληλουχία βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή MMTV που φέρει επαναλαμβανόμενα τη ρυθμιστική περιοχή GRE. Στα βιολογικά εκχυλίσματα των κυττάρων που καλλιεργούνταν παρουσία DOX, με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του Prox1, τα επίπεδα έκφρασης της λουσιφεράσης ήταν σαφώς αυξημένα σε σχέση με όσα καλλιεργούνταν απουσία του Prox1, όπως υποδηλώνεται από την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα της λουσιφεράσης.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός πως ο Prox1 στα παραπάνω διαμολυσμένα κύτταρα ασκούσε επαγωγική δράση ενεργοποίησης της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, ακόμη και παρουσία του γνωστού του ανταγωνιστή, μορίου RU. Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να υποδηλώνει αλληλεπίδραση του Prox1 με τον GR και αλλαγή της διαμόρφωσής του με τρόπο που να οδηγεί σε μετατροπή της ανταγωνιστικής δράσης του RU σε αγωνιστική. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που παρουσιάζουν το RU να δρα ενεργοποιητικά στον GR είτε εφόσον σχηματιστούν τα κατάλληλα σύμπλοκα με μεταγραφικούς παράγοντες συν-ρυθμιστές είτε ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται [Gruol and Altschmied, 1993; Nordeen, 1995; Fryer, 2000; Schulz *et al.*, 2002; Kauppi *et al.*, 2003; Peeters *et al.*, 2008].

Η δυνατότητα αλληλεπίδρασης του Prox1 με τον GR επαληθεύτηκε και με τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοκατακρήμισης κυτταρικών εκχυλισμάτων Prox1-Tet mN(euro)2A τα οποία είχαν εκτεθεί σε κατάλληλες συγκεντρώσεις δοξυκυκλίνης. Τα αυξημένα επίπεδα Prox1, σε συνδυασμό με την υψηλή αποτελεσματικότητα του αντισώματος έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε πειράματα ανοσοκατακρήμισης, όπως αποδεικνύεται από την ένταση των σχετικών πρωτεϊνικών ζωνών, επέτρεψε την εντόπιση των δύο μορίων σε κοινό πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Με την αλληλεπίδραση που υφίστανται είτε άμεσα είτε έμμεσα, μέσω της συνύπαρξής τους σε σύμπλοκο με άλλα μόρια, οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες είναι πιθανόν να ελέγχουν τη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων.

Η μειωμένη έκφραση της PEPCK σε νευρικά κύτταρα, παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Prox1, σε συνδυασμό με τη δράση του ως ενεργοποιητή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR στον ίδιο τύπο κυττάρων ίσως να υποδηλώνει ότι η κατασταλτική δράση του Prox1 στην έκφραση του γονιδίου της PEPCK ενδεχομένως να επιτελείται μέσω ανεξάρτητου σηματοδοτικού μονοπατιού στο οποίο δεν συμμετέχει απαραίτητα ο GR.

Η διαφορική δράση του Prox1, έναντι της ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR στους δύο τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν, HeLa και mN(euro)2A, πιθανόν να υποδηλώνει μια ιστοειδική ρύθμιση η οποία σχετίζεται με τη διαφοροποίηση στη φυσιολογία των δύο τύπων κυττάρων σε συνδυασμό με τη διαφορική εντόπιση και επίπεδα έκφρασης άλλων ρυθμιστικών μορίων.

Η κατανόηση αυτής της διαφορικής δράσης έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μια και θα συμβάλει στην κατανόηση της ρύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας ιστών που διαφοροποιούνται όσον αφορά τις βιολογικές τους λειτουργίες. Προς αυτή την κατεύθυνση ο χαρακτηρισμός των δομικών περιοχών που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των Prox1 και GR, όπως επίσης και των μορίων που συνιστούν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και Prox1 στους δύο τύπους κυττάρων, σε συνδυασμό με το χαρακτηρισμό γονιδίων στόχων, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των δύο μεταγραφικών παραγόντων, χρήζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και αποτελεί αντικείμενο μελλοντικών μας στόχων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία. (2008). Κινάση της φωσφορυλάσης: Μερικός καθαρισμός, κυτταρικός και υλοκυτταρικός εντοπισμός του ενζύμου στο νευρικό ιστό (Διδακτορική διατριβή). ΕΚΠΑ, Αθήνα
- Agca, C., Greenfield, R. B., Hartwell, J. R., and Donkin, S. S. (2002). Cloning and characterization of bovine cytosolic and mitochondrial PEPCK during transition to lactation. *Physiol. Genom.* 11, 53-63
- Anchors, J. M., and Karnovsky, M.L. (1975). Purification of cerebral glucose-6-phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 250:6408-6416.
- Aranda A, Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81(3):1269-304.
- Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., and Hapgood, J. P. (2010). Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 72–88
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 18(1):70-80.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 17(3):245-61. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344.
- Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83(6):851-857.
- Beck, I. M., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Yamamoto, K. R., Haegeman, G., and De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr. Rev.* 30, 830–882.
- Beger C., Gerdes K., Lauten M., Tissing W. J., Fernandez-Munoz I., Schrappe M. and Welte K. (2003). Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br. J. Haematol.* 122, 245–252.
- Belvisi MG, Wicks SL, Battram CH, Bottoms SE, Redford JE, Woodman P, Brown TJ, Webber SE, Foster ML. (2001). Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *J Immunol.* 166(3): 1975-82.
- Bengs M. and Leonhardt AG. (2000). Assay for β-galactosidase activity in extracts from mammalian cells. Ref.: Maniatis p 16.59, 16.60 and 16.66. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.docstoc.com/docs/148347678/Assay-for-b-galactosidase-in-extracts-of-mammalian-cells>.
- Berger, C., Pallavi, S. K., Prasad, M., Shashidhara, L. S. and Technau, G. M. (2005). A critical role for cyclin E in cell fate determination in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Nat. Cell Biol.* 7(1): 56-62.
- Berry, M., Metzger, D., Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9, 2811–2818.
- Bhattacharya BS and Datta GA. (1993). Is brain a gluconeogenic organ? *Molecular and Cellular Biochemistry*. Volume 125, Issue 1, pp 51-57.
- Bi X, Kajava AV, Jones T, Demidenko ZN, Mortin MA. (2003). The carboxy terminus of Prospero regulates its subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* 23(3): 1014–1024.
- Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Consler T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M. et al. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 110: 93–105.
- Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol.* 32(1):76-91.
- Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, et al. (2008). The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell* 14: 535–546.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Breslin M.B., Geng C.-D. and Vedeckis V.W. (2001). Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology.* 15:1381-1395.

- Burgess, S. C., He, T., Yan, Z., Lindner, J., Sherry, A. D., Malloy, C. R., Browning, J. D., and Magnuson, M. A. (2007). Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell. Metab.* 5, 313-320.
- Buttgereit, F., Straub, R. H., Wehling, M. and Burmester, G.-R. (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis & Rheumatism*, 50: 3408–3417.
- Carter, C.J. (1983). Glutamine synthetase and fructose-1,6-biphosphatase activity in the putamen of control and Huntington's disease brain post mortem. *Life Set.* 32:1949-1955.
- Cassuto H, Kochan K, Chakravarty K, Cohen H, Blum B, Olswang Y, Hakimi P, Xu C, Massillon D, Hanson RW, Reshef L. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J. Biol. Chem.*, 280 (40): 33873-84.
- Cesar, M., and Hamprecht, B. (1993a). Immunocytochemical examination of rat glial and neuronal primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J. Neurochem.*, 61(Suppl.):S168C.
- Cesar, M., and Hamprecht, B. (1993b). Immunocytochemical examination of neural primary cultures and brain slices using antibodies raised against pyruvate carboxylase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374:91.
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., and Hanson, R. W. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40(3), 129-154.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10(9):940-54.
- Chantong B, Kratschmar DV, Nashev LG, Balazs Z, Odermatt A. (2012). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation.* 9:260.
- Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, Tremblay AM, Eichner LJ, Arlow DH, Mootha VK, Giguere V. (2010). The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR{alpha}/PGC-1{alpha} bioenergetic functions. *Genes Dev.* 24:537–542.
- Chattoraj, S., and Majumder, A.L. (1986). Modification of brain fructose- 1,6-bisphosphatase activity by chelators: "induction" of 5'-AMP sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139:571-580.
- Chen, J.D., Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454–457.
- Chen Q.J., Delannoy M., Cooke C., Yager D.J. (2004). Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286: E1011–E1022.
- Conaway RC, Conaway JW. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem.* 62:161-90.
- Cruz F, Scott SR, Barroso I, Santisteban P, Cerdán S. (1998). Ontogeny and cellular localization of the pyruvate recycling system in rat brain. *J Neurochem.* 70(6):2613-9.
- Daban C, Vieta E, Mackin P, Young AH. (2005). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 28(2):469-80.
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods.* 33(2):95-103.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO*, 11, 1025-1033.
- Davies, L., Karthikeyan, N., Lynch, J. T., Sial, E. A., Gkourtsa, A., Demonacos, C., and Krstic-Demonacos, M. (2008). Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol.* 22, 1331–1344.
- Davis BJ. (1964). Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 121:404-27.
- Demidenko Z, Badenhorst P, Jones T, Bi X, Mortin MA. (2001). Regulated nuclear export of the homeodomain transcription factor Prospero. *Development.* 128(8):1359–1367.
- De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* 24:488–522.
- de Lange P., Segeren C. M., Koper J. W., Wiemer E., Sonneveld P., Brinkmann A. O., White A., Brogan I. J., de Jong F. H. and Lamberts S. W. (2001). Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res.* 61, 3937–3941.

- Demonacos C., Tsawdaroglou C.N., Djordjevic-Markovic R., Papalopoulou M., Galanopoulos V., Papadogeorgaki S., Sekeris E.C. (1993). Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46: 401–413.
- Deroo, B. J., Rentsch, C., Sampath, S., Young, J., DeFranco, D. B. and Archer, T. K. (2002). Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol. Cell Biol.* 22, 4113–4123.
- Diani-Moore S, Zhang S, Ram P, Rifkind AB. (2013). Aryl hydrocarbon receptor activation by dioxin targets phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) for ADP-ribosylation via TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP). *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M113.458067
- Doe CQ, Chu-LaGraff Q, Wright DM, Scott MP. (1991). The prospero gene specifies cell fates in the Drosophila central nervous system. *Cell*; 65: 451-64.
- Dostert A. and Heinzl T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr. Pharm. Des.* 10, 2807–2816.
- Dudas J, Papoutsi M, Hecht M, et al. (2004). The homeobox transcription factor Prox1 is highly conserved in embryonic hepatoblasts and in adult and transformed hepatocytes, but is absent from bile duct epithelium. *Anat Embryol*; 208: 359-66.
- Dufour CR, Levasseur M-P, Pham NHH, Eichner LJ, Wilson BJ, et al. (2011). Genomic Convergence among ERR α , PROX1, and BMAL1 in the Control of Metabolic Clock Outputs. *PLoS Genet* 7(6): e1002143. doi:10.1371/journal.pgen.1002143.
- Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, Wheeler E, Glazer NL, Bouatia-Naji N, Gloyn AL, et al. (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 42:105–116.
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., Chambon P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* 13, 5370-5382.
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat Genet* 34: 53–58.
- Edwards CRW, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, DeKloet ER and Monder C. (1988). Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, ii, 986–989.
- Elsir T, Smits A, Lindstrom MS, Nister M. (2012). Transcription factor PROX1: its role in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 31:795–805.
- Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854): 889–95.
- Evans SJ, Moore FL, Murray TF. (1998). Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:1–8.
- Faff-Michalak, L., and Albrecht, J. (1991). Aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase activities in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: effects of in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.*, 6:187-197.
- Flagel SB, Vazquez DM, Watson SJ, Jr., Neal CR, Jr. (2002). Effects of Tapering Neonatal Dexamethasone on Rat Growth, Neurodevelopment, and Stress Response. *Am. j. physiol. regul. integr. comp. physiol.* 282: R55-63.
- Foskolou IP, Stellas D, Rozani I, Lavigne MD, Politis PK. (2013). Prox1 suppresses the proliferation of neuroblastoma cells via a dual action in p27-Kip1 and Cdc25A. *Oncogene.* 32(8):947-60.
- Francois M, Harvey NL, Hogan BM. (2011). The transcriptional control of lymphatic vascular development. *Physiology.* 26:146–155.
- Freedman L. P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr. Rev.* 13, 129–145.
- Freedman N. D. and Yamamoto K. R. (2004). Importin γ and Importin α /Importin β Are Nuclear Import Receptors for the Glucocorticoid Receptor. *Mol. Biol. Cell* 15, 2276–2286.
- Frego Lee and Davidson Walter. (2006). Conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the location of cofactor binding sites determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Science.* Volume 15, Issue 4: 722-730
- Fu YK, Amy, Fu Wing-Yu, Ng YK, Alberto, Chien YW, Winnie, Ng Yu-Pong, Wang H, Jerry and Ip Y Nancy. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(17): 6728–6733.

- Gaitan D., DeBold C. R., Turney M. K., Zhou P., Orth D. N. and Kovacs W. J. (1995). Glucocorticoid receptor structure and function in an adrenocorticotropin-secreting small cell lung cancer. *Mol. Endocrinol.* 9, 1193–1201.
- Gallier-Beckley, A. J., and Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61,979–986.
- Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. (1999). Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids.* 64: 107– 119.
- Gehring U, Segnitz B, Foellmer B, Francke U. (1985). Assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor to chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3751–3755.
- Giguère V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev.* 20(5):689-725.
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptors monomers, dimers and heterodimers. *Endocrinol. Rev.* 15, 391-407.
- Goecke I. A., Alvarez C., Henríquez J., Salas K., Molina M. L., Ferreira A. and Gatica H. (2007). Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines in vitro. *Mol. Immunol.* 44, 2115–2123.
- Goldman, S. S., and Witkovsky, P. (1987). Evidence for gluconeogenesis in the amphibian retina. *Exp. Eye Res.*, 44:65-71.
- Goldman, S.S. (1988). Gluconeogenesis in the amphibian retina. *Biochem. J.*, 254:359-365.
- Gottlicher M, Heck S and Herrlich P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76: 480–489.
- Grad I. and Picard D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275, 2–12.
- Green MR. (2000). TBP-associated factors (TAFII): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci.* 25(2):59-63.
- Grünfeld JP and Eloy L. (1987a). Role of glucocorticoids in the regulation of blood pressure [Article in French]. *Presse Med.* 16 (28): 1365-7.
- Grünfeld JP, Eloy L. (1987b). Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Journal Hypertension.* 10(6):608-18.
- Grünfeld JP. (1990). Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Horm Res.* 34 (3-4): 111-3.
- Guiochon-Mantel A, Savouret JF, Quignon F, Delabre K, Milgrom E, De The H. (1995). Effect of PML and PML-RAR on the transactivation properties and subcellular distribution of steroid hormone receptors. *Mol Endocrinol.* 9(12):1791-803.
- Gupta P.B.B. and Lalchandama K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current Science*, Vol. 83, No. 9, 1103-1111.
- Hanson RW, Reshef L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 66:581–611.
- Hanson, R. W. (2009). Thematic minireview series: a perspective on the biology of phosphoenolpyruvate carboxykinase 55 years after its discovery. *J. Biol. Chem.* 284, 27021-27023.
- Harris A, Seckl J. (2011). Glucocorticoids, Prenatal Stress and the Programming of Disease. *Horm. behav.* 59: 279-289.
- Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, et al. (2005). Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet* 37: 1072–1081.
- Hauk P. J., Hamid Q. A., Chrousos G. P. and Leung D. Y. (2000). Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 782–787.
- Hevor, T.K., and Gayet, J. (1978). Fructose-1,6-bisphosphatase and phosphofructokinase activities in the brain of mice submitted to methionine sulfoximine. *Brain Res.*, 150:210-215.
- Hevor, T., and Gayet, J. (1981). Stimulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity and synthesis in the cerebral cortex of rats submitted to the convulsant methionine sulfoximine. *J. Neurochem.*, 36:949-958.
- Hevor, T., Delorme, P., and Gayet, J. (1985). Glycogen content and fructose-1,6-bisphosphatase activity in methionine sulfoximine epileptogenic mouse brain and liver after protein synthesis inhibition. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 11:129-139.
- Hod, Y., Cook, J. S., Weldon, S. L., Short, J. M., Wynshaw-Boris, A., and Hanson, R. W. (1986). Differential expression of the genes for the mitochondrial and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 478, 31-45.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985). Primary structure and expression fo a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635–641.

- Holmstrom, S., Van Antwerp, M. E., and Iñiguez-Lluhi, J. A. (2003). Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15758–15763.
- Holmstrom, S. R., Chupreta, S., So, A. Y., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2008). SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol. Endocrinol.* 22, 2061–2075.
- Hong YK and Detmar M. (2003). Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res*; 314: 85-92.
- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol.* 20(1):53-8.
- Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):55-60.
- Hirata J, Nakagoshi H, Nabeshima Y, Matsuzaki F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature.* 377(6550):627-30.
- Ide, T., Steinke, J., and Cahill, G.F. JR. (1969). Metabolic interactions of glucose, lactate, and 3-hydroxybutyrate in rat brain slices. *Am. J. Physiol.*, 217:784-792.
- Iñiguez-Lluhi, J. A., and Pearce, D. (2000). A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6040–6050.
- Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (2006). Histone deacetylase 2–mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-κB suppression. *J. Exp. Med.* 203, 7–13.
- Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y, Saito H. (1997). Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 235:295–299.
- Iyemere P, Valentine, Davies H, Neil, Brownlee G, George. (1998). The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. *Nucl. Acids Res.* 26 (9): 2098-2104.
- Jenkins B. D., Pullen C. B. and Darimont B. D. (2001). Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 122–126.
- Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM. (1995). Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 15(9):5131-43.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K. L., and Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 43, 33-44.
- Joëls M, de Kloet ER. (1994). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol.* 43(1):1-36.
- John M, Clark JR & Robert L. Switzer. (1991). Ηλεκτροφόρηση σελ. 45, στο Πειραματική Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Kaltezioti V, Kouroupi G, Oikonomaki M, Mantouvalou E, Stergiopoulos A, Charonis A, Rohrer H, Matsas R, Politis PK. (2010). Prox1 regulates the notch1-mediated inhibition of neurogenesis. *PLoS Biol.* 8(12):e1000565.
- Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A, Schwark M, Jagasia R, Taketo MM, Tarabykin V, et al. (2011). Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 108:5807–5812.
- Karin M. (1998). New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: Is DNA binding dispensable? *Cell.* 93:487–490.
- Kastner P, Mark M, Chambon P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 15;83(6):859-69.
- Kauppi B, Jakob C, Färnegårdh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, Calles K, Engström O, Harlan J, Muchmore S, Ramqvist AK, Thorell S, Ohman L, Greer J, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Carlquist M. (2003). The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem.* 278(25):22748-22754.
- Kelly A., Bowen H., Jee Y. K., Mahfiche N., Soh C., Lee T., Hawrylowicz C. and Lavender P. (2008). The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 203–208.
- Kino T., Su Y. A. and Chrousos G. P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3435–3448.

- Kim S. H., Kim D. H., Lavender P., Seo J. H., Kim Y. S., Park J. S., Kwak S. J. and Jee Y. K. (2009). Repression of TNF-alpha-induced IL-8 expression by the glucocorticoid receptor-beta involves inhibition of histone H4 acetylation. *Exp. Mol. Med.* 41, 297–306.
- Kino T., Manoli I., Kelkar S., Wang Y., Su Y. A. and Chrousos G. P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 671–675.
- Kitraki E., Kittas C., Stylianopoulou F. (1997). Glucocorticoid Receptor Gene Expression During Rat Embryogenesis. An in Situ Hybridization Study. *Differentiation.* 62: 21-31.
- Koufali M.M., Moutsatsou P., Sekeris E.C., Breen C.K. (2003). The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria, *Mol. Cell. Endocrinol.* 209: 51–60.
- Krett N. L., Pillay S., Moalli P. A., Greipp P. R. and Rosen S. T. (1995). A Variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res.* 55, 2727–2729.
- Kumar R. and Thompson E. B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 383–394.
- Kumar, R., and Calhoun, W. J. (2008). Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics* 2, 845–854.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- La Fleur, S.E. (2006). The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology and Behavior* Vol. 89, No. 1, pp.110-114.
- Laudet V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor". *J. Mol. Endocrinol.* 19 (3): 207–26.
- Lecompte S, Pasquetti G, Hermant X, Grenier-Boley B, Gonzalez-Gross M, De Henauw S, Molnar D, Stehle P, Beghin L, Moreno LA, et al. (2013). Genetic and molecular insights into the role of PROX1 in glucose metabolism. *Diabetes.* 62:1738–1745.
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., and Michel, D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 143, 3482–3489.
- Lee MW, Chanda D, Yang J, et al. (2010). Regulation of hepatic gluconeogenesis by an ER-bound transcription factor, CREBH. *Cell Metab.* 11:331–339.
- Lee S, Kang J, Yoo J, Ganesan SK, Cook SC, Aguilar B, Ramu S, Lee J, Hong YK. (2009). Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate. *Blood* 113:1856–1859.
- Lemon B, Tjian R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 14(20):2551–69.
- Le P.P., Friedman R.J., Schug J., Brestelli E.J., Parker B.J., Bochkis M.I., Kaestner H.K. (2005). Glucocorticoid Receptor-Dependent Gene Regulatory Networks. *PLoS Genet* 1(2): e16.
- Lewis-Tuffin L. J. and Cidlowski J. A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1069, 1–9.
- Lewis-Tuffin L. J., Jewell C. M., Bienstock R. J., Collins J. B. and Cidlowski J. A. (2007). Human Glucocorticoid Receptor β Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2266–2282.
- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G., and Shih, H. M. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol. Cell* 24, 341–354.
- Lin, Y. Y., Lu, J. Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S. C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J. D., Berger, S. L., and Zhu, H. (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136, 1073-1084.
- Liu, E. and Fromm, H. J. (1988). Purification and characterization of fructose-1,6-biphosphatase from bovine brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260:609-615.
- Lonard D. M. and O'Malley B. W. (2005). Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem. Sci.* 30, 126–132.
- Long, C. N. H., B. Katzin, and E. G. Fry. (1940). The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinol.* 26: 309-344.
- Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. (2006). Notch signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7: 93–102.

- Lu N. Z. and Cidlowski J. A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell* 18, 331–342.
- Lu N. Z., Collins J. B., Grissom S. F. and Cidlowski J. A. (2007). Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7143–7160.
- Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 197(2):189-204.
- Maier Christina, Rünzler Dominik, Schindelar Julia, Grabner Gottfried, Waldhäus Werner, Köhler Gottfried and Luger Anton. (2005). G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *Journal of Cell Science* 118, 3353-3361.
- Majumder, A.L., and Eisenberg, F. (1977). Unequivocal demonstration of fructose-1,6-biphosphatase in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:3222-3226.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83(6):841-50.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6): 835–9.
- Mangos JG, Whitworth AJ, Williamson MP, Kelly JJ. (2003). Glucocorticoids and the kidney. *Nephrology*, 8: 267-273.
- Marino M, Ascenzi P. (2006). Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life.* 58: 716–719.
- McKenna, N.J., O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108, 465-474.
- McKay LI, Cidlowski JA. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 20:435–459.
- McKay LL and Cidlowski A.J. (2003). "Chapter 62: Corticosteroids" in Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. *Hamilton* (ON): BC Decker; 2003. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>
- McNally J. G., Müller W. G., Walker D., Wolford R. and Hager G. L. (2000). The Glucocorticoid Receptor: Rapid Exchange with Regulatory Sites in Living Cells. *Science.* 287 (5456), 1262-1265.
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L and Yamamoto KR. (2009). DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science* 324, 407–410.
- Mendez-Lucas, A., Duarte, J. A., Sunny, N. E., Satapati, S., He, T., Fu, X., Bermudez, J., Burgess, S. C., and Perales, J. C. (2013). PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *J. Hepatol.*, doi: 10.1016/j.jhep.2013.1002.1020.
- Mersmann J. Harry and Harold L. Segal L. Harold. (1969). Control Mechanisms and Biochemical Genetics: Glucocorticoid Control of the Liver Glycogen Synthetase-activating System. *J. Biol. Chem.* 244:1701-1704.
- Miller J. (1972). Experiments in Molecular Genetics, p. 352-355. *Cold Spring Harbor Laboratory*, NY.
- Miner N. Jeffrey. (2002). Designer glucocorticoids. *Biochemical Pharmacology.* 64: 355-361.
- Mitchell PJ, Tjian R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245(4916):371-8.
- Moalli P. A., Pillay S., Krett N. L. and Rosen S. T. (1993). Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 53, 3877–3879.
- Modaressi S, Brechtel K, Christ B, Jungermann K. (1998). Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression. *Biochem J.* 333 (Pt 2):359-66.
- Morand EF, Leech M. (1999). Glucocorticoid regulation of inflammation: the plot thickens. *Inflamm Res.* 48(11):557-60.
- Moutsatsou P, Psarra G.A.-M., Tsiapara A., Paraskevaku H., Davaris P., Sekeris E.C. (2001). Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 386: 69–78.
- Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K. (1997). Prenatal Dexamethasone Exposure Alters Brain Monoamine Metabolism and Adrenocortical Response in Rat Offspring. *Am. j. physiol.* 273: R1669-1675.
- Necela B. M. and Cidlowski J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 239–246.
- Nehmé A., Lobenhofer K.E., Stamer D.W. and Edelman L.J. (2009). Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells. *BMC Med Genomics.* 2: 58.

- Newton R. and Holden N. S. (2007). Separating Transrepression and Transactivation: A Distressing Divorce for the Glucocorticoid Receptor? *Mol. Pharmacol.* 72, 799–809.
- Nichols Mark, Rientjes J.M. Jeanette and Stewart A. Francis. (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *The EMBO Journal.* 17, 765–773.
- Nishijima I, Ohtoshi A. (2006). Characterization of a novel prospero-related homeobox gene, Prox2. *Mol Genet Genomics.* 275(5):471-8.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-143.
- Nomura M, Morohashi K, Kirita S, Nonaka Y, Okamoto M, Nawata H, Omura T. (1993). Three forms of rat CYP11B genes: 11 beta-hydroxylase gene, aldosterone synthase gene, and a novel gene. *J Biochem.* 113(2):144-52.
- Nordeen SK, Bona BJ, Beck CA, Edwards DP, Borror KC, DeFranco DB. (1995). The two faces of a steroid antagonist: when an antagonist isn't. *Steroids.* 60(1):97-104.
- Nordlie, R. C., and Lardy, H. A. (1963). Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *J Biol Chem* 238, 2259-2263.
- Novac N, Heinzel T (2004). Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3 (4): 335–46.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97 (2): 161–3.
- Oakley H. Robert and Cidlowski A. John. (2011). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 3177-3184.
- Ohshige T, Iwata M, Omori S, Tanaka Y, Hirose H, Kaku K, Maegawa H, Watada H, Kashiwagi A, Kawamori R, et al. (2011). Association of new loci identified in European genome-wide association studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese. *PLoS One.* 6:e26911.
- Olefsky JM. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* 276 (40): 36863–4.
- Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ and Gruss P. (1993). Prox 1, a prospero-related homeo-box gene expressed during mouse development. *Mech Dev*; 44: 3-16.
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science.* 252: 1848– 1851.
- Ornstein L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci.* 121:321-49.
- Owen, O. E., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. (2002). *J Biol Chem* 277, 30409-30412.
- Pabo CO, Sauer RT. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem.* 61:1053-95.
- Pedersen, K. B., Geng, C. D., and Vedeckis, W. V. (2004). Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-lymphoblast cell line. *Biochemistry* 43, 10851–10858.
- Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. (2007). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 282: 22278– 22288.
- Peeters BW, Ruigt GS, Craighead M, Kitchener P. (2008). Differential effects of the new glucocorticoid receptor antagonist ORG 34517 and RU486 (mifepristone) on glucocorticoid receptor nuclear translocation in the AtT20 cell line. *Ann N Y Acad Sci.* 1148:536-41.
- Perez-Juste G. and Aranda A. (1999). Differentiation of neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of retinoic acid receptor b gene expression. *Oncogene* 18: 5393–5402.
- Petrova TV, Nykanen A, Norrmen C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglund C, Puolakkainen P, Wempe F, von Melchner H, Gradwohl G, et al. (2008). Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype. *Cancer Cell.* 13:407–419.
- Phelps, C.H. (1975). An ultrastructural study of methionine sulphoximine-induced glycogen accumulation in astrocytes of the mouse cerebral cortex. *J. Neurocytol.*, 4:479-490.
- Phillips, M.E., and Coxon, R.V. (1975). Incorporation of isotopic carbon into cerebral glycogen from non-glucose substrates. *Biochem. J.*, 146:185-189.

- Picard D, Yamamoto KR. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6(11):3333-40.
- Poitry S, Poitry-Yamate C, Ueberfeld J, MacLeish PR, Tsacopoulos M. (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signalling in retinal glial (Müller) cells. *J Neurosci* 20:1809–1821.
- Pratt W. B. and Toft D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360.
- Psarra AM, Pfeiffer B, Giannakopoulou M, Sotiroidis TG, Stylianopoulou F, Hamprecht B. (1998). Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase kinase in rat brain sections and in glial and neuronal primary cultures. *J Neurocytol.* 27(11):779-90.
- Psarra A.-M. G., Bochaton-Piallat L.M., Gabbiani G., Sekeris E.C., Tsacopoulos M. (2003). Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Mueller) cells in the salamander retina. *Glia* 41(1): 38–49.
- Psarra A.-M G., Solakidi S., Trougakos P.I., Margaritis H.L., Spyrou G., Sekeris E.C. (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.
- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006a). 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(1-2):21-33.
- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006b). 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. and Sekeris C.E. (2008a). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta.* 1783(1):1-11.
- Psarra AM, Sekeris CE. (2008b). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life.* 60(4):210-23.
- Psarra, A.-M. G. and Sekeris, C. E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787, 431-436.
- Psarra G. Anna-Maria and Sekeris E. Constantine. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1813, 10: 1814–1821.
- QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. (2012). Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits. pp 17-21. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://tinyurl.com/o4y8kvx>
- Qin J, Gao DM, Jiang QF, Zhou Q, Kong YY, Wang Y, Xie YH. (2004). Prospero-related homeobox (Prox1) is a corepressor of human liver receptor homolog-1 and suppresses the transcription of the cholesterol 7- α -hydroxylase gene. *Mol Endocrinol* 18:2424–2439.
- Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, De Bosscher K. (2012). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol.* pii: S0303-7207(12)00538-2
- Ray D. W., Davis J. R., White A. and Clark A. J. (1996). Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 3276–3280.
- Reichardt M.H., Tuckermann P.J., Bauer A., Schütz G. (2000). Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Zeitschrift für Rheumatologie.* Volume 59, Issue 2 Supplement, pp S1-S5.
- Reid R. Ian. (1998). Glucocorticoid Effects on Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 83 no. 6: 1860-1862.
- Reul JM, de Kloet ER. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117(6):2505-11.
- Risebro CA, Searles RG, Melville AA, Ehler E, Jina N, et al. (2009). Prox1 maintains muscle structure and growth in the developing heart. *Development* 136: 495–505.
- Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S. and Norman M. (1999). Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 4283–4286.
- Rogatsky I. and Ivashkiv L. B. (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68, 1–12.
- Ronacher K, Hadley K, Avenant C, Stubbsrud E, Simons SS Jr, Louw A, Hapgood JP. (2009). Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction. *Mol Cell Endocrinol.* 299(2):219-31.

- Rosenfeld M. G. and Glass C. K. (2001). Coregulator Codes of Transcriptional Regulation by Nuclear Receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 36865–36868.
- Russcher, H., van Rossum, E. F., de Jong, F. H., Brinkmann, A. O., Lamberts, S. W., and Koper, J. W. (2005). Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol. Endocrinol.* 19, 1687–1696.
- Ryter JM, Doe CQ, Matthews BW. (2002). Structure of the DNA binding region of prospero reveals a novel homeo-prospéro domain. *Structure.* 10:1541–1549.
- Saklatvala J. (2002). Glucocorticoids: Do we know how they work? *Arthritis Res.* 4:146–150.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Samuel, V. T., Beddow, S. A., Iwasaki, T., Zhang, X. M., Chu, X., Still, C. D., Gerhard, G. S., and Shulman, G. I. (2009) Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12121-12126.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 7(3):284-301.
- Sauer F, Hansen SK, Tjian R. (1995). Multiple TAFII directing synergistic activation of transcription. *Science.* 270(5243):1783-8.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 96(1):23-43.
- Scheller K., Sekeris E.C., Krohne G., Hock R., Hansen A.I., Scheer U. (2000). Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells, *Eur. J. Cell Biol.* 79: 299–307.
- Scheller K., Seibel P., Sekeris E.C. (2003). Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 222: 1–61.
- Schmoll, D., Gebhardt, R., and Hamprecht, B. (1993a). Regulation of gluconeogenic enzymes in astroglia-rich primary cultures. *J. Neurochem.*, 61(Suppl.):S198D.
- Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta.* 1680:114–128.
- Schulz M, Eggert M, Baniahmad A, Dostert A, Heinzel T, Renkawitz R. (2002). RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem.* 277(29):26238-43.
- Scott DK, Strömstedt PE, Wang JC, Granner DK. (1998). Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Mol Endocrinol.* 12(4):482-91.
- Seckl JR and Walker BR. (2001). 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 142, 1371–1376.
- Shank, R.P., Bennett, G.S., Freytag, S.O., and Campbell, G.L. (1985). Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino-acid transmitterpools. *Brain Res.*, 329:364-367.
- Shao D. and Lazar M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103: 1617–1618.
- Sharma R, Patnaik SK. (1983). Induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase by hydrocortisone in rat liver and brain as a function of age. *Biochem Int.* 7(4):535-40.
- Sigma. (n.d.). Product Number C6241: Charcoal, dextran coated. *Sigma-Aldrich, Inc.* Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c6241pis.Par.0001.File.tmp/c6241pis.pdf.%20Accessed%20November%202009
- Sinclair, D., Webster, M. J., Wong, J., and Weickert, C. S. (2011). Dynamic molecular and anatomical changes in the glucocorticoid receptor in human cortical development. *Mol Psychiatry.* 16(5):504-15.
- Sionov V.R., Cohen O., Kfir S., Zilberman Y., Yefenof E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203: 189–201.
- Slotkin TA, Lappi SE, McCook EC, Tayyeb MI, Eylers JP, Seidler FJ. (1992). Glucocorticoids and the Development of Neuronal Function: Effects of Prenatal Dexamethasone Exposure on Central Noradrenergic Activity. *Biol. neonate.* 61: 326-336.
- Solakidi S., Psarra G. A.-M., Sekeris E.C. (2005a). Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1745: 382–392.

- Solakidi S., Psarra G. A.-M., Nikolaropoulos S., Sekeris E.C. (2005b). Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum. Reprod.* 20: 3481–3487
- Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE. (2007). Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7(3):240-5.
- Song KH, Li T, Chiang JY. (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.
- Song I. H. and Buttgeriet F. (2006). Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246, 142–146.
- Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat. Genet.* 25:254–255.
- Spana, E.P. and Doe, C.Q. (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121: 3187-95.
- Stafford JM, Wilkinson JC, Beechem JM, Granner DK. (2001). Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem.* 276:39885–39891.
- Stahn C, Lowenberg M, Hommes WD and Buttgeriet F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 275: 71–78.
- Stalmans W, Laloux M. (1979). Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr Endocrinol.* 12:517-33.
- Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R. L., Roden, M., Cline, G. W., Shulman, G. I., and Kibbey, R. G. (2009). Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 26578-26590.
- Stavreva D. A., Müller W. G., Hager G. L., Smith C. L. and McNally J. G. (2004). Rapid Glucocorticoid Receptor Exchange at a Promoter Is Coupled to Transcription and Regulated by Chaperones and Proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2682–2697.
- Steffensen KR, Holter E, Bavner A, Nilsson M, Pelto-Huikko M, Tomarev S, Treuter E. (2004). Functional conservation of interactions between a homeodomain cofactor and a mammalian FTZ-F1 homologue. *EMBO Rep.* 5:613–619.
- Takara Bio Company. (2012). Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User manual. Inc. Protocol No. PT3001-1. *Clontech Laboratories.*
- Tansey, W.P., and Herr, W. (1997). Selective use of TBP and TFIIB revealed by a TATA-TBP-TFIIB array with altered specificity. *Science.* 275: 829–831.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology.* 147(12):5549-56.
- Tcherepanova, I., Puigserver, P., Norris, J.D., Spiegelman, B.M. (2000). Modulation of estrogen receptor- α transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J. Biol. Chem.* 273, 30847–30850.
- Theriault A, Boyd E, Harrap BS, Hollenberg MS, Connor MJ. (1989). Regional chromosomal assignment of the human glucocorticoid receptor gene to 5q31. *Human Genetics*, Volume 83, Issue 3, pp 289-291.
- ThermoFisher Scientific Inc. (2013). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=717EAB22-C50E-319F-D227-C1EB41C4343C>
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J., and Jänne, O. A. (2002). Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem. J.* 367, 907–911.
- Tliba O., Cidlowski J. A. and Amrani Y. (2006). CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ by a mechanism involving the up-regulation of the Glucocorticoid Receptor β isoform. *Mol. Pharmacol.* 69, 588–596.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., Chambon, P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*, 333, 185–188.
- Torchilin VP. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 4(2):145-60.
- Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, et al. (1999). Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126: 443–456.
- Tremblay, A., Tremblay, GB., Labrie, F., Giguere V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3, 513-519.

- Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451-486.
- Vaessin H, Grell E, Wolff E, et al. (1991). prospero is expressed in neuronal precursors and encodes a nuclear protein that is involved in the control of axonal outgrowth in *Drosophila*. *Cell*. 67: 941-53.
- van Schaftingen E, Gerin I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J.* 362(Pt 3):513-32.
- Vignali Marissa, Hassan H. Ahmed, Neely E. Kristen and Workman L. Jerry. (2000). ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. *Mol Cell Biol.* 20(6): 1899-1910.
- Walker, R. P., Chen, Z. H., Acheson, R. M., and Leegood, R. C. (2002) Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C4 plant Guinea grass. *Plant Physiol.* 128, 165-172.
- Walker R. Brian. (2007). Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *Eur J Endocrinol.* 157: 545-559.
- Wallace, A. D., and Cidlowski, J. A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276, 42714-42721.
- Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573-26580.
- Wang X., DeFranco D. B. (2005). Alternative Effects of the Ubiquitin-Proteasome Pathway on Glucocorticoid Receptor Down-Regulation and Transactivation Are Mediated by CHIP, an E3 Ligase. *Mol. Endocrinol.* 19, 1474-1482.
- Wang J, Kilic G, Aydin M, Burke Z, Oliver G, Sosa-Pineda B. (2005). Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells. *Dev. Biol.* 286:182-194.
- Wang H, Somers GW, Bashirullah A, Heberlein U, Yu F, et al. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev* 20: 3453-3463.
- Wang, S. C., Myers, S., Dooks, C., Capon, R., and Muscat, G. E. (2009). An ERRbeta/gamma agonist modulates GRalpha expression, and glucocorticoid responsive gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 146-152
- Webster J. C., Oakley R. H., Jewell C. M. and Cidlowski J. A. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative β isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6865-6870.
- Weng M, Golden KL, Lee CY. (2010). dFezf/Earmuff maintains the restricted developmental potential of intermediate neural progenitors in *Drosophila*. *Dev Cell* 18: 126-135.
- Westmoreland JJ, Kilic G, Sartain C, Sirma S, Blain J, Rehg J, Harvey N, Sosa-Pineda B. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas. *Gastroenterology.* 2011;142:999-1009.
- Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia.* 21(1):22-34.
- Wigle JT, Oliver G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98: 769-778.
- Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. (1999). Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 21: 318-322.
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, et al. (2002). An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J.* 21: 1505-1513.
- Wolberger C. (1999). Multiprotein-DNA complexes in transcriptional regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 28:29-56.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* 3, 87-94.
- Yamamoto KR. (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet.* 19:209-252.
- Yamazaki T, Yoshimatsu Y, Morishita Y, Miyazono K, Watabe T. (2009). COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction. *Genes Cells* 14:425-434.
- Yang, J., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. (2009). What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* 284, 27025-27029.
- Yang J, Reshef L, Cassuto H, Aleman G, Hanson RW. (2009). Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem.* 284(40):27031-5.
- Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Itoh T, Suehiro J, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Iwata C, Minami T, et al. (2011). Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *J. Cell Sci.* 124:2753-2762.

- You YN, Short RK, Jourdan M, Klaus AK, Walrand S and Sreekumaran KS. (2009). The Effect of High Glucocorticoid Administration and Food Restriction on Rodent Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Protein Metabolism. *PLoS ONE* 4(4): e5283. doi:10.1371/journal.pone.0005283.
- Yousef MS, Matthews BW. (2005). Structural basis of Prospero-DNA interaction: implications for transcription regulation in developing cells. *Structure*. 13:601–607.
- Yu, A.C., Drejer, J., Hertz, L., and Schousboe, A. (1983). Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J. Neurochem.*, 42:1484–1487.
- Yudt M. R. and Cidlowski J. A. (2001). Molecular identification and characterization of A and B forms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 15, 1093–1103.
- Yudt MR, Cidlowski JA. (2002). The glucocorticoid receptor: Coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol.* 16:1719–1726.
- Zawel L. and Reinberg D. (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.* 64:533–561.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S. M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., and Guan, K. L. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000-1004.
- Zimmer DB and Magnuson MA. (1990). Immunohistochemical localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in adult and developing mouse tissues. *J Histochem Cytochem.* 38: 171-178.