

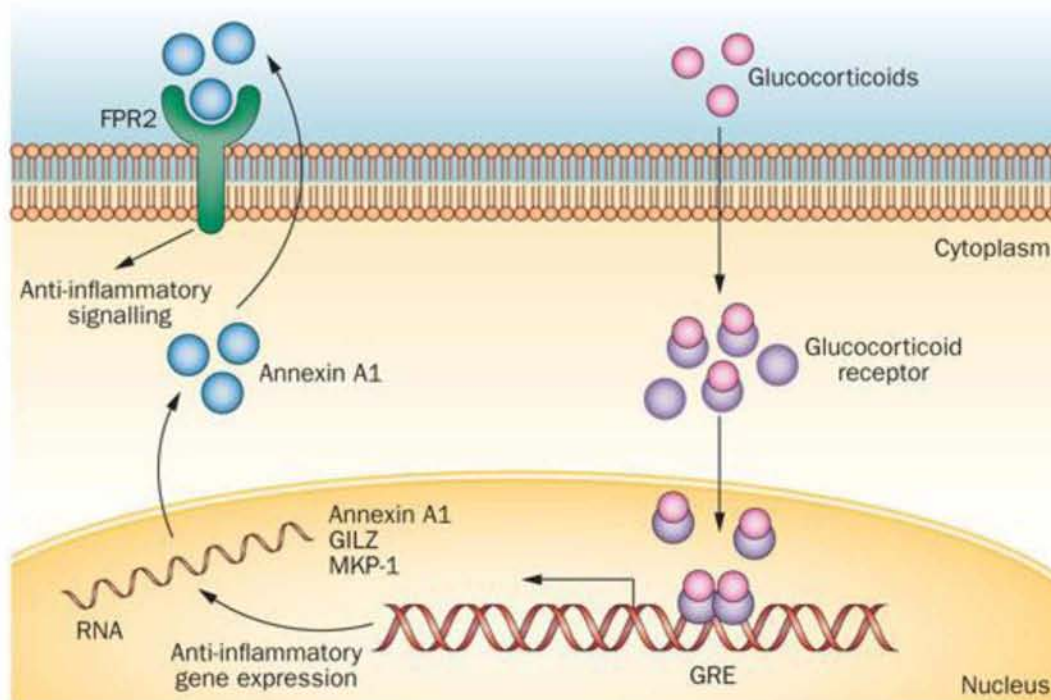


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια: Καρρά Αικατερίνη

Τίτλος διπλωματικής εργασίας : Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη ως πιθανοί εκλεκτικοί ενεργοποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Α.Μ.

Λάρισα, Ακαδημαϊκό Έτος 2016

Διπλωματική Εργασία

Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη ως πιθανοί εκλεκτικοί
ενεργοποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Diploma Project

Protopanaxadiol and Protopanaxatriol as potent selective glucocorticoid
receptor activators

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Α.Μ., Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

Ψαρρά Α.Μ., Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας.

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα Ψαρρά που μου εμπιστεύτηκε την εκτέλεση αυτής της εργασίας και για τον χρόνο που διέθεσε για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδακτορικό φοιτητή, Βύρων Γοργογιέτα για την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, όπως επίσης και τον μετά-διδακτορικό Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη για τη συνεργασία και την παροχή πληροφοριών που αφορούσαν το κομμάτι των ενώσεων. Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας της κα Ψαρρά και ιδιαίτερα την Μαρία Κωνσταντίνου για την άψογη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο όλο αυτό το διάστημα.

Πίνακας περιεχομένων

Abstract	6
Περίληψη.....	7
Εισαγωγή	8
1.Γλυκοκορτικοειδή – Γενικές πληροφορίες	8
2.Δομή γλυκοκορτικοειδών	10
3. Γλυκοκορτικοειδή & Κιρκάδιοι ρυθμοί	12
4.Τα γλυκοκορτικοειδή ως θεραπευτικό μέσο.....	15
5. GR υποδοχέας- Γενικές Πληροφορίες	16
6.Μηχανισμός GR Σηματοδότησης.....	21
7.Απόπτωση	27
8.Επαγόμενη από GCs απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	31
9. Γλυκοκορτικοειδή και γλυκονεογένεση.....	35
10. Τριτερπένια ως εν δυνάμει αντικαρκινικά.....	37
11. Η πρωτοπαναξαδιόλη και η πρωτοπαναξατριόλη ως μελλοντικά φαρμακευτικά σκευάσματα.....	39
Πειραματικό μέρος-Σκοπός.....	40
Υλικά & Μέθοδοι.....	41
1.Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa & COS.7- Γενικές πληροφορίες.....	47
2.Απόψυξη κυττάρων.....	50
3. Θρυψινοποίηση των κυττάρων.....	50
4. Πάγωμα των κυττάρων.....	51
5.Μέτρηση & Στρώσιμο κυττάρων.....	51
6.Ανοσοϊστοχημεία.....	53
7.Western- Blot Analysis.....	57
-Προετοιμασία των δειγμάτων.....	57
-Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS PAGE)	61
-Ανοσοαποτύπωση Western.....	63
- Western Blot για PEPCK, GR, Caspase 3, Caspase 9 & β-actin.....	66
8.Παροδική διαμόλυνση κυττάρων.....	67

9.Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων.....	69
10.Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με pSV40- βGal & pMMTV-GRE-Luc.....	67
11.Πρωτόκολλο λουσιφεράσης.....	69
Πρωτόκολλο β-γαλακτοζιδάσης.....	70
12.Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια με pSV40- βGal & pMMTV- NF-κB-Luc.....	71
13.Παροδική διαμόλυνση κυττάρων COS.7 με τα πλασμίδια pSV40- βGal & pMMTV- NF-κB-Luc.....	72
Αποτελέσματα.....	74
1.Οι g-PPD και g-PPT επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα.....	74
2.Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στην GR μεταγραφική δραστικότητα.....	75
3.Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK.....	77
4.Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στην μεταγραφική δραστικότητα του NF-κβ.....	77
5.Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στην μεταγραφική δραστικότητα του NF-κβ σε κύτταρα COS.7.....	78
Συζήτηση.....	79
Βιβλιογραφία.....	81

Abstract

Glucocorticoids (GCS) are steroid hormones exert their actions through the glucocorticoid receptor (GR). GR belongs to the family of nuclear receptors, and acts primarily as a hormone-ligand activated transcription factor. In this way, the GR controls the expression of many genes and thus regulates many cellular functions, such as cell growth and metabolism, immune response and apoptosis. Because of their anti-inflammatory action, GCs are systematically used to control many chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, psoriasis, multiple sclerosis, or also be administered topically to patients suffering from asthma, allergic rhinitis and skin allergies. Although, their positive effects, in such diseases, chronic use of glucocorticoids leads to adverse side effects, such as diabetes, osteoporosis, muscle weakness, the occurrence of delayed growth in children, impaired water balance, fat redistribution, changes in disposal and suppression of the HPA axis. Therefore, it is necessary to find selective agonists of the glucocorticoid receptor (SEGRA), which will have the same effect as the GCs, but with reduced side effects. In the present study, we investigated whether two triterpenoid compounds, the protopanaxadiol (gPPD) and protopanaxatriol (gPPT) exert their action through GR receptor and if they display anti-inflammatory activity. Initially, immunohistochemistry experiments were performed in HeLa cells, which showed GR translocation to the nucleus. Western immunoblotting experiments followed, which showed no effect on expression levels of PEPCK, a GR target gene that takes part in glucose metabolism. Subsequently, by applying luciferase-galactosidase reporter assays, we concluded that the triterpenoid compounds, suppress the transcriptional activity of NF- κ B. Also, with luciferase-galactosidase experiments in COS.7 cells, which express GR in low rates, we have shown that anti-inflammatory activity of g-PPD and g-PPT is diminished indicated that it exerted through GR signaling. In conclusion, our results indicate that the g-PPD and g-PPT may be further analyzed as putative selective agonists of the glucocorticoid receptor with potential for therapeutic use.

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCS) είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και δρα κυρίως ως μεταγραφικός παράγοντας, μετά από την ενεργοποίηση του από την ορμόνη-προσδέτη. Με αυτόν τον τρόπο ο GR ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων και κατά συνέπεια ρυθμίζει πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και ο μεταβολισμός, η ανοσολογική απόκριση και η απόπτωση. Εξαιτίας της αντιφλεγμονώδους δράσης τους, τα GCs χρησιμοποιούνται συστηματικά για τον έλεγχο πολλών ασθενειών με χρόνια φλεγμονή όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου, η ψωρίαση, η σκλήρυνση κατά πλάκας, ή χορηγούνται επίσης τοπικά σε ασθενείς που πάσχουν από άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα και δερματικές αλλεργίες. Παρά τις θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε τέτοιου είδους ασθένειες, η χρόνια χρήση τους οδηγεί σε δυσμενείς παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η μυϊκή εξασθένιση, η εμφάνιση καθυστερημένης ανάπτυξης στα παιδιά, διαταραχές στο ισοζύγιο του νερού, ανακατανομή του λίπους, διαταραχές στη διάθεση και καταστολή του άξονα HPA. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA), οι οποίοι θα διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση των GCs, αλλά με μειωμένες παρενέργειες. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε εάν δυο τριτερπενοειδείς ενώσεις, η πρωτοπαναξαδιόλη και η πρωτοπαναξατριόλη ασκούν την δράση τους μέσω του υποδοχέα GR και εάν θα μπορούσαν να αποτελέσουν SEGRA. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, σε κύτταρα HeLa, τα οποία έδειχναν μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τα οποία έδειξαν μη επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, ενός γονιδίου στόχου του GR, που συμμετέχει στον μεταβολισμό της γλυκόζης. Στη συνέχεια, διεξάγοντας δοκιμασίες λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης συμπεράναμε ότι οι τριτερπενοειδείς αυτές ενώσεις, καταστέλλουν την μεταγραφική δραστηριότητα του NFκ-B. Επίσης, με πειράματα λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης σε COS.7 κύτταρα, τα οποία εκφράζουν τον GR σε χαμηλά ποσοστά, δείξαμε ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της g-PPD και g-PPT, περιορίζεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανασταλτική τους δράση επί της δραστηριότητας του NF-κΒ διαμεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον GR. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η g-PPD και η g-PPT μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και μετά από περαιτέρω μελέτες να αξιοποιηθούν για εν δυνάμει θεραπευτική χρήση.

Εισαγωγή

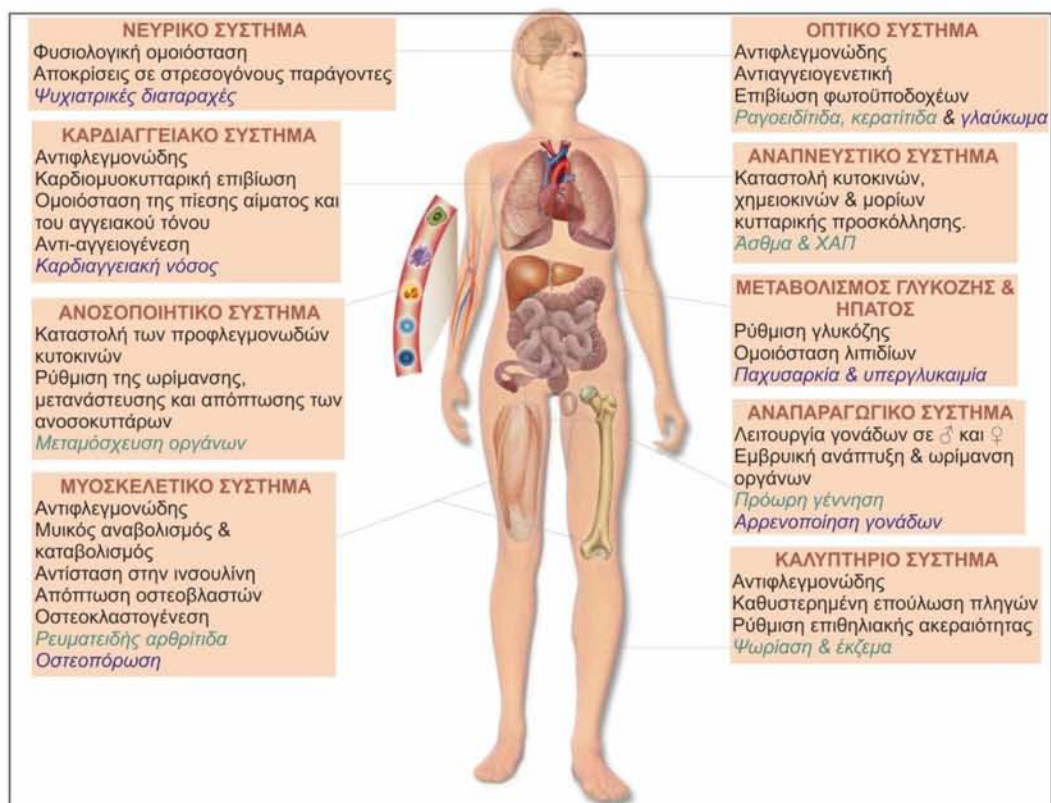
1. Γλυκοκορτικοειδή – Γενικές πληροφορίες

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) έχουν κρίσιμη σημασία ως ρυθμιστές μιας ευρείας ποικιλίας θεμελιωδών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της μεταβολικής ομοιόστασης, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων, της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής. Σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις, τα GCs εμφανίζουν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Γι' αυτό πολλές αυτοάνοσες, φλεγμονώδεις και αλλεργικές διαταραχές, όπως το άσθμα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ελκώδης κολίτιδα και η αλλεργική ρινίτιδα (Prigent et al., 2004), συχνά αντιμετωπίζονται με συνθετικά GCs, όπως η δεξαμεθαζόνη και η πρεδνιζολόνη. Παρά την εξαιρετική αντιφλεγμονώδη αποτελεσματικότητά τους, η χρήση των GCs ως θεραπευτικό μέσο συχνά αποφεύγεται γιατί έχουν εντοπιστεί δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Πρώτον, η μακροχρόνια θεραπεία με GCs συνοδεύεται συχνά από σοβαρές παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η υπέρταση, και η μυϊκή ατροφία. Δεύτερον, η εμφάνιση αντοχής στα GCs περιορίζει επίσης την επιτυχία πολλών θεραπειών που βασίζονται σ' αυτά (Vandevyver et al., 2013).

Η πρωτοποριακή ανακάλυψη των αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων της «ένωσης Ε» ή κορτιζόνης από τους Hench και Kendall το 1948 (ο Hench έχει λάβει βραβείο Νόμπελ το 1950 για την έρευνά του σ' αυτό το θέμα, η ομιλία του για την απονομή του βραβείου βρίσκεται στη διεύθυνση: Edward C. Kendall. The development of cortisone as a therapeutic agent. Nobel Lecture, December 11, 1950. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1950/kendall-lecture.pdf), σηματοδότησε την έναρξη της ικανότητας των γιατρών για τη θεραπεία και τον έλεγχο των αυτοάνοσων νοσημάτων. Από τότε, τα GCs έγιναν ο ακρογωνιαίος λίθος για τη θεραπεία των ρευματικών παθήσεων, με θεραπευτικά σχήματα και μορφές χορήγησης που αλλάζουν διαρκώς τις τελευταίες δεκαετίες, μετά από προσαρμογή στα πιο πρόσφατα κάθε φορά επιστημονικά ευρήματα. Στην πραγματικότητα, αμέσως μετά την επιτυχή χρήση των φαρμακευτικών σκευασμάτων κορτιζόνης, ο Hench αντιλήφθηκε τις αρνητικές επιπτώσεις της ως αλατοκορτικοειδούς, δηλαδή την κατακράτηση νατρίου/νερού και την απώλεια καλίου (Alten and Wiebe, 2015). Ο

αρχικός ενθουσιασμός μειώθηκε περισσότερο από μια δημοσίευση του 1952, από τους Fraser et al. (Fraser CG, Preuss FS, Bigford WD 1952. Adrenal atrophy and irreversible shock associated with cortisone therapy. J Am Med Assoc 149: 1542–1543). Ανέφεραν τη μετεγχειρητική κατάρρευση και το θάνατο μιας γυναίκας που είχε λάβει πρεδνιζολόνη για 6 μήνες. Στη μεταθανάτια ανάλυση, βρέθηκε ατροφία των δύο επινεφριδίων. Περαιτέρω αναφορές που συσσωρεύτηκαν, όπως των Jasani et al. (1968) δείχνουν ότι η επαγόμενη από κορτικοστεροειδή καταστολή των επινεφριδίων οδηγεί σε σοβαρές μετεγχειρητικές επιπλοκές. Με την αύξηση της γνώσης σχετικά με τις επιπλοκές της μακροχρόνιας θεραπείας με κορτικοστεροειδή σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), ο ουσιαστικός ρόλος του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) και η ευαισθησία του στην καταστολή από εξωγενή γλυκοκορτικοειδή (GCs), έχουν επισημανθεί πλέον. Στο πλαίσιο των δυσμενών επιπτώσεων που συνδέονται με τα GCs, συνεχίζει να αποτελεί μεγάλη πρόκληση η εύρεση μιας θεραπευτικής αγωγής που ελαχιστοποιεί τις περιοριστικές παρενέργειες, ενώ εξασφαλίζει ταυτόχρονα βέλτιστο έλεγχο των συμπτωμάτων και των αυτο-φλεγμονωδών διαδικασιών (Alten and Wiebe, 2015).

Η περίσσεια GCs έχει συνδεθεί με κλινικές παρατηρήσεις που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο. Στο σύνδρομο του Cushing (Arnaldi et al., 2003), η αυξημένη έκκριση των GCs που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε αδένωμα της υπόφυσης, οδηγεί στην κεντρική παχυσαρκία, την υπέρταση, την υπερλιπιδαιμία και τη δυσανεξία στη γλυκόζη, μια ομάδα μεταβολικών ανωμαλιών που θυμίζει το μεταβολικό σύνδρομο. Η διόρθωση της υπερκορτιζολαιμίας με διασφηνοειδική χειρουργική επέμβαση, τουλάχιστον ομαλοποιεί την αρτηριακή πίεση. Επιπλέον, η κλινική χορήγηση των GCs για τη θεραπεία της οξείας και χρόνιας φλεγμονώδους νόσου, έχει συσχετισθεί με ανεπιθύμητες μεταβολικές ενέργειες όπως η υπέρταση, η παχυσαρκία, η υπερλιπιδαιμία και η αντίσταση στην ινσουλίνη, όπως και στο μεταβολικό σύνδρομο. Αυτά τα κλινικά ευρήματα υποδεικνύουν ότι η δράση των GCs θα μπορούσε να διαδραματίσει ένα ρόλο στην παθοφυσιολογία του μεταβολικού συνδρόμου (Wang, 2005).



Εικόνα 1. Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στην υγεία και την ασθένεια. Η εικόνα αναπαριστά τους ρόλους των γλυκοκορτικοειδών σε μεγάλα συστήματα οργάνων του ανθρώπινου σώματος (ασπρόμαυρο κείμενο), τον ευεργετικό ρόλο των γλυκοκορτικοειδών κλινικά (κείμενο με πράσινο χρώμα) και τις δυσμενείς εκβάσεις σε ασθενείς με αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών (κείμενο με μπλε χρώμα) (Kadmiel and Cidlowski, 2013).

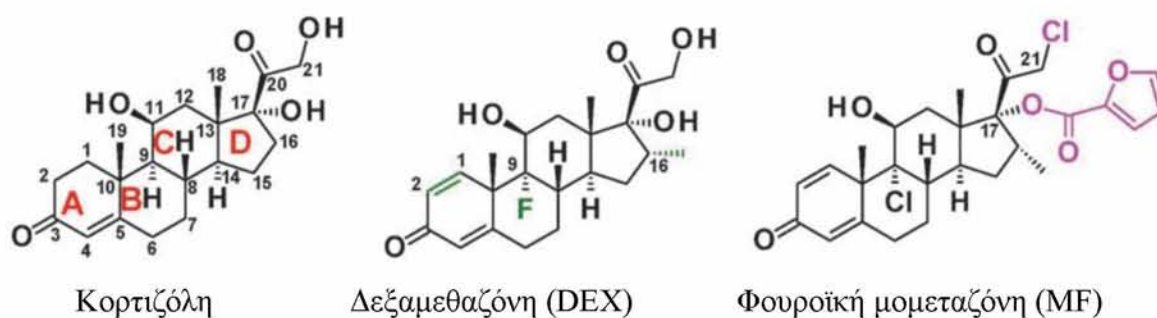
2. Δομή γλυκοκορτικοειδών

Τα GCs είναι μια κατηγορία στεροειδών ορμονών που παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων. Το όνομα γλυκοκορτικοειδές προέρχεται από 3 λέξεις: γλυκόζη, φλοιός (cortex) και στεροειδές. Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης, συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων και έχουν στεροειδή δομή, γι' αυτό και το ονομά τους. Οι δομές των γλυκοκορτικοειδών, όπως και των άλλων στεροειδών ορμονών βασίζονται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων. Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ, Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από τον δακτύλιο Α. Οι 3 εξαμελείς δακτύλιοι Α, Β, Γ υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανακλίντρου. Λόγω της δύσκαμπτης γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή των κυκλοεξανίων.

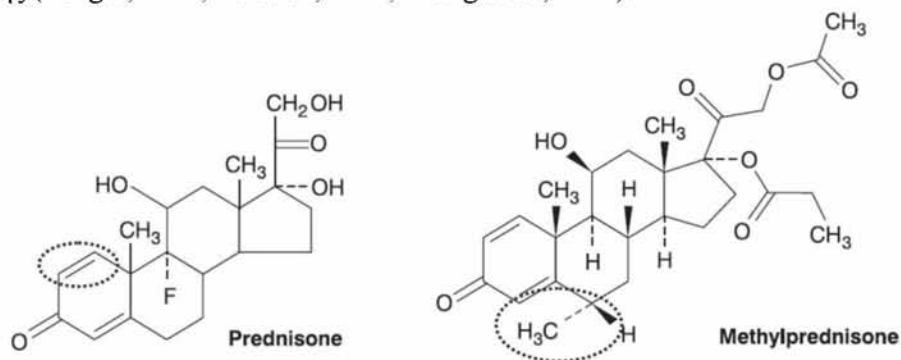
Η κορτιζόλη (που ονομάζεται επίσης υδροκορτιζόνη) είναι το μείζον φυσικό γλυκοκορτικοειδές, υπεύθυνο για την φλεγμονώδη αντίδραση, τη ρύθμιση της πίεσης

του αίματος, την απελευθέρωση ινσουλίνης για την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα και το μεταβολισμό (Zhang et al., 2014). Η κορτιζόλη έχει μια σχετικά χαμηλή ισχύ (potency) και ικανότητα δέσμευσης του υποδοχέα, σε σύγκριση με τα συνήθως χρησιμοποιούμενα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη (DEX) (He et al., 2014). Συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην κλινική πρακτική πριν από 50 χρόνια και πλέον (Zhang et al., 2014).

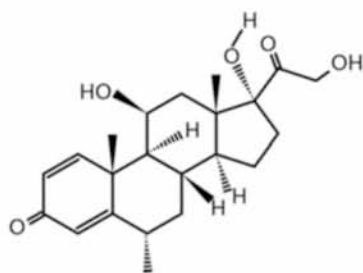
Η φουροϊκή μομεταζόνη (MF) είναι ένα ισχυρό γλυκοκορτικοειδές που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της φλεγμονώδους διαταραχής του δέρματος (Elocon), του άσθματος (Asmanex) και της φλεγμονής των ρινικών κόλπων (Nasonex). Η MF έχει μία λιπόφιλη ομάδα φουροϊκού εστέρα στη C-17α θέση (site) του στεροειδούς D δακτυλίου, που πιστεύεται ότι αποτελεί την προέλευση της υψηλής ισχύος της (He et al., 2014).



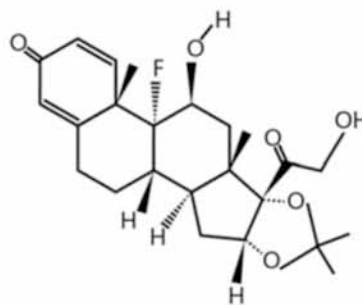
Εικόνα 2. Ισχύς και χημικές συγγένειες της κορτιζόλης, της DEX και της MF. Η μεταβολή των χημικών δομών της κορτιζόλης, της DEX και της MF συσχετίζεται με την εξέλιξη των γλυκοκορτικοειδών από χαμηλή σε υψηλή ισχύ (potency). Η δομή της κορτιζόλης περιέχει μια στεροειδή βασική δομή 4 δακτυλίων και η DEX διαφέρει από την κορτιζόλη κατά έναν επιπλέον Δ1 (C1-C2) διπλό δεσμό, μια C-16 α-μεθυλ- και μια C-9 α-φθορο- ομάδα (μεσαίο σχήμα, πράσινο χρώμα). Η MF με τη σειρά της διαφέρει από τη DEX κατά μια C-9 χλωρο-αντί για φθορο- ομάδα και τροποποιείται περαιτέρω με την προσθήκη μιας C-21 α-χλωρο-ομάδας και, το πιο σημαντικό, κατά μια λιπόφιλη ομάδα φουροϊκού εστέρα στον C-17α (σχήμα αριστερά, μωβ χρώμα), αντικαθιστώντας την ομάδα υδροξυλίου της DEX και της κορτιζόλης (Longui, 2007; He et al., 2014; Zhang et al., 2014).



Εικόνα 3. Χημική δομή της πρεδνιζόνης και της μεθυλπρεδνιζόνης (Longui, 2007).



Μεθυλπρεδνιζολόνη



Ακετονίδιο της τριαμκινολόνης

Εικόνα 4. Οι δομές της μεθυλπρεδνιζολόνης και του τριαμκινολονακετονιδίου (Προσαρμοσμένο από: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6741#section=Top> και <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436#section=Top>) (Zhang et al., 2014).

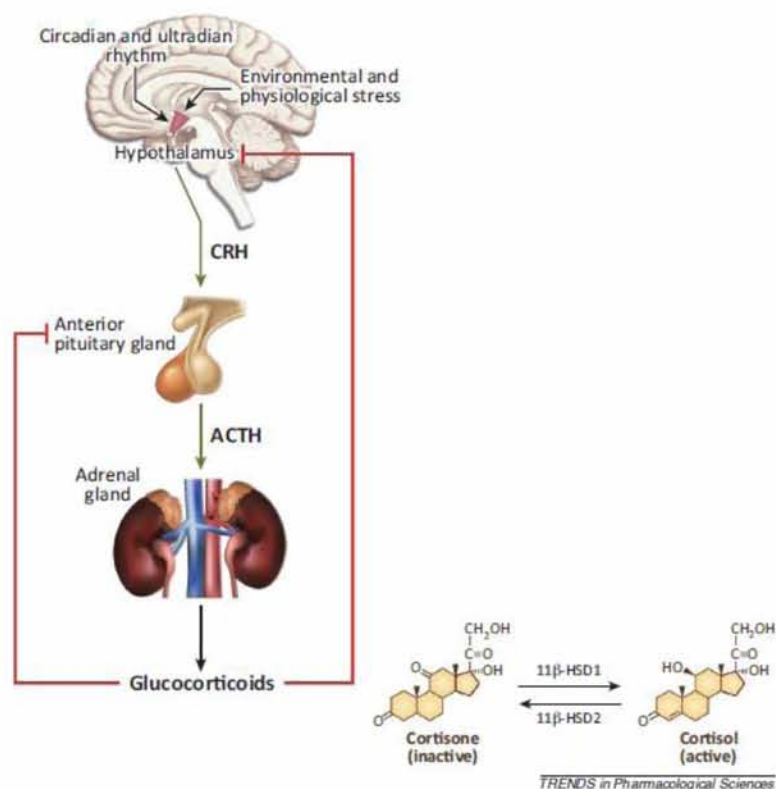
Η δεξαμεθαζόνη, η μεθυλπρεδνιζολόνη και το ακετονίδιο της τριαμκινολόνης χρησιμοποιούνται στη θεραπεία οφθαλμολογικών ασθενειών. Η βηταμεθαζόνη που αποτελεί ανάλογο της δεξαμεθαζόνης, περιέχει μια 16β-μεθυλομάδα (η δεξαμεθαζόνη περιέχει μία 16-μεθυλομάδα). Αυτή η διαμόρφωση έχει ως αποτέλεσμα να είναι η βηταμεθαζόνη οριακά πιο δραστική από τη δεξαμεθαζόνη. Σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη και τη μεθυλπρεδνιζολόνη, το 9α-φθορο συστατικό στο ακετονίδιο της τριαμκινολόνης αυξάνει την αντιφλεγμονώδη δράση της και την ισχύ της ως αλατοκορτικοειδές (Zhang et al., 2014).

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες αυτών των γλυκοκορτικοειδών ποικίλλουν με βάση τη χημική τους δομή. Για παράδειγμα, η 16α-μεθυλομάδα, αλλά όχι η 16α-υδροξυλομάδα στη δεξαμεθαζόνη, αυξάνει την σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα της τριαμκινολόνης, αυξάνοντας τη λιποφιλικότητα και, με τη σειρά της, τη (χημική) συγγένεια του υποδοχέα του φαρμάκου σε ανθρώπινους ιστούς (Zhang et al., 2014).

3.Γλυκοκορτικοειδή και Κιρκαδικό Ρυθμικό

Η παραγωγή και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών συντελείται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων ακολουθώντας έναν κιρκάδιο ρυθμό, ο οποίος υπόκειται σε ρύθμιση από τον άξονα του υποθαλάμου-υπόφυσης και των επινεφριδίων (HPA axis). Τα γλυκοκορτικοειδή εκκρίνονται μετά από διέγερση από την κορτικοτροπίνη ή επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη (ACTH), που εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με τη σειρά της, η έκκριση της ACTH καθορίζεται από την απελευθερωτική ορμόνη της επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης του υποθαλάμου (CRH), η οποία απελευθερώνεται κάτω υπό την επίδραση δυσμενών για τον οργανισμό συνθηκών, όπως μεταβολές της θερμοκρασίας, συγκληνισιακές καταστάσεις, μεταβολές της θερμοκρασίας, στρεσικοί παράγοντες [Εικόνα 5]. Σε

αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί το εξής: τα εκκρινόμενα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν αρνητικά τόσο την απελευθέρωση της ACTH όσο και της CRH, γεγονός που μαρτυρά πως τα στεροειδή ρυθμίζουν την έκκριση τους σε ένα βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης [(Σμοκοβίτης, 2007); (Ortsäter H, 2012; (Cidlowski, 2013);(Feek, 1983);(Vegiopoulos, 2007)].



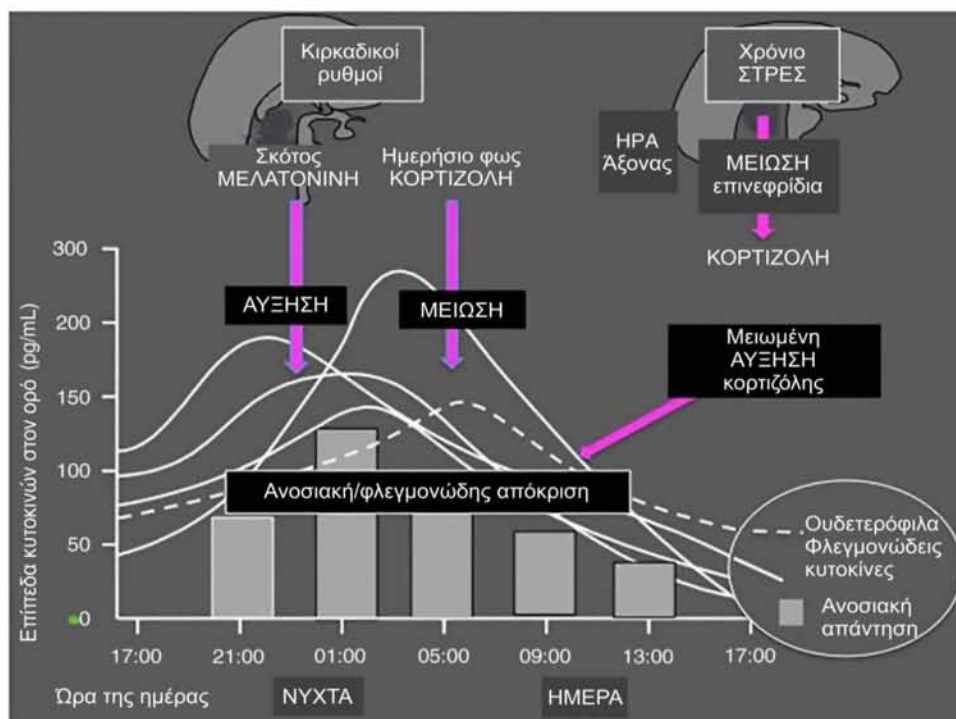
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis). Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε κιρκάδια ρύθμιση από τον περικολιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Η ορμόνη απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (CRH), που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο διεγείρει την απελευθέρωση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την πρόσθια υπόφυση. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει την σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από το φλοιό των επινεφριδίων στο αίμα. Στο αίμα, η μεγαλύτερη ποσότητα της κορτιζόλης παραμένει δεσμευμένη στις σφαιρίνες του πλάσματος. Η βιολογικά ενεργή μορφή του γλυκοκορτικοειδούς είναι η αδέσμευτη από σφαιρίνες κορτιζόλη, η οποία μπορεί να μετατραπεί στην αδρανή μορφή της, την κορτιζόνη, από τον τύπο 2 της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης. Ο τύπος 1 της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης καταλύει την αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη. Η ομοιόσταση στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών διατηρείται μέσω του βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης που ενεργοποιείται όταν παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα της ACTH στην πρόσθια υπόφυση και της CRH στον υποθάλαμο(Cidlowski, 2013).

Ειδικότερα, στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως επίσης και στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς, η υψηλότερη έκκριση γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες, ενώ ακολουθεί σταδιακή μείωση των επιπέδων αυτών στην διάρκεια της ημέρας, καταλήγοντας τελικά στα μικρότερα επίπεδα τις απογευματινές πρώτες βραδινές ώρες. Για το λόγο αυτό, ο βέλτιστος χρόνος για την χορήγηση

θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή είναι κατά τη διάρκεια της νύχτας, για να μιμηθεί τον κανονικό κίρκαδικό ρυθμό της έκκρισης κορτιζόλης και στοχεύει στις επιδράσεις των νυκτερινών προφλεγμονωδών ερεθισμών (Buttgereit et al., 2012).

Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των φυσικών γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς καθορίζεται από τα επίπεδα της προσδεδεμένης με κορτικοστεροειδή σφαιρίνης στον ορό καθώς επίσης και από τα επίπεδα των τοπικά εκφρασμένων ενζύμων της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης (11βHSD).

Γενικά, οποιαδήποτε αδυναμία ρύθμισης των επιπέδων των GCs από τον οργανισμό, όπως είναι η χρόνια αύξηση των επιπέδων ή ανεπάρκεια, συνδέεται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων -νόσος Cushing και Addison, αντίστοιχα. Επίσης, η μειωμένη αποτελεσματικότητα της δραστηριότητας του άξονα HPA συνδέεται με χρόνια διέγερση, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA) και μπορεί και αυτή με την σειρά της, να προκαλέσει την μειωμένη διαθεσιμότητα της κορτιζόλης. [Εικόνα 6, Cutolo, 2016].



Εικόνα 6. Η μελατονίνη αυξάνει και η κορτιζόλη μειώνει την ανοσολογική/φλεγμονώδη αντίδραση, ακολουθώντας έναν κίρκαδικό ρυθμό. Η μειωμένη αποτελεσματικότητα της δραστηριότητας του άξονα HPA που συνδέεται με χρόνια διέγερση, όπως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), μπορεί να προκαλέσει μερική ανεπάρκεια των επινεφριδίων. Η συνέπεια είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα της κορτιζόλης και η μειωμένη μειορύθμιση της νυκτερινής ανοσολογικής/φλεγμονώδους απόκρισης (Cutolo, 2016).

4. Τα γλυκοκορτικοειδή ως θεραπευτικό μέσο

Με πάνω από 60 χρόνια εμπειρίας στα γλυκοκορτικοειδή (GCs), ο αριθμός των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με GCs και το εύρος των κλινικών εφαρμογών είναι εκτεταμένα, με τα GCs να εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική ιατρική σήμερα. Για παράδειγμα, σχηματίζουν μια βάση για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (rheumatoid arthritis, RA), δεδομένου ότι είναι οικονομικά αποδοτικά φάρμακα που ασκούν ισχυρές αντιφλεγμονώδεις, ανοσοκατασταλτικές και τροποποιητικές θεραπευτικές επιδράσεις στη νόσο. Σε κλινικές δοκιμές φάσης II-V, για τη διερεύνηση των αποτελεσμάτων βιολογικών φαρμάκων στην RA, το 39-70% των ασθενών λάμβανε ταυτόχρονα θεραπεία με GC (Buttgereit, 2011; Buttgereit et al., 2015).

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η θεραπεία με GCs φέρνει αποτέλεσμα σε πολλές φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ωστόσο, το δυναμικό των GCs για την πρόκληση παρενεργειών, μπορεί να παρακινήσει τόσο τους ασθενείς όσο και τους γιατρούς που συνταγογραφούν, να λάβουν επιφυλακτική θέση απέναντι στα φάρμακα αυτά. Όπως συμβαίνει με όλες τις διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις στην ιατρική, ο πρωταρχικός στόχος είναι η θετική αναλογία οφέλους/κινδύνου κατά τη χρήση των φαρμάκων. Στην κλινική ιατρική, αυτό σημαίνει ότι είναι σαφώς λανθασμένο να μην αντιμετωπίζονται θεραπευτικά οι παθήσεις, όπως μια έξαρση του συστηματικού ερυθματώδους λύκου (SLE), για τις οποίες υπάρχει σαφές όφελος από το φάρμακο. Από την άλλη πλευρά, είναι εξίσου λανθασμένο να χρησιμοποιούνται GCs όταν δεν ενδείκνυνται ή σε δόσεις που είναι υψηλότερες από ό,τι απαιτείται, ή για διάρκεια μεγαλύτερη από όση είναι απαραίτητη. Κατά συνέπεια, αυτή η αυξανόμενη συνειδητοποίηση των πιθανών παρενεργειών δείχνει ότι η βελτίωση της αναλογίας οφέλους από GCs/κινδύνου, αντιπροσωπεύει τόσο μια τρέχουσα ανάγκη, όσο και μια συνεχή πρόκληση. Η αναπτυσσόμενη και λεπτομερής γνώση των μηχανισμών δράσης των GCs (Buttgereit et al., 2011), έχει οδηγήσει στην εξερεύνηση πολλών προσεγγίσεων για τη βελτιστοποίηση των θεραπειών με αυτά τα φάρμακα. Όλες αυτές οι προσεγγίσεις έχουν ως απώτερο στόχο την απάντηση σε ένα υποκείμενο βασικό ερώτημα: πώς μπορούν να βελτιστοποιηθούν οι θεραπείες με GCs (Alten and Wiebe, 2015; Buttgereit et al., 2015);

Τρεις κύριες προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν είτε για την δημιουργία νέων γλυκοκορτικοειδών ή για την αντικατάσταση κάποιων υποομάδων στα ήδη

υπάρχοντα GCs. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση σκευασμάτων που χρησιμοποιούνταν στη συστηματική κυκλοφορία με απώτερο σκοπό μία στοχευμένη απελευθέρωση του φαρμάκου. Κλασικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης αποτέλεσε ο σχηματισμός κάψουλας στεροειδών με τη βοήθεια λιποσωμάτων για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Στην δεύτερη προσέγγιση, έγινε συνδυασμός μονοξειδίου του αζώτου (NO) με γνωστό στεροειδές- προσδέτη του GR προκειμένου να ενισχυθούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της ουσίας, χωρίς όμως να αυξηθεί η χορηγούμενη δόση ή η ισχύς του στεροειδούς. Τέλος, μία από τις πλέον υποσχόμενες προσεγγίσεις των τελευταίων ετών αφορά τη βελτιστοποίηση των προσδετών του GR, με απώτερο σκοπό τη ρύθμιση της GR σηματοδότησης με πολύ ειδικό τρόπο. Αυτό θα οδηγήσει στην εμφάνιση GR αγωνιστών (GR agonists, SEGRAs) οι οποίοι και πολύ πιθανό να βρεθούν σύντομα στη φάση των κλινικών δοκιμών (Schäcke H, 2007).

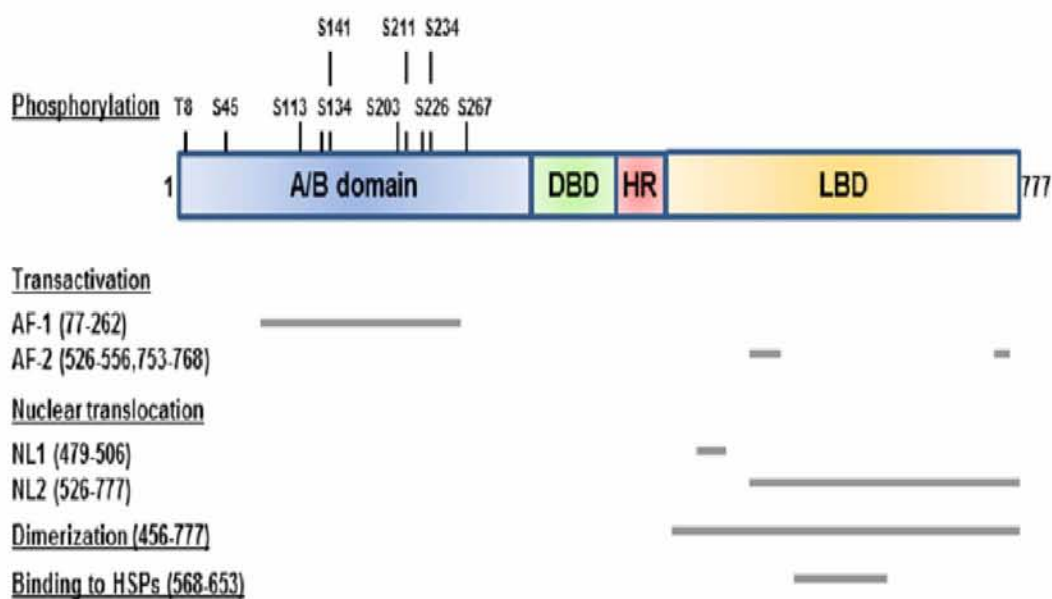
5. GR υποδοχέας- Γενικές Πληροφορίες

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ουσιώδη για τη ζωή, και οι μεταβολικές και ανοσοκατασταλτικές τους επιδράσεις έχουν εδραιωθεί. Λόγω αυτών των ισχυρών αντιφλεγμονωδών επιδράσεων, τα φάρμακα αυτά χορηγούνται ευρέως για μια ποικιλία παθογενειών. Παρόλα αυτά, ενώ είναι απαραίτητα σε πολλές θεραπείες και αγωγές, μια ανισορροπία που οφείλεται σε ψυχική ένταση (stress) ή παρατεταμένη χρήση σε κλινικές εφαρμογές, ενδέχεται να έχει υπερβαίνουσες ή απρόβλεπτες συνέπειες. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή είναι ισχυροί επαγωγείς της απόπτωσης σε πολλούς τύπους κυττάρων. Σε κύτταρα που έχουν ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή, η απόπτωση και άλλες κυτταρικές επιδράσεις επάγονται μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR) (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μεσολαβούνται από την ενεργοποίηση των GRs, τα οποία είναι υψηλής συγγένειας παράγοντες μεταγραφής και είναι εξαρτώμενα από προσδέτη. Οι GRs ανήκουν στην πυρηνική οικογένεια υποδοχέων οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανίχνευση της παρουσίας ορμονών, μεσολαβώντας στη συνέχεια σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες (Necela et al., 2004). Η GR πρωτεΐνη του ανθρώπου αποτελείται από τρεις κύριους τομείς, οι οποίοι αποτελούν μια σπονδυλωτή δομή (με στοιχειώδη αρθρωτά μέρη, modular): ο N-τελικός τομέας (για τη trans ενεργοποίηση της μεταγραφής), ο τομέας δέσμευσης

DNA [DBD,για την αναγνώριση των ειδικών αλληλουχιών DNA, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και της trans ενεργοποίησης (trans-activation)] και το C-τελικό πεδίο δέσμευσης συνδέτη (LBD) (για τη δέσμευση της ορμόνης, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και τη δραστηριότητα της trans ενεργοποίησης) (Zhang et al., 2014). Το DBD αποτελείται από δύο δακτύλους (fingers) ψευδαργύρου σημαντικούς για τον διμερισμό του GR (Vandevyver et al., 2013).

Ο GR είναι ένας υποδοχέας στεροειδούς ορμόνης που κατά την δέσμευση συνδέτη μετατοπίζεται στον πυρήνα και ασκεί μια μυριάδα γονιδιωματικών και μη γονιδιωματικών επιδράσεων. Ο υποδοχέας έχει τρία κύρια λειτουργικά πεδία (domains)· το N-τερματικό άκρο, το πεδίο δέσμευσης DNA (DNA-binding domain, DBD) και το πεδίο δέσμευσης συνδέτη (ligand binding domain, LBD) [Εικόνα 7, Εικόνα 8].



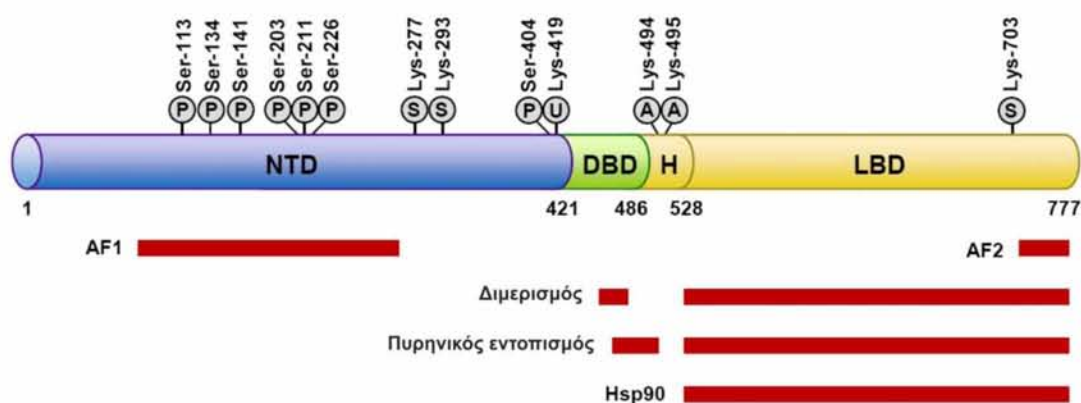
Εικόνα 7: Η δομή και οι περιοχές του ανθρώπινου GR (hGR). Ο hGR είναι πρωτεΐνη αποτελούμενη από διακριτές περιοχές. Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, είναι η περιοχή A/ B, όπου εμπεριέχεται η ανεξάρτητη από ορμόνη μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης-1 (AF-1). Η AF-1 σε πολλές περιπτώσεις δρα συνεργικά με την εξαρτώμενη από τον υποκαταστάτη AF-2, που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα με τον προσδέτη (LBD). Η περιοχή αυτή περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης. Στη συνέχεια ακολουθεί η περιοχή δέσμευσης με DNA (DBD) και μία εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης (HR). Στο καρβόξυ τελικό άκρο είναι η LBD που ξεκινά με τη σημαντική περιοχή αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP) και τελειώνει με μια δεύτερη περιοχή μεταγραφικής λειτουργίας ενεργοποίησης-2 (AF-2). Η περιοχή αυτή περιέχει, επίσης, αλληλουχίες διμερισμού και πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα (Ortsäter H, 2012).

Η μεταγραφή του hGR βρίσκεται υπό τον έλεγχο τριών υποκινητών, πάνω στους οποίους εντοπίζονται θέσεις πρόσδεσης ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων. Στο ώριμο mRNA, το εξόνιο 1 κωδικοποιεί για την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR) και τα υπόλοιπα εξόνια (2-9) κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR). Το εναλλακτικό μάτισμα (συνένωση, συναρμογή) του εξονίου 9 του hGR οδηγεί σε δύο κύριες ισομορφές: hGR α και hGR β [Εικόνα 9]. Αυτές οι 2 ισομορφές κλωνοποιήθηκαν και αναγνωρίστηκαν το 1985. Ο GR α είναι ένας παράγοντας μεταγραφής, εξαρτώμενος από συνδέτη, για τον οποίο διαπιστώθηκε ότι μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Ο GR β είναι μια εναλλακτική λύση παραλλαγής ματίσματος του GR α , ο οποίος είναι μεταγραφικώς αδρανής, καθώς δε δεσμεύει γλυκοκορτικοειδή. Το GR α γονίδιο του ανθρώπου, η μεταγραφή του οποίου ενεργοποιείται από τον τύπου II υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR, OMIM +138040; NR3C1 για την υποοικογένεια πυρηνικών υποδοχέων 3, ομάδα C, μέλος 1), έχει ταυτοποιηθεί ως ο κύριος μεσολαβητής της απόκρισης στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή σε οφθαλμικές διαταραχές (Fingert et al., 2010; Zhang et al., 2014).

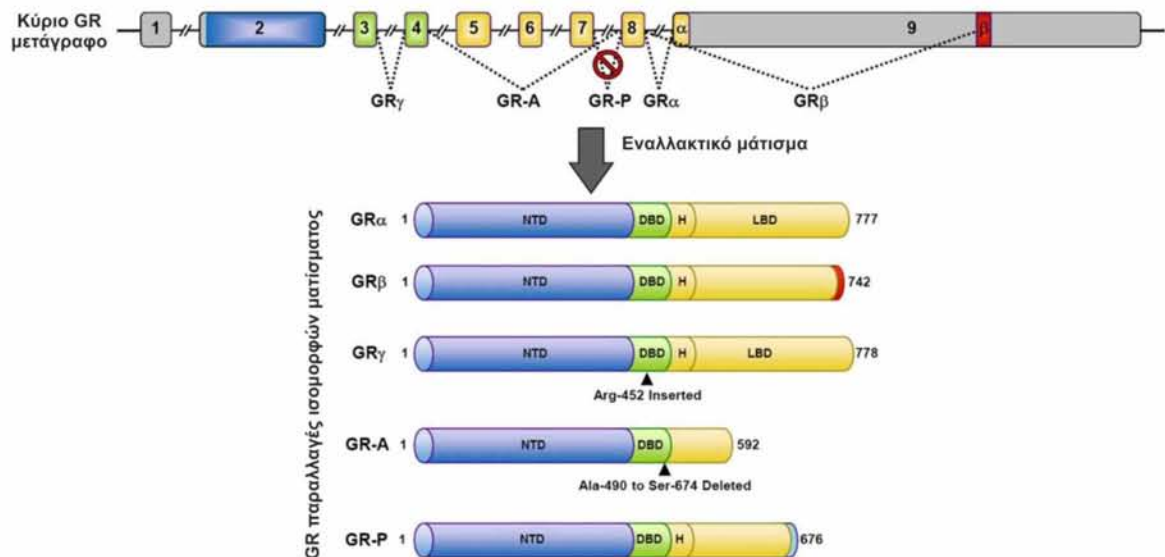
Η υψηλή έκφραση της ισομορφής hGR α είναι υπεύθυνη για την κλασική σηματοδότηση και διαμόρφωση των γονιδιακών μεταγραφών, ενώ ο ρόλος της hGR β ισομορφής είναι λιγότερο καθορισμένος και ενδέχεται να λειτουργεί ως κυρίαρχος αρνητικός αναστολέας της hGR α σηματοδότησης. Επιπλέον, οι εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GR, οδηγούν σε ποικίλες GR ισομορφές και μια πολύπλοκη συστοιχία μορίων υποδοχέα (Smith & Cidlowski, 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι, οι διάφορες μεταφραστικές ισομορφές [εικόνα 10] του GR α έχει δειχθεί ότι διεγείρουν την απόπτωση με διαφορετικούς ρυθμούς. Η GR α -C ισομορφή ταυτοποιήθηκε ως ο πιο ισχυρός επαγωγέας απόπτωσης, ενώ η GR α -D ισομορφή ήταν ο λιγότερο ισχυρός επαγωγέας απόπτωσης (Lu et al., 2007). Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν επίσης ότι η σχετική αναλογία των ειδικών GR ισομορφών σε ιστούς και κύτταρα, ενδέχεται να επηρεάσει την απόκρισή τους στην επαγόμενη από GC απόπτωση (Lu et al., 2007; Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Η κορτιζόλη, το κύριο δραστικό GC στους ανθρώπους, εκκρίνεται από τα επινεφρίδια και μετατρέπεται σε κορτιζόνη, το αδρανές GC, κυρίως στο νεφρό. Δύο ισόενζυμα της 11 β -υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης (11 β -HSD) είναι υπεύθυνα

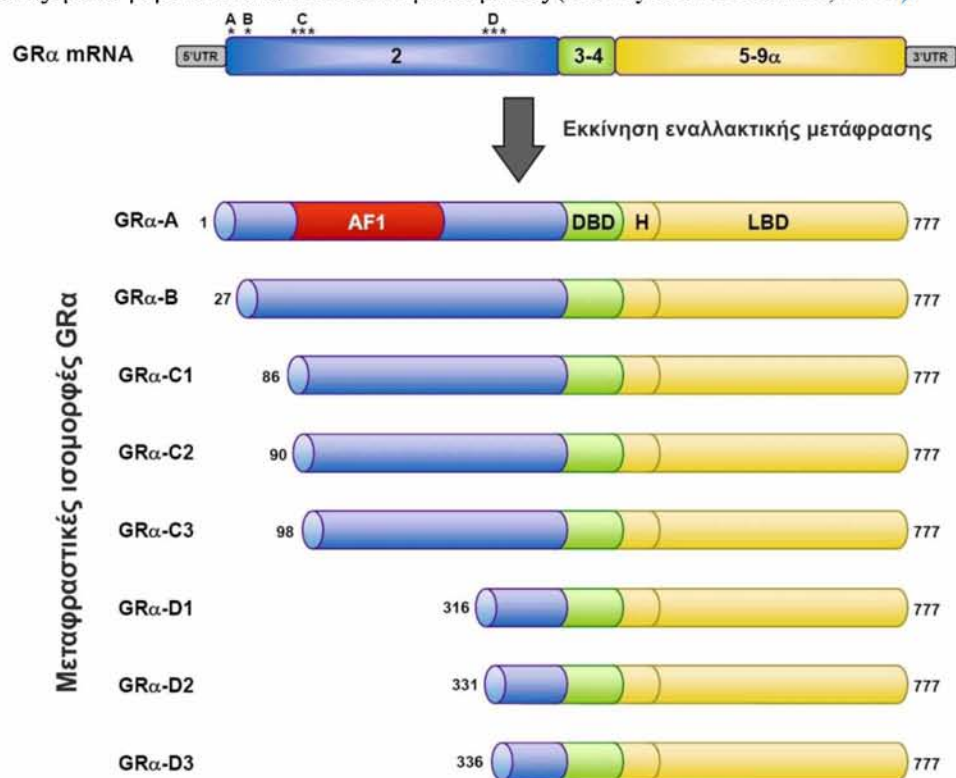
για την ιστοειδική ενδομετατροπή της κορτιζόνης και της κορτιζόλης στο ενδοπλασματικό δίκτυο: τα τύπου 1 και 2 (11β-HSD1 και 11β-HSD2). Τα δύο ισoenζυμα είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων και έχουν διακριτές κατανομές στον ιστό. Το 11β-HSD1 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τον λιπώδη ιστό, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο και το 11β-HSD2 κυρίως στο νεφρό και τους σιελογόνους αδένες. Το 11β-HSD1 μετατρέπει τη μη δραστική κορτιζόνη σε κορτιζόλη στον άνθρωπο ή τη μη δραστική 11-δεϋδροκορτικοστερόνη (11-DHC) σε κορτικοστερόνη στα τρωκτικά και το 11β-HSD2 καταλύει την αντίθετη αντίδραση. Αμφίδρομες δραστηριότητες (τόσο ως αναγωγή όσο και ως αφυδρογονάση) έχουν παρατηρηθεί με το 11β-HSD1 in vitro, αλλά in vivo είναι κυρίως μια αναγωγή. Επειδή η GC δράση διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από την ενεργοποίηση του GC υποδοχέα (GR) που επάγεται από συνδέτη, η τοπική συγκέντρωση κορτιζόλης (ή κορτικοστερόνης) υπαγορεύει την ενεργοποίηση του GR. Σε ιστούς όπως το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός, όπου εκφράζεται το 11β-HSD1, υπάρχουν δύο πηγές συσσώρευσης κορτιζόλης (ή κορτικοστερόνης): το κλάσμα που παράγεται από το 11β-HSD1 στο εσωτερικό του ιστού και αυτό που παράγεται από το πλάσμα με διάχυση. Προφανώς, η δραστηριότητα του 11β-HSD2 είναι υπεύθυνη για τη μείωση του επιπέδου της κορτιζόλης στο νεφρό. Επιπλέον, ο μεταβολισμός της κορτιζόλης στο ήπαρ αποτελεί ένα είδος ισορροπίας που διατηρεί την ιστοειδική συγκέντρωση της κορτιζόλης (Wang, 2005).



Εικόνα 8. Η δομή του τομέα (domain) του GR και οι θέσεις (sites) της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Εμφανίζονται οι τομείς του GR και περιοχές (regions) του υποδοχέα που εμπλέκονται στη trans ενεργοποίηση (AF1 και AF2), το διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό, και τη δέσμευση hsp90. Επίσης απεικονίζονται τα κατάλοιπα αμινοξέων τροποποιημένα με φωσφορυλίωση (P), τροποποίηση με SUMO (S), ουβικιτινίωση (U) και ακετυλίωση (A). Οι αριθμοί ισχύουν για τον GR ανθρώπου (Oakley and Cidlowski, 2013).



Εικόνα 9. Παραλλαγές GR ματίσματος. Το κύριο GR μετάγραφο αποτελείται από 9 εξόνια. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί την NTD, τα εξόνια 3-4 κωδικοποιούν την DBD, και τα εξόνια 5-9 κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης (H) και την LBD. Το GRα προκύπτει από μάτισμα του εξονίου 8 στην αρχή/έναρξη του εξονίου 9. Οι GRβ, GRγ, GR-A, και GR-P παράγονται από τα εικονιζόμενα γεγονότα εναλλακτικού ματίσματος (Oakley and Cidlowski, 2013).



Εικόνα 10. GR μεταφραστικές ισομορφές. Η έναρξη της μετάφρασης από 8 διαφορετικές AUG κωδικόνια έναρξης σε ένα GRα mRNA (η εντόπιση των AUG κωδικονίων έναρξης σημειώνονται με αστερίσκο) παράγει 8 ισομορφές υποδοχέα με προοδευτικά μικρότερα αμινο-NTDs. Οι αριθμοί για τις μειονίνες έναρξης και την AF1 περιοχή (αμινοξέα 77 έως 262) ισχύουν για την πρωτεΐνη GRα του ανθρώπου (Oakley and Cidlowski, 2013).

6. Μηχανισμός GR σηματοδότησης

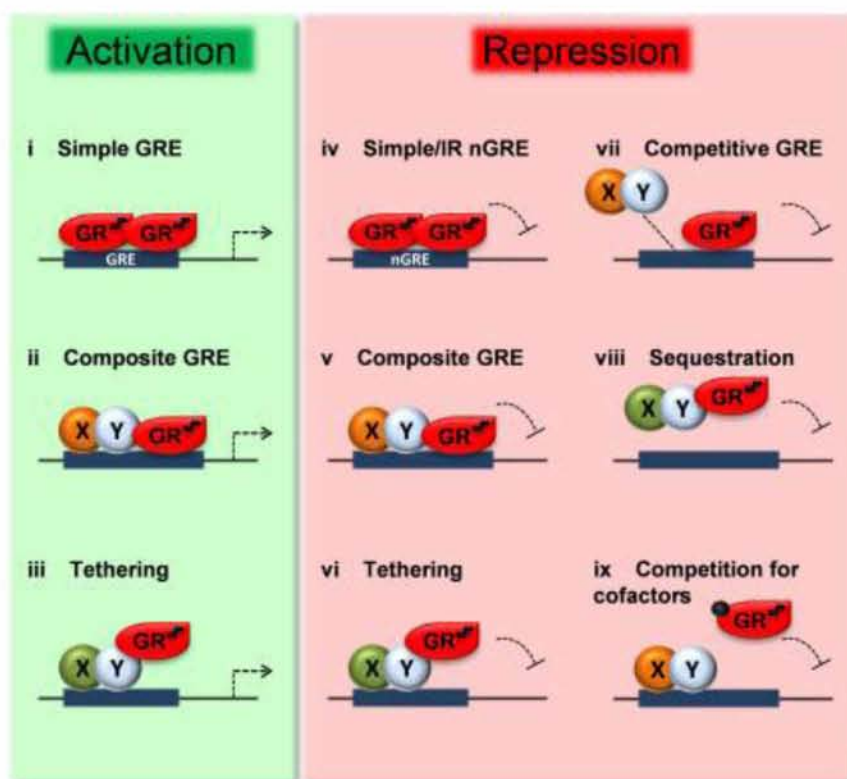
Η GC δράση διαμεσολαβείται από τον GR, έναν πυρηνικό υποδοχέα που ρυθμίζει φυσιολογικές διαδικασίες μέσω της ενεργοποίησης ή καταστολής των γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στη φλεγμονή, τη γλυκονογένεση και τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων (Wang, 2005).

Παρουσία γλυκοκορτικοειδούς, ο GR διαχωρίζεται από κάποιες μοριακές συνοδούς με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο, διμερίζεται και μεταφέρεται τελικά στον πυρήνα, όπου και ασκεί την πλειονότητα των δράσεων του. Αυτός ο τύπος δράσης ονομάζεται γενωμικός, με σημαντικότερους του μηχανισμούς την ενεργοποίηση και καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Επιπλέον, είναι αποδεδειγμένο πως η GR σηματοδότηση μπορεί να ακολουθήσει μία εναλλακτική οδό, ταχύτερη αλλά λιγότερο αποτελεσματική, την μη-γενωμική. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρείται ενεργοποίηση μονοπατιών σήματος όπως αυτά που συνδέονται με G πρωτεΐνες είτε από κυτταροπλασματικό GR ή από δεσμευμένο στην μεμβράνη GR. Τέτοιου είδους ταχείες αποκρίσεις έχουν διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και καρδιαγγειακού συστήματος [(Psarra AM, 2008); (Collingwood TN, 1999); (Kino T, 2005); (Ayroldi E, 2012); (Lee SR, 2012); (Jiang CL, 2014); (Schäcke H, 2007); (Morimoto RI, 2002)].

Επειδή, στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η γενωμική δράση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, παρακάτω δίνεται αναλυτικά ο μηχανισμός δράσης του GR μέσω αυτής της οδού.

Κατά την ενεργοποίηση του, ο GR διμερίζεται, συνδέεται με στοιχεία απόκρισης GC (GREs), αλληλεπιδρά με συστατικά του μηχανισμού μεταγραφής και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Ο GR που είναι δεσμευμένος σε προσδέτη θα μπορούσε επίσης να συνδεθεί με αρνητικά GREs που διαμεσολαβούν την καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου, ή να συνδεθεί στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και έτσι να παρέμβει στον γενικό μηχανισμό μεταγραφής. Ορισμένες επιδράσεις trans καταστολής που ασκούν τα GCs επιτυγχάνονται μέσω μιας διαδικασίας, η οποία δεν εξαρτάται από την δέσμευση DNA, και στην οποία ο GR αλληλεπιδρά με παράγοντες μεταγραφής όπως οι AP-1 και NF-κB και καταστέλλει τη δράση τους επί της γονιδιακής έκφρασης. Η καταστολή της μεσολαβούμενης από GC, NF-κB μεταγραφής μπορεί επίσης να επιτευχθεί με την επαγωγή της σύνθεσης

IkB.(Olswang et al., 2003). Η διέγερση ενός γονιδίου ή οι επιδράσεις καταστολής που μεσολαβούνται από έναν ενεργοποιημένο GR υποδοχέα, ρυθμίζουν διαδοχικά έναν εξαιρετικά μεγάλο αριθμό φυσιολογικών δράσεων σε απόκριση προς τα GCS. Δεδομένου ότι η δραστική κορτιζόλη ή κορτικοστερόνη είναι ο ενεργός συνδέτης για τον GR, η διαθεσιμότητα ελεύθερης κορτιζόλης ή κορτικοστερόνης μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από μια εξαρτώμενη από προσδέτη πρωτεΐνη (CBG). Επίσης, οι ιστοειδικές δραστηριότητες των 11β-HSDs είναι κρίσιμες για την δράση GC. Έτσι, ο ρόλος της δράσης των GCs στην παχυσαρκία και στην αντίσταση στην ινσουλίνη, περιπλέκεται από τις βιολογικές ή φυσιολογικές συνέπειες της ανεπάρκειας ή της ενεργοποίησης της CBG ή του 11β- HSDs (Wang, 2005).



Εικόνα 11. Ο GR, ο οποίος ενεργοποιείται με σηματοδότηση, μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση, είτε σε καταστολή της μεταγραφής ενός γονιδίου. Αριστερά με πράσινο χρώμα: Η trans ενεργοποίηση διαμεσολαβείται από (i) δέσμευση GR διμερών προς GRE, (ii) δέσμευση του GR στο DNA, σε εναρμόνιση με έναν άλλο παράγοντα μεταγραφής (TF: XY), ή (iii) δέσμευση του GR σε ένα TF με μηχανισμό πρόσδεσης(tethering). Δεξιά με κόκκινο χρώμα: η TR επιτυγχάνεται κυρίως με (iv) την άμεση σύνδεση GR διμερών σε nGRE (απλό ή IR), (v) την cross-talk δέσμευση DNA με άλλο TF, (vi) την παρεμβολή μονομερών GR στη δραστηριότητα trans ενεργοποίησης των TFs, από ένα μηχανισμό πρόσδεσης (tethering), (vii) τον ανταγωνισμό για μια αλληλοεπικαλυπτόμενη θέση δέσμευσης (ανταγωνιστικό GRE), (viii) την «οικειοποίηση» (sequestration) ενός TF δεσμευμένου στο DNA, ή (ix) τον ανταγωνισμό για δεσμευτικούς συμπαραγόντες με άλλους TFs δεσμευμένους σε DNA (Vandevyver et al., 2013).

Όπου : GREs, GR response elements: στοιχεία απόκρισης GR. nGREs: αρνητικοί GREs, TR, transcriptional repression or transrepression: καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής, IR: ανεστραμμένες επαναλήψεις.

Πιο συγκεκριμένα, λόγω των λιποφιλικών ιδιοτήτων τους, οι GCs διασχίζουν την μεμβράνη του πλάσματος ελεύθερα και δεσμεύονται στους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς τους. Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών υπάρχουν σε απενεργοποιημένη μορφή στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων, ως μέρος ενός πολυπρωτεϊνικού συστήματος πρωτεΐνης συνοδού (chaperone) που αποτελείται από ένα ετεροσύμπλοκο (heterocomplex) πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, HSP), πρωτεϊνών που συσχετίζονται με hsp και ανοσοφιλίνες (Refojo et al., 2001).

Σαν πρώτο βήμα, ένας μη συνδεδεμένος GR, συνδέεται με ένα βασικό σύστημα συναρμογής που ονομάζεται “foldosome” (πτυχόσωμα, εκτελεί εργασία πτύχωσης πρωτεϊνών), του οποίου η *in vitro* ανασύσταση δείχνει την παρουσία hsp-90, hsp-70, hsp-70-οργανωτικής πρωτεΐνης (organizing protein) (p60/hop) και hsp-40. Η ωρίμανση του συμπλόκου GR-foldosome περιλαμβάνει την στρατολόγηση επιπλέον πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων της hsp-70 πρωτεΐνης αλληλεπίδρασης (hip) και την αντικατάσταση της hop από FKBP 51 ή FKBP 52 ανοσοφιλίνες (Refojo et al., 2001). Τέλος, το σύστημα σταθεροποιείται από την p23, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην διατήρηση μιας καλής προσβασιμότητας των συνδετών προς το C-τελικό άκρο δέσμευσης του προσδέτη. Οι hsp-90 και hsp-70 έχουν δραστηριότητα ATPάσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σωστή συναρμολόγηση του ετεροσυμπλόκου. Η υπερέκφραση της BAG-1, μιας πρωτεΐνης βοηθητικής ως προς την συνοδό πρωτεΐνη hsp-70 (cochaperone), αναστέλλει την πτύχωση του GR και μειώνει την GR σηματοδότηση. Εκτός από αυτή την κυτταροπλασματική δράση, οι συνοδές πρωτεΐνες μπορούν να συμμετέχουν σε «μετακινήσεις» του GR (shuttling) μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, αλλά και στην χρωματινική επανέκφραση (chromatin recycling) του GR. Η μελέτη του ρόλου των συνοδών πρωτεϊνών και των βοηθητικών τους στην λειτουργικότητα των GR, ανοίγει ένα πολύ ενδιαφέρον ζήτημα στα πλαίσια της μελέτης της GR σηματοδότησης (Refojo et al., 2001).

Μετά από αλληλεπίδραση με GC, τα σύμπλοκα GR που εξαρτώνται από προσδέτη, ταξιδεύουν ως ομοδιμερή στον πυρήνα, για την ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω αλληλεπίδρασης με μια σύντομη παλινδρομική αλληλουχία DNA (AGAACA ως το μισό της θέσης/site), η οποία ονομάζεται στοιχείο απόκρισης γλυκοκορτικοειδούς (GRE). Αυτός ο μηχανισμός ονομάζεται trans ενεργοποίηση (ή μεταγραφική ενεργοποίηση ή transactivation). (Refojo et al., 2001).

Η παλίνδρομη αυτή αλληλουχία εντοπίζεται στην περιοχή του υποκινητή ή του ενισχυτή του γονιδίου και περιέχει δύο μισές εξαμερείς περιοχές οι οποίες διαχωρίζονται από τρία ζεύγη βάσεων. Από αυτές, μόλις το 1/3 είναι συντηρημένο, ενώ τα υπόλοιπα 2/3 διαφέρουν, χαρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πολυπλοκότητα μεταβλητότητα στην αλληλουχία του DNA εσωτερικά του GRE που οδηγεί στην διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα του GR (Meijsing SH, 2009). Στην βιβλιογραφία αναφέρονται τρεις κατηγορίες GREs: τα απλά, τα σύνθετα και τα προσδεδεμένα (tethering) GREs, γεγονός που υποδηλώνει διαφορές στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της κάθε ομάδας. Οι δύο πρώτες ομάδες, τα απλά και σύνθετα GREs δηλαδή, απαιτούν διμερισμό του υποδοχέα και άμεση πρόσδεση πάνω στο DNA (Lefstin JA, 1998). Μετά την επαφή με το DNA, ο GR στρατολογεί μια σειρά από συμπαραγόντες που ρυθμίζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, τη συναρμολόγηση του συμπλόκου προ-έναρξης της μεταγραφής και τη λειτουργικότητα του βασικού μηχανισμού μεταγραφής. Πρωτεΐνες όπως οι CBP/p300, η SRC-1, ο μεταγραφικός παράγοντας GRIP1/TIF2, η RAP-46 και η STAT-5 (πρωτεΐνη μεταγωγής σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής), έχουν δραστηριότητα GR συνενεργοποιητή. Άλλες πρωτεΐνες, όπως ο συγκαταστολέας πυρηνικού υποδοχέα (N-CoR) και η SMRT (για τους ρετινοειδικούς και θυρεοειδικούς ορμονικούς υποδοχείς) θα μπορούσαν να δράσουν ως μεταγραφικοί συγκαταστολείς. (Refojo et al., 2001).

Όσον αφορά τον μηχανισμό καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής, αυτός βασίζεται στην ικανότητα του υποδοχέα να καταστέλλει τη δράση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων όντας προσδεδεμένος πάνω σε αυτούς. Να σημειωθεί πως, ο μηχανισμός αυτός είναι πλήρως λειτουργικός ακόμα και παρουσία GR που φέρει μετάλλαξη στην περιοχή διμερισμού, γεγονός που υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσω GR μονομερών. Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων στους οποίους προσδένεται ο GR, είναι ο NF-κB (nuclear factor-κB), ο IRF3 (interferon regulatory factor 3) και ο AP-1 (activator protein 1). Όσον αφορά την καταστολή του NF-κB, αυτή γίνεται μέσω παρεμπόδισης της φωσφορυλίωσης της σερίνης 2 σε μία από τις δύο περιοχές του καρβοξυτελικού άκρου της RNA πολυμεράσης II από τον υποδοχέα, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής (Schäcke H, 2007) ή μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης των μεταγραφικών παραγόντων GR και NF-κB. Ο NF-κB, αρχικά, χαρακτηρίστηκε και στη συνέχεια απέκτησε τη συγκεκριμένη ονομασία από την ικανότητα του να

ρυθμίζει την κ ανοσοσφαιρινική αλυσίδα στα Β κύτταρα. Είναι ετεροδιμερές μιας υπομονάδας 50kDa, της NF-κB1 (p50) και μίας δεύτερης υπομονάδας 65kDa, της RelA (p65). Σε ανενεργή κατάσταση, ο NF-κB έχει τη μορφή ετεροδιμερούς αποτελούμενος από τις υπομονάδες p65 και p50 κι είναι αγκυροβολημένος στο κυτταρόπλασμα από τον παράγοντα IκBα. Σήματα ενεργοποίησης μέσω υποδοχών της κυτταρικής επιφάνειας οδηγούν στην ενεργοποίηση της IκB κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα IκBα. Μετά τη φωσφορυλίωση, ο IκBα υφίσταται πρωτεολυτική αποδόμηση, και το ετεροδιμερές NF-κB p65/p50 περνά στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου συνδέεται στις Β περιοχές του υποκινητή φλεγμονωδών γονιδίων. Στην φάση αυτή, ο NF-κB παίζει ρόλο μεσολαβητή κι ενισχύει τη μεταγραφή. Ο GR μπορεί να εμποδίσει τη δράση του NF-κB μέσω δύο μηχανισμών. Αναστολή μπορεί να προκύψει μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη-ενεργοποιημένου GR και του NF-κB. Ένας δεύτερος λιγότερο πιθανός μηχανισμός της GR-διαμεσολαβούμενης καταστολής του NF-κB είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου IKBA από τον GR. Η ενισχυμένη σύνθεση του IκBα αντικαθιστά το αποικοδομημένο IκB και εξουδετερώνει τον ελεύθερο NF-κB (Leung DY, 2003).

Όπως γίνεται κατανοητό, όμοια δράση με τους φυσικούς προσδέτες του GR, τα γλυκοκορτικοειδή, έχουν και ορισμένα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή. Παραδείγματος χάρη, η ικανότητα της δεξαμεθαζόνης να καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίου της p65 υπομονάδας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η υπομονάδα αυτή αποδεδειγμένα παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω πρόσδεσης του στα GREs. Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η δεξαμεθαζόνη και ο GR παρεμποδίζουν την πρόσδεση των υπομονάδων p65 και p50 στο DNA, παρεμποδίζοντας έτσι την έναρξη της φλεγμονής. Οι παρατηρήσεις αυτές αφορούν διάφορες καρκινικές σειρές. Ειδικότερα, στη HeLa κυτταρική σειρά, η ενεργοποίηση του ενδογενούς GR μπορεί να καταστείλει την ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNFα και την IL-1 τόσο όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσής του πάνω στο DNA όσο και στο επίπεδο έναρξης της μεταγραφής του γονιδιώματος του. Επιπλέον, χορήγηση δεξαμεθαζόνης στα ίδια κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων της πυρηνικής p65 υπομονάδος κι ελαφριά αύξηση της κυτταροπλασματικής (ScheinmanRI, 1995). Οι ίδιες παρατηρήσεις έγιναν και σε πειράματα με την L-929 κυτταρική σειρά (ινοβλάστες ποντικού). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά πρότειναν άλλον έναν μηχανισμό μέσω του οποίου η δεξαμεθαζόνη μπορεί να καταστείλει τη δράση του

NF-κB. Προτείνεται, πως η DEX ενισχύει την παραγωγή του ανασταλτικού μορίου IκB, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύει και αφαιρεί από τον πυρήνα του κυττάρου τα ενεργοποιημένα και δεσμευμένα στο DNA σύμπλοκα του NF-κB. Επίσης, βρέθηκε πως η δεξαμεθαζόνη μπορεί και μπλοκάρει τη μεσολαβούμενη από TNF αύξηση των επιπέδων της IL-6, μέσω ενός μηχανισμού που δρα απευθείας πάνω στη εξαρτώμενη από NF-κB μεταγραφή, αφήνοντας αναλλοίωτα τα επίπεδα του IκB (DeBosscher K, 1997).

Σε κάθε περίπτωση πολύ σημαντική είναι η επίδραση του περιβάλλοντος όσον αφορά την κατασταλτική δράση των γλυκοκορτικοειδών πάνω στον NF-κB και στον AP-1, καθώς η ευαισθησία στη δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον τύπο του κυττάρου-στόχου αλλά και με την έκφραση-δραστικότητα των προφλεγμονωδών πρωτεϊνών και συν-ρυθμιστών. Παραδείγματος χάρη, υπερέκφραση του AP-1 έχει αρνητική επίδραση πάνω στην κατασταλτική δράση του GR, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση ανθεκτικότητας απέναντι στα γλυκοκορτικοειδή (Jacques E, 2010). Κλείνοντας την υποενότητα αυτή, αξίζει να τονιστεί πως πιθανότατα ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με τους στόχους του μέσω διαφορετικών περιοχών, καθώς μεταλλάγματα τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα τους να καταστέλλουν τη δράση του NF-κB εξακολουθούσαν να καταστέλλουν τη δράση του AP-1, ενώ ταυτόχρονα οι μηχανισμοί ενεργοποίησης ήταν πλήρως λειτουργικοί. Όπως γίνεται κατανοητό, η αρνητική ρύθμιση των παραγόντων που ρυθμίζουν την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων αποτελεί απόδειξη της αντιφλεγμονώδους και ανοσοκατασταλτικής δράσης των γλυκοκορτικοειδών (Schäcke H, 2007).

7. Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική, αυτοενισχυόμενη και μη αντιστρεπτή. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης κι αποτελεί

μηχανισμό ομοιόστασης απέναντι σε οποιαδήποτε πιθανότητα αλλαγής του πληθυσμού των κυττάρων στους ιστούς.

Επίσης η απόπτωση μπορεί να προκληθεί από πολλούς εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς παράγοντες. Ως αποπτωτικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν οι ιοί, η ακτινοβολία, η κόπωση ή και η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA. Επίσης, όταν τα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού απομακρυνθούν από τον βασικό υμένα πεθαίνουν με απόπτωση. Η απόπτωση αποτελεί μέρος της ανοσοποιητικής απόκρισης. Παρόλο που πολλά ερεθίσματα μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, δεν ακολουθούν όλα τα κύτταρα αυτή την οδό υπό την επίδραση του ίδιου ερεθίσματος. Παραδείγματος χάρη, η παρουσία κορτικοστεροειδών μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση κάποιους κυτταρικούς πληθυσμούς- όπως είναι τα θυμοκύτταρα, αλλά να αφήσει ανεπηρέαστους άλλους [(Elmore S., 2007); (Debnath J, 2005)].

Η διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, γνωστές ως κασπάσες, κι ένα σύνολο γεγονότων που συνδέουν το αρχικό έναυσμα με την τελική λύση του κυττάρου. Στα περισσότερα κύτταρα, οι κασπάσες απαντώνται ως ανενεργά προένζυμα, γνωστά ως προκασπάσες. Αυτά τα ανενεργά προένζυμα περιλαμβάνουν ένα πεπτιδίο στο αμινοτελικό τους άκρο, καθώς επίσης και μία μεγάλη και μία μικρή υπομονάδα. Ενεργοποίηση παρατηρείται μετά από πρωτεόλυση του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο, γεγονός που συντελείται είτε από άλλες κασπάσες ή από τις ίδιες. Με τη σειρά τους, οι ενεργές πλέον κασπάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν άλλες ανενεργές προκασπάσες, ενισχύοντας έτσι το αρχικό αποπτωτικό σήμα και οδηγώντας το κύτταρο σε ταχύ και μη αναστρέψιμο πλέον κυτταρικό θάνατο. Οι κασπάσες που διαθέτουν αυτήν την πρωτεολυτική δράση μπορούν να διασπών πρωτεΐνες σε υπολείμματα ασπαρτικού οξέος. Ωστόσο, οι κασπάσες διαφέρουν όσον αφορά την ειδικότητα αναγνώρισης των γειτονικών αμινοξέων [(Cohen GM, 1997); (Rai NK, 2005)].

Απόπτωση μπορεί να προκληθεί σε ένα κύτταρο μέσω δύο κυρίως μονοπατιών, τα οποία αποδεδειγμένα πλέον συνδέονται σε βαθμό που η δράση του ενός επηρεάζει το άλλο. Το πρώτο είναι το εξωγενές μονοπάτι ή το μονοπάτι του θανάτου του υποδοχέα και το δεύτερο είναι το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Igney FH, 2002).

Εξωγενής Αποπτωτική Οδός:

Η εξωγενής αποπτωτική οδός χαρακτηρίζεται από αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα, ο οποίος ανήκει στην υπεροικογένεια του υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor, TNF). Η πρόσδεση των προσδετών (για παράδειγμα, FasL, TNFα) στον υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών προσαρμογέων (για παράδειγμα της πρωτεΐνης προσαρμογέα FADD ή TRADD), οι οποίες κάνουν ορατές τις αντίστοιχες περιοχές «θανάτου» που συνδέονται με τους υποδοχείς. (Hsu H, 1995). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη προσαρμογέα αλληλεπιδρά με την προκασπάση 8 μέσω διμερισμού της περιοχής «θανάτου» του τελεστή. Έτσι, σχηματίζεται το σύμπλεγμα σηματοδότησης της επαγωγής θανάτωσης (ή νέκρωσης) (Death Inducing Signaling Complex, DISC) που θα ενεργοποιήσει την κασπάση-8, η οποία με την σειρά της θα ενεργοποιήσει την κασπάση-3, για να εκκινηθεί η απόπτωση μέσω είτε ενός μιτοχονδριακά εξαρτώμενου ή μιτοχονδριακά ανεξάρτητου μηχανισμού (Herr et al., 2007).

GC-επαγόμενη απόπτωση μέσω της ενδογενούς αποπτωτικής οδού:

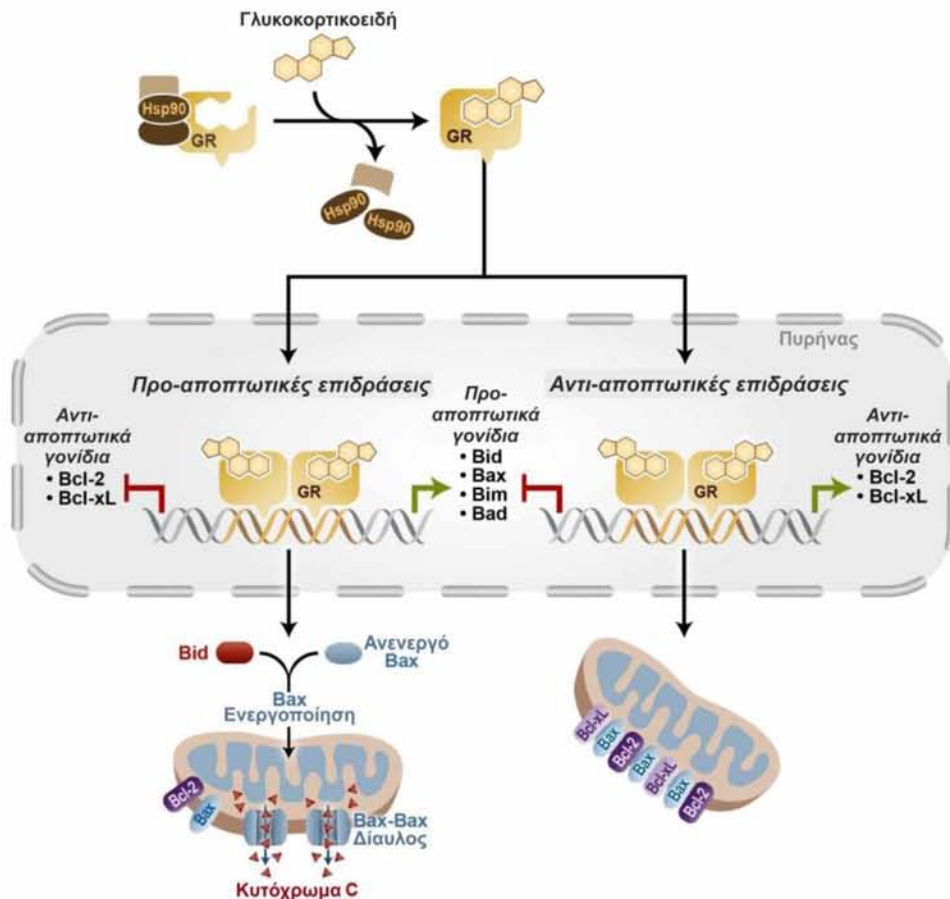
Αποτελεί τον κλασικό μηχανισμό της GC-επαγόμενης απόπτωσης (Smith & Cidlowski, 2010). Η εγγενής αποπτωτική οδός περιλαμβάνει τα μιτοχόνδρια και προκύπτει ως απόκριση σε διάφορα ενδογενή ερεθίσματα (π.χ., γλυκοκορτικοειδή, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και αστία). Τα ερεθίσματα αυτά πηγάζουν από το μιτοχόνδριο και τα σήματα που παράγουν είναι ικανά να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις. Η ύπαρξη ενός αρνητικού σήματος προϋποθέτει την απουσία συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών, προκειμένου να είναι σε θέση να καταστήσει το κύτταρο ανίκανο να καταστείλει την επικείμενη απόπτωση (Elmore S, 2007).

Η σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την έκφραση του προ-αποπτωτικού παράγοντα Bim, μέλους της οικογένειας Bcl-2, το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax/Bak για να διαταράξει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών [Εικόνα 12]. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και την απόπτωση (Smith & Cidlowski, 2010; Lu et al., 2007; Mann & Cidlowski, 2001; Herr et al., 2007). Άλλες πρωτεΐνες όπως οι οι πρωτεΐνες Smac/DIABLO και

HtrA2/Omi προωθούν την απόπτωση μέσω καταστολής της δράσης των αναστολέων της απόπτωσης (IAP) (Garrido C, 2006).

Παραδείγματα άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών είναι οι AIF και η ενδονουκλεάση G και CAD, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη AIF μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA και τη συμπύκνωση της περιφερικής πυρηνικής χρωματίνης. Η ενδονουκλεάση G μεταναστεύει κι εκείνη στον πυρήνα όπου και διασπά την πυρηνική χρωματίνη βοηθώντας, έτσι, τον σχηματισμό θραυσμάτων ολιγονουκλεοσωματικού DNA. Τέλος, παρατηρείται απελευθέρωση της πρωτεΐνης CAD από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή της στον πυρήνα όπου, μετά από διάσπαση της από την κασπάση 3, προκαλεί κατακερματισμό των DNA ολιγονουκλεοσωμάτων και περαιτέρω συμπύκνωση της χρωματίνης [(Susin SA, 2000); (Enari M, 1998)].

Η ενδογενής οδός μπορεί να επηρεαστεί και από άλλους παράγοντες που περιλαμβάνουν την πλειορύθμιση άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι Bad και Puma, ή τη μειορύθμιση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως οι Bcl-2 ή Bcl-xL (Herr et al., 2007). Αυτή η ισορροπία των προ- και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μπορεί να μεταβάλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή, και το κατά πόσον επάγεται μια προ-αποπτωτική ή αντι-αποπτωτική επίδραση, είναι συχνά ζήτημα ειδικό του ιστού ή/και του κυτταρικού τύπου (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).



Εικόνα 12. Τα γλυκοκορτικοειδή σηματοδοτούν μέσω GR τη μετατροπή τόσο προ- όσο και αντι-αποπτωτικών γονιδίων που μπορούν είτε να οδηγήσουν σε απόπτωση, είτε σε κυτταρική επιβίωση, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή του ιστού (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

8. Επαγόμενη από GCs απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επηρεάσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Longui et al., 2005). Αυτό συμβαίνει διότι έχουν την ικανότητα να μειώνουν τις εκφράσεις του ετεροδιμερούς Jun-fos και c-myc, που σε συνδυασμό με άλλους παραγόντες μεταγραφής αποφασίζουν για τη μετέπειτα διάρκεια ζωής και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, προσδιορίζοντας την παύση μεταξύ της G1 και S φάσης του κυτταρικού κύκλου. Μπορούν επίσης να επάγουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, με αποκορύφωμα την ενεργοποίηση πυρηνικών πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στην αποδόμηση των DNA, RNA και άλλων δομικών πρωτεϊνών του κυττάρου (Longui, 2007).

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι εξαιρετικά σημαντικά και αποτελούν μια πρώτη γραμμή άμυνας για τη θεραπεία των αιμοποιητικών κακοηθειών. Πιο συγκεκριμένα,

η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL), της χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (CLL), του πολλαπλού μυελώματος (MM), του λεμφώματος Hodgkin και του λεμφώματος μη Hodgkin (Smith & Cidlowski, 2010). Ωστόσο, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή έχει περιοριστεί, μόλις εμφανίστηκε η αντοχή των κακοηθών λεμφοκυττάρων στα γλυκοκορτικοειδή (Smith & Cidlowski, 2010). Ορισμένοι καρκίνοι, όπως η λευχαιμία της μυελογενούς γραμμής συγγένειας ή κυτταρογέννεσης (lineage), είναι εγγενώς ανθεκτικοί στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, ενώ άλλοι αναπτύσσουν αντίσταση μετά από παρατεταμένη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ή μετά από υποτροπή (Smith & Cidlowski, 2010).

Μηχανισμοί που συμβάλλουν στην αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή, περιλαμβάνουν μεταβολή στην έκφραση των ισομορφών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδούς, μεταβολή των επιπέδων της έκφρασης του GR, μεταλλάξεις του GR, απορρύθμιση προ- ή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, ή μεταβολή των αλληλεπιδράσεων με διαφορετικές κινάσες (Smith & Cidlowski, 2010). Ενώ αυτοί οι μηχανισμοί δεν αναφέρονται αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα, η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή έχει μελετηθεί περισσότερο σε καρκίνους για τους οποίους, ένα σημαντικό μέρος του θεραπευτικού σχήματος, βασίζεται σε θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Άλλοι τύποι καρκίνου, ευαίσθητοι στην αντίσταση σε γλυκοκορτικοειδή, περιλαμβάνουν το οστεοσάρκωμα και τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Schlossmacher & Stevens, 2011). Είναι ενδιαφέρον ότι η συντομότερη GR μεταφραστική ισομορφή, ο GR α -D, δεν μεσολαβεί τον κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα οστεοσαρκώματος (Gross et al., 2011). Σε αυτά τα πειράματα, τα κύτταρα οστεοσαρκώματος που επιμολύνθηκαν μόνο με την ισομορφή GR α -D, δεν υφίστανται απόπτωση κατά την κατεργασία με δεξαμεθαζόνη, ούτε υπήρξε ανταγωνισμός επαγόμενος από δεξαμεθαζόνη της NF- κ B δραστηριότητας (Gross et al., 2011). Θα ήταν ενδιαφέρον να δούμε αν υπήρξε μια αλλαγή στην σχετική ποσότητα της ισομορφής GR α -D, σε καρκινικά κύτταρα που αναπτύσσουν αντίσταση (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Συνολικά, οι θεραπείες με γλυκοκορτικοειδή σε πολλές αιματοποιητικές κακοήθειες παραμένουν η πρώτη γραμμή άμυνας, και έτσι η ανάπτυξη αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή συχνά συσχετίζεται με κακή πρόγνωση. Εκτός από την ανάπτυξη αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή στη θεραπεία κατά του καρκίνου, τα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών εισάγουν μια σημαντική

προειδοποίηση στις θεραπευτικές στρατηγικές για πολλούς καρκίνους. Τα στεροειδή όπως η δεξαμεθαζόνη χρησιμοποιείται συχνά με χημειοθεραπεία και ακτινοβολία σε ασθενείς για την καταπολέμηση της ναυτίας και του εμέτου.

Η θεραπευτική έκβαση πολλών συμπαγών όγκων και καρκίνων ενδέχεται να επηρεαστεί αρνητικά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου. Η δεξαμεθαζόνη επάγει ένα αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών που προέρχονται από τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του εγκεφάλου, τον καρκίνο του τραχήλου, τον καρκίνο των οστικών κυττάρων, το μελάνωμα και το νευροβλάστωμα (Zhang et al., 2006). Η πλειοψηφία αυτών των κυτταρικών σειρών προστατεύθηκε έναντι απόπτωσης επαγόμενης από χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με την λήψη δεξαμεθαζόνης. Αξίζει να αναφερθεί, πως βιβλιογραφικά μελετάται η πιθανότητα τα GCs να προκαλούν την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα κύτταρα στερεών όγκων, ενώ σε λεμφοειδής κακοήθειες να παρουσιάζουν μία προ-αποπτωτική δράση. (Schlossmacher G, 2011).

Επιπλέον, αρκετές ουρολογικές κυτταρικές σειρές και προσφάτως απομονωμένα κύτταρα όγκου του προστάτη έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζουν αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα που προκαλείται από θεραπεία με δεξαμεθαζόνη. Η δεξαμεθαζόνη βρέθηκε επίσης ότι αναστέλλει την απόπτωση και προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα κύστης, αλλά εμφανίστηκε επίσης να καταστέλλει την εισβολή κυττάρων και τη μετάσταση (Zheng et al., 2012). Σε C6 κύτταρα γλοιώματος, που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα εγκεφάλου, η δεξαμεθαζόνη βρέθηκε ότι αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από σταυροσπορίνη, ετοποσίδη και θαψιγαργίνη, πλειορυθμίζοντας το Bcl-xL (Ni Chonghaile et al., 2006). Οι μεσολαβούμενες από Bcl-xL αντι-αποπτωτικές επιδράσεις που προκαλούνται από δεξαμεθαζόνη βρέθηκαν επίσης σε κυτταρική σειρά γαστρικού καρκίνου ανθρώπου. Η δεξαμεθαζόνη ανέστειλε επίσης την απόπτωση σε αρκετές παγκρεατικές κυτταρικές σειρές που καλλιεργούνται *in vitro*, και ανέστειλε την απόπτωση κυττάρων παγκρεατικού καρκινώματος, ως ξενομόσχευμα σε ποντικούς *in vivo* (Zhang et al., 2006). Η δεξαμεθαζόνη προστατεύει σειρές ωοθηκικών επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων έναντι απόπτωσης με πλειορύθμιση του cIAP2 αναστολέα κασπάσης (Runnebaum & Bruning, 2005). Ο συνδέτης που επάγει την απόπτωση που συνδέεται με παράγοντα νέκρωσης όγκου (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) είναι ένα μέλος της

οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) που περιλαμβάνει τους FasL και TNF- α . Ο TRAIL έχει χρησιμοποιηθεί για να διεγείρει την απόπτωση σε καρκίνους του θυρεοειδούς, αφού οι TRAIL υποδοχείς εκφράζονται ευρέως σε θυρεοειδικά καρκινικά κύτταρα. Σε θυλακιώδη αδιαφοροποίητα θυρεοειδικά (follicular undifferentiated thyroid, FRO) καρκινικά κύτταρα, η δεξαμεθαζόνη προστατεύει εναντίον της μεσολαβούμενης από TRAIL απόπτωσης. Αυτή η επίδραση βρέθηκε ότι εξαρτάται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και ότι συνδέεται με την πλειορύθμιση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL. Δυστυχώς, υπάρχουν πολλοί τύποι καρκινικών κυττάρων που εμφανίζουν μια αντι-αποπτωτική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Σε μερικούς ιστούς όπου τα γλυκοκορτικοειδή είναι γενικά κυτταροπροστατευτικά σε φυσιολογικούς κυτταρικούς τύπους, όπως ηπατοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, υπάρχει επίσης ένα αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα σε καρκίνους που προέρχονται από αυτούς τους ιστούς. Μεγάλο μέρος των στοιχείων για την επαγόμενη από GC προστασία έναντι της απόπτωσης έχει αποδειχθεί σε καρκίνους του ήπατος. Σε μία μελέτη, η δεξαμεθαζόνη προστατεύει από επαγόμενη από ασιτία (ή λιμό) ορού (serum starvation) απόπτωση, σε κύτταρα ηπατώματος επίμυος. Η απόπτωση σε αυτά τα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του NF- κ B, μια επίδραση που εμποδίζεται από δεξαμεθαζόνη. Επιπλέον, η καταστολή του NF- κ B σε αυτά τα κύτταρα ηπατώματος επίμυος, επέτρεψε να συμβεί η GC-επαγόμενη απόπτωση, υποδηλώνοντας ότι η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη αύξησε τα επίπεδα του NF- κ B και συνέβαλε στα αντιαποπτωτικά αποτελέσματα σε αυτά τα κύτταρα. Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη αναστέλλει την επαγόμενη από UV-C (υπεριώδης ακτινοβολία στα 190-280 nm, εξαιρετικά βλαβερή για το δέρμα) απόπτωση μέσω πλειορύθμισης της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL σε κύτταρα ηπατώματος επίμυος. Τόσο η ασιτία (ή λιμός) ορού, όσο και η UV-C πυροδοτεί την ενδογενή αποπτωτική οδό. Είναι ενδιαφέρον ότι, η δεξαμεθαζόνη δεν προστατεύει τα κύτταρα ηπατώματος επίμυος από απόπτωση που προκαλείται από την ιδιότητα του συνδέτη της πρωτεΐνης Fas (Fas Ligand, FasL) να πυροδοτεί (trigger) την έναρξη της εξωγενούς οδού. Ωστόσο, η δεξαμεθαζόνη βρέθηκε ότι αναστέλλει την απόπτωση σε κύτταρα ηπατώματος επίμυος, στα οποία έγινε επεξεργασία με TGF-beta, και είναι επίσης πιθανό ότι αυτό γίνεται με αύξηση της Bcl-xL έκφρασης σε αυτά τα κύτταρα. Αρκετές άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα

γλυκοκορτικοειδή είναι προστατευτικά σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος έναντι άλλων αποπτωτικών ερεθισμάτων (Uen et al., 2008). Η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ενδέχεται επίσης να είναι ιδιαίτερα επιζήμια στον καρκίνο του μαστού. Σε μία μελέτη ξενομοσχευμάτων καρκίνου του μαστού, η προ-αγωγή με δεξαμεθαζόνη μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από paclitaxel απόπτωση. Η συστηματική προ-αγωγή με δεξαμεθαζόνη βρέθηκε ότι πλειορρυθμίζει το αντι-αποπτωτικό γονίδιο MKP-1, ενώ μειορρυθμίζει προ-αποπτωτικά γονίδια όπως τα Bid και TRAIL σε ογκοκύτταρα του καρκίνου του μαστού, μια επίδραση που επέμενε για εβδομάδες. Πιο πρόσφατα, η ανάλυση μικροσυστοιχιών, επαγόμενων από δεξαμεθαζόνη αντι-αποπτωτικών γονιδίων σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, αποκάλυψε ότι οι MKP-1 και SGK-1 πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερης σημασίας στην επαγόμενη από GC αντίσταση στη χημειοθεραπεία του καρκίνου του μαστού, με την αγωγή με γλυκοκορτικοειδή να πλειορρυθμίζει και τα δύο αυτά τα γονίδια (Wu, et al., 2004) (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

Επιπλέον, RNAi γονιδίων που έχουν υποστεί αποσιώπηση καταργεί τα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Wu, et al., 2004). Συνολικά, οι δυνητικοί μηχανισμοί δράσης της σηματοδότησης γλυκοκορτικοειδών που οδηγεί σε αντι-αποπτωτικά γεγονότα, αντί για κυτταρικό θάνατο, περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των MKP-1, NF-κB SGK-1, ACK, και WNT οδών (Heig et al., 2007). Σαφώς, είναι απαραίτητη η ισορροπία μεταξύ GC-επαγόμενων προ- και αντι-αποπτωτικών γεγονότων σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων που παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο ή την επιβίωση. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της συμμετοχής των γλυκοκορτικοειδών σε αγωγές κατά του καρκίνου, θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013).

9. Γλυκοκορτικοειδή και γλυκονεογένεση

Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν υπογλυκαιμική δράση, επηρεάζοντας όλες σχεδόν τις παραμέτρους του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Στην οδό της γλυκονεογένεσης, τα μόρια των στεροειδών αυξάνουν την ηπατική γλυκονεογένεση με πολλαπλούς μηχανισμούς:

1. Αρχικά, επάγοντας τη μεταγραφή των γονιδίων των καθοριστικών ενζύμων της γλυκονεογενετικής οδού, όπως είναι η καρβοξυκινάση του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK), η φωσφατάση της

6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-Pase) και η 6-φωσφο-φρουκτοκινάσης (Αναπλιώτου & Χατζησμάλης 2014).

Η διέγερση της γλυκονεογένεσης είναι μία από τις σημαντικές λειτουργίες των γλυκοκορτικοειδών. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται εν μέρει στην ικανότητα των γλυκοκορτικοειδών να επάγουν την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν γλυκονεογενετικά ένζυμα όπως την PEPCK και την (G-6-Pase). Ο μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου PEPCK έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Η κυριότερη ρύθμιση που υφίσταται η PEPCK από τα γλυκοκορτικοειδή είναι σε επίπεδο μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα, μια μονάδα απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRU, glucocorticoid response unit,) που αποτελείται από δύο θέσεις πρόσδεσης υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR), τις GR1 και GR2, και τέσσερα βοηθητικά στοιχεία (gAF1, gAF2, gAF3, και στοιχείο απόκρισης κυκλικού AMP στον προαγωγέα του PEPCK γονιδίου), απαιτείται για μια πλήρη απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή (Scott et al., 1996). Μια μετάλλαξη από οποιοδήποτε από αυτά τα επικουρικά στοιχεία (accessory elements), οδηγεί σε μείωση κατά 50% της μεταγραφής του PEPCK γονιδίου το οποίο διεγείρεται από γλυκοκορτικοειδή. Επιπλέον, ένας συνδυασμός οποιωνδήποτε δύο μεταλλάξεων των συμπληρωματικών αυτών στοιχείων, ακυρώνει την απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή (Scott et al., 1996). Όπως προκύπτει από αυτά τα αποτελέσματα, οι GR1 και GR2 δεν μπορούν να μεσολαβήσουν την απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή από μόνα τους στο πλαίσιο του υποκινητή (ή προαγωγέα) του PEPCK γονιδίου. Πράγματι, οι GR1 και GR2, είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό, δε μπορούν να μεσολαβήσουν μια απόκριση γλυκοκορτικοειδούς όταν τοποθετούνται στο πλαίσιο ενός ετερόλογου υποκινητή (Scott et al., 1998). Έτσι, η απόκριση γλυκοκορτικοειδούς του PEPCK γονιδίου, εξαρτάται πλήρως από συμπληρωματικά στοιχεία (accessory factor elements) και πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε αυτές τις θέσεις (Yamada, et al., 1999; Wang et al., 2000).

Τα μέλη της οικογένειας του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα 3 (HNF3a, b και g) παίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση ενός αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές του κυτταρικού μεταβολισμού. Μεγάλο μέρος αυτής της ρύθμισης επιτυγχάνεται μέσω των N- και C-τελικών άκρων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Επιπλέον, το C-τελικό άκρο απαιτείται για τη δραστηριότητα του συμπληρωματικού παράγοντα (accessory factor activity) στο γονίδιο της PEPCK (GRU), ενώ το N-τελικό άκρο δεν υποστηρίζει αυτή τη λειτουργία (Wang, et al.,

1999). Είναι ενδιαφέρον ότι, ο HNF3 λειτουργεί επίσης ως συμπληρωματικός παράγοντας σε πολλά άλλα GRUs, όπως αυτά που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων 6-φωσφοφρουκτοκινάσης και φωσφατάσης της 2,6-φρουκτόζης. Έτσι, η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ HNF3 και GR φαίνεται ότι είναι ένας συνήθης μηχανισμός για τη γονιδιακή μεταγραφή που ρυθμίζεται από γλυκοκορτικοειδή. Παρά το γεγονός ότι πολλά είναι γνωστά σχετικά με την οργάνωση των GRUs διαφόρων υποκινητών, λίγα είναι γνωστά σχετικά με το πώς οι διάφορες συνιστώσες επηρεάζουν πραγματικά την ηπατική παραγωγή γλυκόζης από γλυκονεογένεση (Wang et al., 2000).

2. Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την προσφορά αμινοξέων και γλυκερόλης προς το ήπαρ. Τα αμινοξέα προέρχονται, όπως είναι γνωστό, κυρίως από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών στους μύες ενώ η γλυκερόλη από την αυξημένη λιπόλυση που προκαλούν τα γλυκοκορτικοειδή στον υποδόριο λιπώδη ιστό. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται στο ήπαρ σαν υπόστρωμα για την διεργασία της γλυκονεογένεσης.

3. Επάγουν τους ενδοκυτταρικούς μεταβιβαστές όπως το cAMP διευκολύνοντας έτσι την δράση της γλυκαγόνης και αδρεναλίνης στο ήπαρ, ορμονών που διεγείρουν την ηπατική γλυκονεογένεση και γλυκογονόλυση.

4. Ανταγωνίζονται τις ηπατικές δράσεις της ινσουλίνης, οι οποίες είναι κατασταλτικές στις διεργασίες των γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης (Αναπλιώτου & Χατζησμάλης 2014).

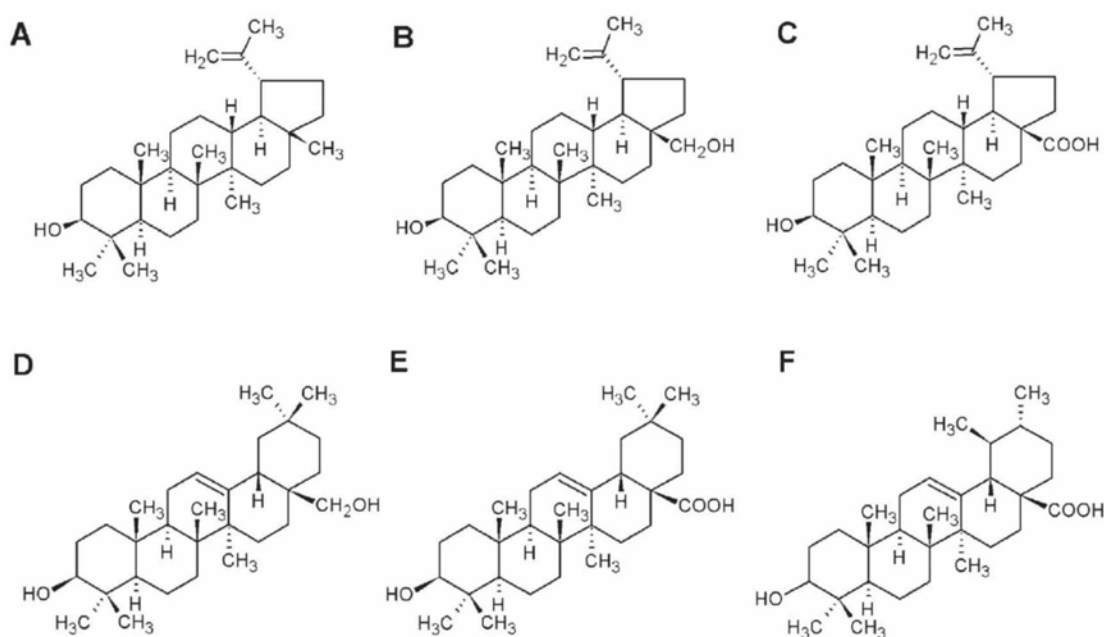
Ο σημαντικός ρόλος που έχουν τα μόρια των γλυκοκορτικοειδών στην ηπατική γλυκονεογένεση γίνεται αντιληπτός και από δεδομένα μοντέλων διαγονιδιακών ποντικών που είχαν απάλειψη του γονιδίου της 11-β HSD1, δηλαδή είχαν χαμηλές συγκεντρώσεις δραστικών μορίων των στεροειδών. Στα ποντίκια αυτά παρατηρήθηκε μείωση της ηπατικής γλυκονεογένεσης (Αναπλιώτου & Χατζησμάλης 2014).

10. Τριτερπένια ως εν δυνάμει αντικαρκινικά

Τα τριτερπενοειδή αποτελούν μια μεγάλη, βιολογικά ενδιαφέρουσα ομάδα τερπενοειδών και περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλομορφία δευτερογενών μεταβολιτών με περισσότερους από 100 σκελετούς από άνθρακα, που προσδιορίστηκαν από χερσαίους και θαλάσσιους έμβιους οργανισμούς. Αυτή η κατηγορία φυσικών προϊόντων, που συμπεριλαμβάνει τριτερπένια, στεροειδή, λιμονοειδή (limonoids), κασσινοειδή, τριτερπενοειδείς και στεροειδείς σαπωνίνες,

αποτελείται από πάνω από 30.000 ενώσεις που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν (Dzubak et al., 2006). Οι περισσότεροι από τους σκελετούς των τριτερπενίων είναι τετρακυκλικοί και περιέχουν τρεις εξαμελείς και έναν πενταμελή δακτύλιο, καθώς και πεντακυκλικοί με τέσσερις εξαμελείς και έναν πενταμελή δακτύλιο, είτε πέντε εξαμελείς δακτυλίους. Ωστόσο, ακυκλικά, μονο-, δι-, τρι-, και εξακυκλικά ικριώματα έχουν επίσης απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από φυσικές πηγές. Ο όρος τριτερπένιο αναφέρεται σε τρία μονοτερπένια και, κατά συνέπεια, σε 30 άνθρακες που ομαδοποιούνται σε έξι ισοπρενυλικές μονάδες (1) (Sandjo and Kuete, 2013)[Εικόνα 19].

Ανάλογα με το είδος του φυτού, δευτερογενείς μεταβολίτες που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια βρίσκονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ή τους χλωροπλάστες των κυττάρων. Αυτά τα συστατικά, καθώς και γλυκοζυλιωμένα ομολογά τους παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία του φυτού από έντομα, μύκητες και βακτήρια (Sandjo and Kuete, 2013).



Εικόνα 13. Χημικές δομές των: (Α) λουπεόλη, (Β) βετουλίνη, (Γ) βετουλινικό οξύ, (Δ) ερυθροδιόλη, (Ε) ολεανολικό οξύ και (F) ουρσολικό οξύ. Οι λουπεόλη, βετουλίνη και βετουλινικό οξύ ανήκουν στα πεντακυκλικά τριτερπένια τύπου lupan που αποτελούνται από τέσσερις δακτύλιους των έξι και έναν των πέντε ατόμων C, ενώ η ερυθροδιόλη και το ολεανολικό οξύ εμφανίζουν μια δομή oleanan με πέντε δακτύλιους των έξι ατόμων C. Αυτά είναι αρκετά παρόμοια με την ομάδα ursan, η οποία αντιπροσωπεύεται από το ουρσολικό οξύ. Η διαφορά μεταξύ των τύπων oleanan και ursan είναι ο εντοπισμός μεθυλ-ομάδας στον E-δακτύλιο (Laszczyk, 2009).

Τα τριτερπενοειδή έχουν προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες. Σε γενικές γραμμές τα τριτερπένεια συγκεντρώνουν έναν μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών. Όσον αφορά την ικανότητα τους να καταστέλλουν την ογκογένεση, αυτό γίνεται μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

- ✓ Παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα NF-κB
- ✓ Επάγοντας απόπτωση,
- ✓ Αναστέλλοντας τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
- ✓ Αναστέλλοντας την αγγειογένεση
- ✓ Προκαλώντας μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες
- ✓ Διαμορφώνοντας την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην χορήγηση πολλαπλών σκευασμάτων (reversing multidrug resistance, MDR), τα οποία βρίσκονται στους περισσότερους όγκους.

Επιπλέον, διάφοροι κυτταρικοί υποδοχείς εμπλέκονται στις αντικαρκινικές ιδιότητες των τριτερπενίων. Κάποιοι από αυτούς είναι ο υποδοχέας των ανδρογόνων και ο αγγειο-ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).

Όσον αφορά το ρόλο των τριτερπενοειδών στην επαγωγή απόπτωσης αυτή μπορεί να γίνει μέσω καταστολής της δράσης του Bcl-2 γονιδίου κι επαγωγής της κασπάσης 3. Εναλλακτικά, μπορούν να επάγουν την εμφάνιση απόπτωσης μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού ή μέσω ενίσχυσης του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF α). Επιπρόσθετα, βρίσκεται υπό εξέταση ένα νέο μονοπάτι επαγωγής απόπτωσης μέσω καταστολής της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης hTERT, και κατ' επέκταση μέσω αναστολής της δράσης της αντίστοιχης τρανσφεράσης των τελομερών.

Εκτός από αντικαρκινικές δράσεις, στα τριτερπένεια έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, αντικές, αντιμυκητιακές, ανοσορυθμιστικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η αιμολυτική και κυτταροστατική δράση πολλών τερπενίων έχει περιορίσει δραματικά τη φαρμακευτική τους χρήση κι έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην τροποποίησή τους με τη βοήθεια χημικών και βιοτεχνολογικών τεχνικών. Τέλος, αποτελούν ικρίωμα για τη σύνθεση πολλών νέων χημικών σκευασμάτων, γεγονός που αποδίδεται στον ομοιογενή ανθρακικό τους σκελετό [(Yan XJ, 2014); (Shah SA, 2014); (Malinowska M, 2013); (Salminen A, 2008); (Molnár J, 2006)].

11. Η πρωτοπαναξαδιόλη και η πρωτοπαναξατριόλη ως μελλοντικά φαρμακευτικά σκευάσματα

Η πρωτοπαναξαδιόλη (g-PPD) και η πρωτοπαναξατριόλη (g-PPT) είναι οργανικές ενώσεις που χαρακτηρίζουν μια ομάδα ginsenosides. Είναι τετρακυκλικά τερπένια, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των σαπωνινών και έχουν βρεθεί σε

ginseng (*Panax ginseng*) και σε notoginseng (*Panax pseudoginseng*). (Shibata, S et al, 1963; Tanaka et al, 1964)

Τα Ginsenosides ή παναξοσίδες είναι μια κατηγορία φυσικών προϊόντων στεροειδών γλυκοζιτών και σαπωνινών-τριτερπενίων. Οι ενώσεις σε αυτή την οικογένεια βρέθηκαν σχεδόν αποκλειστικά στο φυτό γένους *Panax* (*ginseng*), το οποίο έχει μια μακρά ιστορία χρήσης στην παραδοσιακή ιατρική που έχει οδηγήσει στη μελέτη των φαρμακολογικών αποτελεσμάτων των ενώσεων *ginseng*.

Ginsenosides μπορούν να απομονωθούν από διάφορα μέρη του φυτού, αν και τυπικά απομονώνονται από τις ρίζες, και μπορούν να καθαριστούν με χρωματογραφία στήλης (Attele, AS, 1999).

Οι περισσότερες μελέτες για τις βιολογικές επιδράσεις των *ginsenosides* έχουν γίνει σε κυτταρικές καλλιέργειες ή σε ζωικά μοντέλα και, συνεπώς, τα αποτελέσματα τους για τον άνθρωπο είναι άγνωστα. Επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα έχουν αναφερθεί, κυρίως σε τρωκτικά. Αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις έχουν επίσης περιγραφεί. (Attele, AS, 1999; Leung, KW; Wong, AS, 2010).

Πολλές μελέτες δείχνουν ότι *ginsenosides* έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έχει παρατηρηθεί ότι τα *Ginsenosides* αυξάνουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα και δρουν ως μέσο δέσμευσης των ελεύθερων ριζών (Lü, J.-M.; Yao, Q.; Chen, C., 2009). Επίσης, έχει δειχθεί ότι τα *Ginsenosides* RG3 και Rh2 σε κυτταρικές σειρές έχουν ανασταλτική επίδραση επί της κυτταρικής ανάπτυξης των διαφόρων καρκινικών κυττάρων και αντιφλεγμονώδη δράση ενώ μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν προτείνει ότι τα *ginsenosides* έχουν νευροπροστατευτικές ιδιότητες και θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον (Lü, J.-M.; Yao, Q.; Chen, C, 2009).

Δύο ευρείς μηχανισμοί δράσης έχουν προταθεί για την δραστηριότητα των *ginsenoside*, με βάση την ομοιότητά τους με τις στεροειδείς ορμόνες. Τα *ginsenosides* είναι αμφίφιλα και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις μεμβράνες και να αλλάξουν τις ιδιότητες τους (Attele, AS, 1999). Ορισμένα *ginsenosides* έχουν επίσης αποδειχθεί να είναι μερικοί αγωνιστές των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστό πώς οι μηχανισμοί αυτοί επιφέρουν τις προαναφερόμενες βιολογικές επιδράσεις των *ginsenosides*. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο τα *ginsenosides* (π.χ., G-Rb1 και G-Rh2) μπορούν να δράσουν ως αντιφλεγμονώδη, βασίζεται στην

αναστολή της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών, μέσω της καταστολής της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα (NF) -κB (Attele,AS,1999).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Η συγκεκριμένη εργασία, είχε ως στόχο να διερευνήσει, κατά πόσο οι ουσίες πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη μπορούν να δράσουν ως εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAS), δρώντας όμοια με τα γλυκοκορτικοειδή, αλλά έχοντας λιγότερες παρενέργειες από αυτά. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε κατά πόσο οι ουσίες αυτές, μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, εάν έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και εάν αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, γονιδίου στόχου του GR, που συμμετέχει στην γκυκονεογένεση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Παρακάτω, αναφέρονται όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και οι εταιρείες από τις οποίες προέρχονταν. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας.

Χημικά αντιδραστήρια

- APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-rad)
- BSA (Sigma)
- Charcoal, dextran coated (Sigma)
- DEX (Riedel-de Haën) *
- DMSO (Panreac) *
- DTT (SERVA)
- EDTA (Panreac)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *
- HCl (Merck)
- KCl (Merck)

- KH_2PO_4 (Merck)
- L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen) *
- Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen) *
- MitoTracker® Red CMXRos (CMX) (Molecular Probes Inc)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaHCO_3 (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)
- Κυανούνη της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega) *

Θρεπτικά υλικά

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

Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα

- Μονοκλωνικό αντίσωμα β-ακτίνης από ποντικό (Sigma)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα PEPCK H-300 από κόνικλο (Santa-Cruz), με τον επίτοπο να αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα
- Πολυκλωνικό αντίσωμα GR H-300 από κόνικλο (SIGMA)

Δευτερογενή αντισώματα

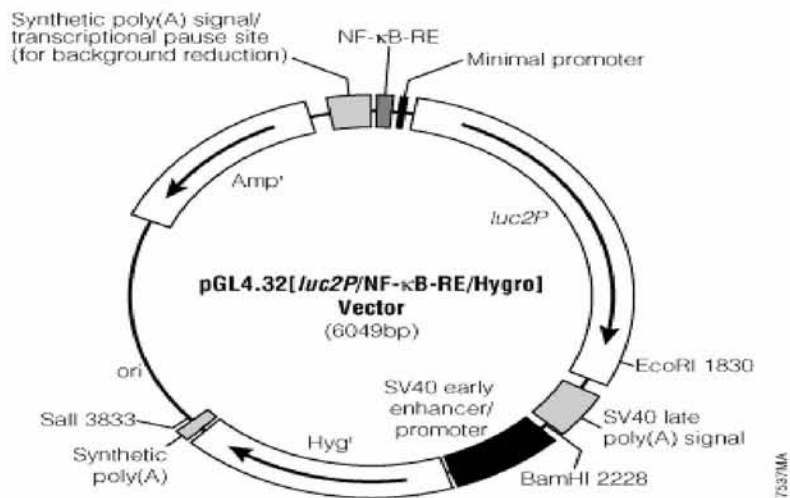
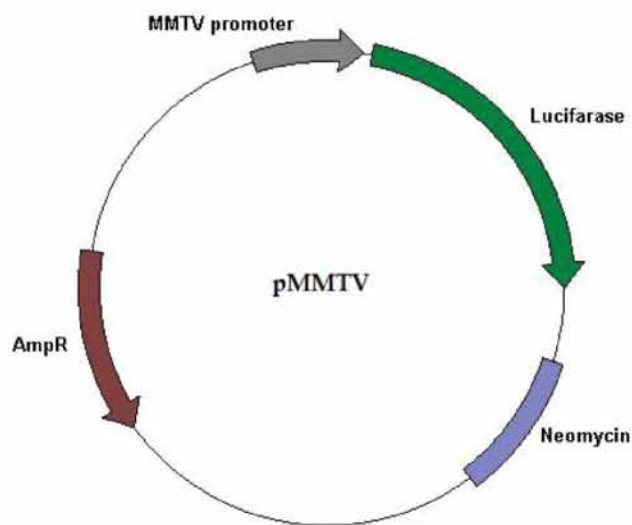
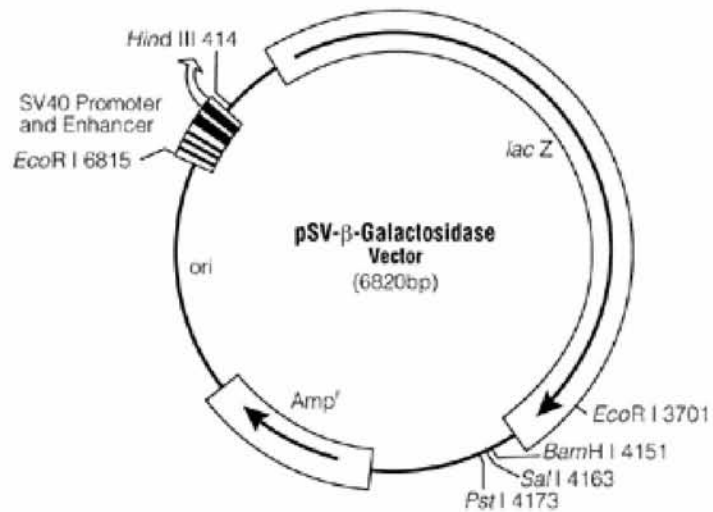
- Αντίσωμα για mouse IgG-HRP
- Αντίσωμα για rabbit IgG-HRP

Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia coli* στελέχους DH5αTM (Life Technologies - Invitrogen), ο γονότυπος των οποίων περιγράφεται στους Sambrook et al. [1989].

Πλασμιδιακοί φορείς

Στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πλασμιδιακοί φορείς : pMMTV-GRE-Luc, pSV40-β-Gal και pMMTV-NF-kB-Luc.



Διαλύματα

- **DEX:** Είναι διαλυμένη σε EtOH 100 % και αποθηκεύεται στους 20 °C σε συγκέντρωση 1 mM. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1 μM.
- **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 μL 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 μL PMSF 20 mM (20 °C) και 2 μL 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-H₃PO₄ (pH 7.5 στους 25 °C), 1 mM EDTA, 2 % SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN₃ 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 Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ και 1500 mM NaCl. Αποθηκεύεται σε R.T.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×**: Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε R.T.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution)**: Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH₂PO₄ 0.2 M και διβασικού Na₂HPO₄ 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H₂O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.
- **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.

Οργανολογία

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του TBB, καθώς και στο δωμάτιο κυτταροκαλλιιεργειών του Τμήματος.

Τα σημαντικότερα εξ αυτών είναι τα εξής:

- 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)
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντροι (Centrifiger-BL II, eppendorf Centrifuge 5810 eppendorf microcentrifuge 5415 D)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός (Spectronic® 20 GENESYS™)

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

Αναλώσιμα

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

Μέθοδοι

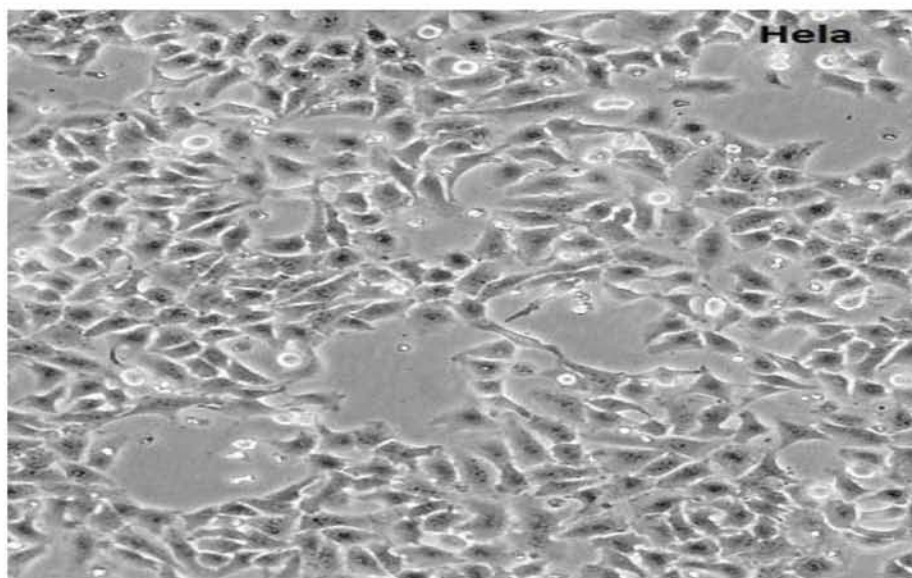
1. Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa και COS-7

Για να κατανοήσουμε τους βιοχημικούς μηχανισμούς εξέλιξης διαφόρων ασθενειών, χρησιμοποιούμε τις συνεχείς κυτταρικές σειρές. Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές αποτελούνται από ένα μόνο είδος κυττάρου που μπορεί να πολλαπλασιασθεί σε καλλιέργεια διαδοχικά είτε για ένα περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων (περίπου τριάντα) είτε με άλλο τρόπο επ 'αόριστον. Αυτές οι κυτταρικές σειρές είναι συνήθως διπλοειδείς και διατηρούν κάποιο βαθμό διαφοροποίησης. Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές που μπορούν να πολλαπλασιασθούν επ 'αόριστον γενικά έχουν αυτή την ικανότητα επειδή έχουν μετασηματιστεί σε κύτταρα όγκου. Οι κυτταρικές σειρές όγκων συχνά προέρχονται από πραγματικούς κλινικούς όγκους, αλλά μετασηματισμός μπορεί επίσης να επαχθεί με χρήση ιικών ογκογονιδίων ή με χημικές επεξεργασίες. Οι μετασηματισμένες κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να υποστούν ανακαλλιέργεια άπειρες φορές, χωρίς να χάσουν κάποια ιδιότητα του ιστού ή του κυτταρικού τύπου από τον οποίο προέρχονται [ATCC]. Το γεγονός αυτό, καθιστά τις συνεχείς κυτταρικές σειρές ένα εξαιρετικό σύστημα μελέτης διαφόρων κυτταρικών διεργασιών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν το 1951, από τον τράχηλο της μήτρας, μιας ασθενούς που πέθανε από αυτού του είδους τον καρκίνο. Αυτή η

ασθενής ονομαζόταν **Henrietta Lacks** και από τα αρχικά του ονοματός της, πήραν την ονομασία τους τα κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα αυτά βρέθηκε ότι έχουν αξιοσημείωτη αντοχή και πολλαπλασιασμό .

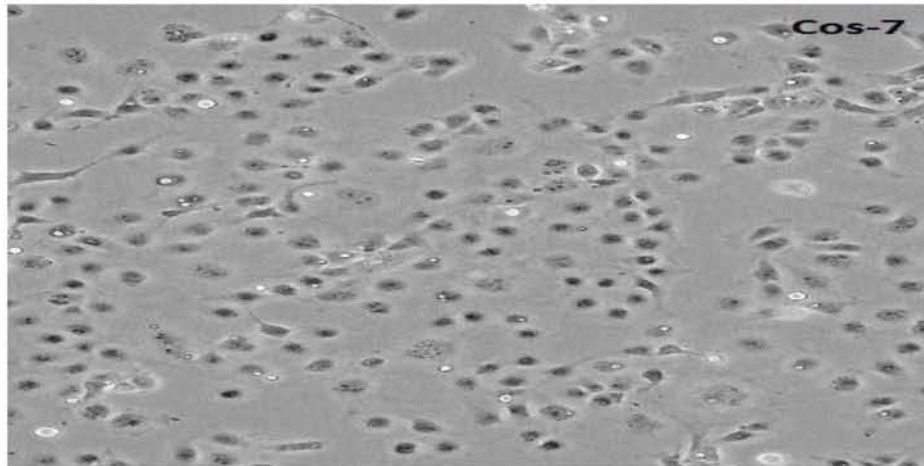
Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από τον ερευνητή George Gey, ο οποίος παρατήρησε ότι τα κύτταρα HeLa **[Εικόνα 13]** μπορούσαν να παραμένουν ζωντανά, σε αντίθεση με άλλα κύτταρα καλλιέργειας, τα οποία πέθαιναν εντός ολίγων ημερών. Ο συγκεκριμένος ερευνητής κατάφερε να απομονώσει μόνο ένα κύτταρο, να το πολλαπλασιάσει και να δημιουργήσει μια ολόκληρη κυτταρική σειρά. Τα HeLa αποτέλεσαν την πρώτη “αθάνατη” καρκινική σειρά, η οποία καλλιεργήθηκε στο εργαστήριο και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για την διεξαγωγή πολλών πειραμάτων. [(Carson SD, 2013);(Capes-Davis A, 2010); (Callaway, 2013); (Callaway, 2013b)].



Εικόνα 13. HeLa κύτταρα

Επίσης, στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα COS-7**[Εικόνα 14]**. Η κυτταρική σειρά COS-7 προέρχεται από το νεφρό του Αφρικανικού πράσινου πιθήκου, *Cercopithecus aethiops*. Αυτά τα κύτταρα περισσότερο μοιάζουν με ανθρώπινους ινοβλάστες και ως εκ τούτου συχνά αποκαλούνται COS-7 ινοβλαστών πιθήκου ή κύτταρα COS-7 που ομοιάζουν με ινοβλάστη. Τα κύτταρα COS-7 δεν είναι πρωτογενή. Η κυτταρική σειρά CV-1 ξεκίνησε στη δεκαετία του 1960 από το νεφρό ενός αφρικανικού Πράσινου πιθήκου. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, αναπτύχθηκε η κυτταρική σειρά COS-7 από την κυτταρική σειρά CV-1 από τον Yakov Gluzman μέσω μετασχηματισμού με τον ιό

Simian Vacuolating Virus 40 (SV40), έναν ιό που κωδικοποιεί το αγρίου τύπου T-αντιγόνο του ιού. Χρησιμοποιώντας υποκινητές SV40, και έναν φορέα μπορείς να έχεις ουσιαστική αντιγραφή των κυττάρων COS χρησιμοποιώντας το μεγάλο T-αντιγόνο. [(Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H, July 1964), (Gluzman Y ,January 1981)].



Εικόνα 14. COS.7 κύτταρα

Όλα τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν ευγενική χορηγία του ΕΙΕ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Παρακάτω, παρατίθενται οι βασικοί κανόνες, οι οποίοι τηρούνται στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών:

- Ο απαγωγός καθέτου νηματικής ροής αποτελεί τον χώρο στον οποίο διεξάγονται όλα τα πειράματα.
- Οτιδήποτε εισαχθεί μέσα στον απαγωγό ψεκάζεται με 70% EtOH
- Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιιεργειες ανοίγει και κλείνει αυστηρά μέσα στον απαγωγό
- Μετά το πέρας οποιασδήποτε εργασίας στον απαγωγό, εφαρμόζεται UV ακτινοβολία για 30min για τον καθαρισμό του χώρου.

2. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C ή σε υγρό άζωτο σε ειδικά φιαλίδια που ονομάζονται cryovials. Αρχικά, η απόψυξη τους γίνεται στο υδατόλουτρο, του οποίου η θερμοκρασία είναι ρυθμισμένη στους 37°C . Μετά το

ξεπάγωμα του εσωτερικού του cryovial, το τελευταίο εισάγεται στον απαγωγό, . Στη συνέχεια, το εσωτερικό του vial μεταφέρεται σε ένα πλαστικό σωλήνα τύπου falcon μαζί με 9ml θρεπτικού κι όλο μαζί φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αφαιρείται ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης, περιεκτικότητας σε γλυκόζη 4,5mg/ml, στο οποίο έχει προστεθεί 1% v/v 200mML-γλουταμίνη (L-Glut), 1% v/v πενικιλίνη/στρεπταμυκίνη (P/S) και 10%v/v FBS. Για την επαναδιαλυτοποίηση, χρησιμοποιούνται 5 ml DMEM για T₂₅ φλάσκα (φλάσκα επιφάνειας 25cm²) και 15 ml DMEM για T₇₅ φλάσκα (φλάσκα επιφάνειας 75cm²). Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα, στους 37°C και σε υγρασία 5% CO₂, κι αφήνονται εκεί μέχρι να αναπτυχθούν σε ποσοστό (confluency) 80-85% της επιφάνειας της φλάσκας. Το χρονικό διάστημα που χρειάζονται τα κύτταρα για να φτάσουν στο 85% της πληρότητας τους διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα πρέπει να παρακολουθούνται συχνά στο μικροσκόπιο ώστε στο σύνολο τους να μην ξεπεράσουν ποσοστό μεγαλύτερο του 90%. Σε περίπτωση που ξεπεράσουν αυτό το ποσοστό, κάποια από τα κύτταρα θα βρίσκονται σε κατάσταση stress, πράγμα το οποίο θα οδηγήσει στην εμφάνιση πολλών αλλοιώσεων σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Εάν τα κύτταρα δεν έχουν φτάσει στην πληροτητά τους μέσα σε 2 μέρες συνίσταται αλλαγή του θρεπτικού μέσου στο οποίο βρίσκονται.

3. Θρυψινοποίηση κυττάρων

Όταν η πληρότητα της φλάσκας φτάσει περίπου στο 80% πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με την χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (DMEM) από την φλάσκα και προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25 %. Τα κύτταρα αφήνονται στον επωαστήρα μέχρι να δράσει η θρυψίνη. Στη συνέχεια, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο, έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι έχει επέλθει η αποκόλληση τους από την φλάσκα. Ακολουθεί η αδρανοποίηση της θρυψίνης με προσθήκη πενταπλάσιου όγκου θρεπτικού υλικού σε αναλογία με τον όγκο του διαλύματος της θρυψίνης. Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 1000 rpm, 22 °C για 5 min και έπειτα το υπερκείμενο αφαιρείται. Ακολουθεί επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με καλό πιπεττάρισμα ,στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (στη συγκεκριμένη περίπτωση σε DMEM High glucose,το οποίο έχει εμπλουτιστεί με FBS,P/S και L-

γλουταμίνη). Τέλος, η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1/20 για T25 και 1/10 για T75) επιστρέφεται στη φλάσκα, με προσθήκη κατάλληλου όγκου θρεπτικού μέσου (5 mL για T25 και 15 mL για T75). Τα κύτταρα απλώνονται μέσα στη φλάσκα και ακολουθεί η επωασή τους στον κλίβανο.

Η συχνότητα επανάληψης της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι περίπου 2 φορές την εβδομάδα, ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Κάθε φορά που γίνεται θρυψινοποίηση των κυττάρων, σημειώνεται πάνω στην φλάσκα ο αριθμός του περάσματος (passage) των κυττάρων, ο οποίος αυξάνεται κατά +1 την φορά και είναι δείκτης της γήρανσης των κυττάρων.

4. Πάγωμα κυττάρων

Μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις ακολουθεί πάγωμα των κυττάρων, έτσι ώστε να υπάρχουν διαθέσιμα stocks στους -80°C . Αφού γίνει η θρυψινοποίηση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, και θερμοκρασία 22°C για 5 min. Στη συνέχεια, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο FBS. Σε κάθε cryovial προστίθενται 0,9ml διαλύματος FBS μαζί με κύτταρα και 0,1ml DMSO (αναλογία FBS : DMSO 9:1). Αμέσως μόλις γίνει η προσθήκη του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (DMSO), γίνεται γρήγορη ανακίνηση και μεταφορά-αποθήκευση στους -80°C .

5. Μέτρηση και Στρώσιμο κυττάρων

Με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer) γίνεται η μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Αρχικά, πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση και μεταφορά μίας πολύ μικρής ποσότητας κυττάρων σε ένα erpendorf. Ακολουθεί λήψη 10μl με πιπέτα και μεταφορά στην πλάκα Neubauer. Επειδή τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν, πρέπει να γίνει καλή ανάδευση των κυττάρων που υπάρχουν στο erpendorf ώστε η ποσότητα των 10μl που θα ληφθεί να είναι αντιπροσωπευτική. Στη μία πλευρά της πλάκας, γίνεται η μεταφορά των 10μl κυττάρων και ακολουθεί η μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στα 4 τεταρτημόρια. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των ζωντανών κυττάρων στα τεταρτημόρια αυτά. Ο αριθμός που προκύπτει αντιστοιχεί στα 10μl, επομένως γίνεται αναγωγή στο 1ml. Έπειτα, με βάση τον αριθμό των wells που χρειάζονται για το πείραμα, γίνεται ο υπολογισμός του όγκου του εναιωρήματος που

θα χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός αυτός διαιρείται με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που είναι διαθέσιμα στην καλλιέργεια, δίνοντας έτσι την ποσότητα αρχικής καλλιέργειας που πρέπει να φυγοκεντρηθεί για 5min στα 1000rpm σε RT (19-25°C). Και στην περίπτωση αυτή, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου. Παρακάτω δίνεται ένα παράδειγμα που συνοψίζει όσα περιγράφηκαν στην ενότητα αυτή.

Έστω, ότι σε ένα 24well-plate θέλουμε να στρώσουμε 5.000 κύτταρα σε 6wells. Τα ζωντανά κύτταρα στα 4 τεταρτημόρια βρέθηκαν πως ήταν: $52+66+37+40=195$. Άρα, ο μέσος όρος ισούται με $195/4=48,75$ cells/10μl. Άρα, για το 1ml ισχύει: $48,75 \times 10.000 = 487.500$ cells. Εφόσον θέλουμε 5000 cells/well, για τα 6wells ισχύει: $5.000 \times 6 = 30.000$ cells. Άρα, φυγοκεντρώνται $30.000/487.500 = 0,0615$ ml ή 61,5μl αρχικής καλλιέργειας.

Το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλυτοποιείται σε: $0,5 \text{ ml/well} \times 6 = 3 \text{ ml}$ κατάλληλου θρεπτικού. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί, πως το θρεπτικό με το οποίο έγιναν όλα τα πειράματα ήταν το DMEM cis, το οποίο αποτελούνται από 10% CIS (Charcoal Inactivated Fetal Bovine Serum), 1% L-Glut και DMEM without phenol red, high glucose (4.5mg/ml) εμπλουτισμένο με 1% P/S.

Το FBS κατεργάζεται με ενεργό άνθρακα και έτσι προκύπτει το FBS CIS. Στόχος αυτής της κατεργασίας είναι η απενεργοποίηση του FBS και έγινε με βάση αναφορά της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Γενικά ο ενεργός άνθρακας έχει την ικανότητα να αφαιρεί ορμόνες ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα τους από το FBS, καθώς μπορεί να προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια. Η αφαίρεση των ορμονών αυτών είναι εξέχουσας σημασίας, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη.

6. Ανοσοϊστοχημεία

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βιολογικών μορίων μέσα σε μία κυτταρική καλλιέργεια. Στηρίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση του αντιγόνου με το αντίστοιχο αντίσωμα και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, με τη μέθοδο αυτή, θέλαμε να εξακριβώσουμε κατά πόσο τα υπό εξέταση g-PPD και g-PPD μπορούν να επάγουν

την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Μαζί με αυτές τις ουσίες εξετάστηκαν και άλλες τριτερπενοειδείς ενώσεις για την πιθανή μετατόπιση του GR στον πυρήνα, οι ουσίες αυτές αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα *Πίνακα 1*.

Πίνακας 1: Οι g-PPD, g-PPT και άλλα υπό εξέταση τριτερπενοειδή.

Συντομογραφία τριτερπενίου
TFC39 ή g-PPD
TFC40 ή g-PPT
TFC22
TFC25
PCUPO1
PCUPO2
TFC28
TFC31
TFC32
TFC₂ 50b
TFC₂50c
TFC₂46G
TFC₁₀ 38
TFC₁₀ 39
TFC₁₀ 40
TFC₇₈ 1
TFC₇₈2
TFC₇₈3
TFC₇₈4
TFC₇₈5
TFC₇₈6
TFC₇₈7
TFC₇₈8

Αρχικά, σε ένα 24wells-plate τοποθετήθηκαν 23 καλυπτρίδες (coverslips), σε 23πηγαδάκια (1 coverslip/well). Στη συνέχεια, στα wells πραγματοποιήθηκαν 2

πλύσεις με 70% EtOH και ακολούθησε έκθεση του plate σε UVακτινοβολία για 30min, έτσι ώστε να αποστειρωθούν. Μετά το πέρας των 30min, το plate τοποθετήθηκε κλειστό στον κλίβανο μέχρι τη στιγμή της χρησιμοποίησής του.

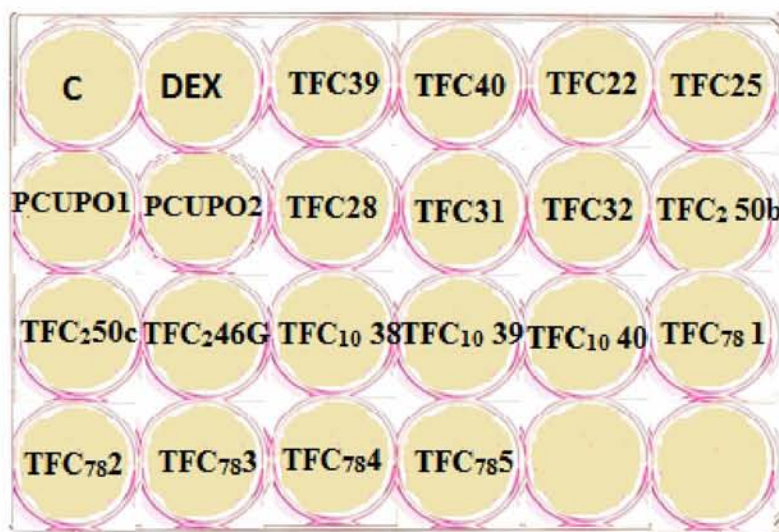
Πειραματική διαδικασία

Ημέρα 0: Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και μέτρηση των κυττάρων. Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν 10.000cells/well. Άρα $10.000\text{cells} \times 23\text{wells} = 230.000\text{cells}$. Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε DMEM-cis (0.5ml/well), κι ακολούθησε διανομή στα πηγαδάκια στα οποία είχαν προστεθεί οι καλυπτρίδες. Το plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο για επώαση.

Ημέρα 3: Πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσιών στα coverslips. Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα:

- ❖ **Mix:** $0,25 \times 24 = 6\text{ml DMEM cis} + 0.8\mu\text{l CMX } 200\text{nM (1:5.000)}$
- ❖ **Control:** $250\mu\text{l Mix} + 0.25\mu\text{l EtOH } 100\% + 0.25\mu\text{l DMSO}$
- ❖ **Dex:** $250\mu\text{l Mix} + 0.25\mu\text{l DEX } 10^{-3}\text{M} + 0.25\mu\text{l DMSO}$
- ❖ **Δείγματα με τριτερπένια:** $250\mu\text{l Mix} + 0.25\mu\text{l EtOH } 100\% + 0.25\mu\text{l υπό εξέταση τριτερπενίου}$

Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το θρεπτικό που υπήρχε μέσα στα wells και προστέθηκαν 250μl κάθε δείγματος σε κάθε well, αντίστοιχα [Εικόνα 13]. Ακολούθως, το plate τοποθετήθηκε στον επωαστήρα, και τα κύτταρα επώαστηκαν για 2h, με τις ουσίες.



Εικόνα 15: Εικόνα του 24well-plate μετά την προσθήκη των δειγμάτων.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να δοθούν κάποιες διευκρινήσεις για τη σύσταση των δειγμάτων. Αρχικά, το DEX, είναι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη, το οποίο προσδένεται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και προκαλεί την μετατόπιση του στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τελικά την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων στόχων των γλυκοκορτικοειδών (*ValsalaHaridas, 2011*). Η DEX αποθηκεύεται στους -20°C , διαλυμένη σε EtOH100%, σε συγκέντρωση 1mM. Στα πειράματα, η τελική της συγκέντρωση είναι 1μM. Στη συνέχεια, να αναφέρουμε ότι οι ουσίες που χρησιμοποιήσαμε είναι διαλυμένες σε DMSO και φυλάσσονται στους -20°C σε συγκέντρωση 10mM και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 10μM. Όσον αφορά το CMXR0S (CMX) αποτελεί μια ζωτική χρωστική, η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Το CMX αποθηκεύεται στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 200nM. Κλείνοντας την παρένθεση αυτή, να αναφερθεί πως η σύσταση του Mix υπολογίστηκε για 24wells, κι όχι για 23wells που ήταν και ο αριθμός των δειγμάτων. Δηλαδή, ο υπολογισμός του mix έγινε για ένα παραπάνω δείγμα, για τυχόν απώλειες κατά την περιραματική διαδικασία.

Μετά το πέρας των 2h, το plate μεταφέρθηκε στον πάγκο του εργαστηρίου, έτσι ώστε να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων.

Αρχικά, κατά την διαδικασία της μονιμοποίησης πραγματοποιείται αφαίρεση των ουσιών από τα πηγαδάκια. Στη συνέχεια, γίνονται 2 πλύσεις με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1× (450ml ddH₂O + 50ml PBS 10×) και ακολουθεί η προσθήκη μεθανόλης και τοποθέτηση του plate για 20 min, στους -20°C . Έπειτα, αφαιρείται η μεθανόλη και γίνεται προσθήκη ακετόνης για 2min. Κατά τη διάρκεια και αυτής της επώασης το plate τοποθετείται στους -20°C . Στη συνέχεια, αφαιρείται η ακετόνη και στο plate τοποθετείται παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1×. Ακολουθεί, αφαίρεση του PBS 1× και έπειτα μια επιπλέον πλύση με PBS 1×. Μετά το πέρας της 1h, γίνονται 2 επιπλέον πλύσεις με PBS 1×. Οι πλύσεις αυτές έχουν ως σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη αφαίρεση της ακετόνης από τα πηγαδάκια, καθώς η παρουσία της προκαλεί διάβρωση του plate και δυσκολεύει την επακόλουθη μετακίνηση των καλυπτρίδων. Μετά την τελευταία πλύση με PBS 1×, απομακρύνονται οι καλυπτρίδες από τα πηγαδάκια και τοποθετούνται στο δικτυωτό. Σε αυτή την φάση, γίνεται προσθήκη του 1^ο αντισώματος, το οποίο στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αντίσωμα έναντι του GR. Έγινε χρήση του GR-H300 σε αραιώση 1/50 (GR-

H300/PBST). Στην επιφάνεια κάθε καλυπτρίδας γίνεται απόχυση 25-30μλαντισώματος. Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1h.

Μετά το πέρας της 1h, ξεπλένουμε μια-μια την καλυπτρίδα σε PBS 1×, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος, και ακουμπάμε την άκρη τους ελαφρά πάνω σε χαρτί. Στο σημείο αυτό, γίνεται προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος το οποίο αποτελείται από:

- ✓ 500μl PBST
- ✓ 1μl χρωστικής Hoechst 33342 10 mg/ml, σε αραιώση 1/1000. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων.
- ✓ 1μl αντισώματος (anti-Rabbit alexa488) σε αραιώση 1/500. Η χρωστική 488 δίνει την πράσινη φθορίζουσα κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Η επώαση με το 2^ο αντίσωμα διήρκησε 1h, σε RT απουσία φωτός. Μόλις ολοκληρωθεί η 1h, τα coverslips ξεπλένονται ένα-ένα με PBS 1×. Στη συνέχεια, τα τοποθετείται διάλυμα PVA σε ένα πλακάκι μικροσκοπίου και πάνω σε αυτό μονιμοποιούνται τα coverslips. Ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε ειδική κασετίνα, και φυλάσσονται στους 4°C απουσία φωτός.

Τέλος, μόλις στεγνώσει το PVA (περίπου σε διάστημα μιας μέρας), τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού και είναι δυνατή η λήψη φωτογραφιών. Το μικροσκόπιο του φθορισμού που διαθέτει το τμήμα είναι το DM 2000 της εταιρίας LEICA κι είναι εξοπλισμένο με Qimaging optiMOS κάμερα, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονίσουμε το γεγονός ότι, από αυτές τις ουσίες που μελετήσαμε, μετατόπιση του GR στον πυρήνα, έδειξαν μόνο οι TFC39 και TFC40. Γι' αυτό τον λόγο, όλα τα παρακάτω πειράματα έγιναν μόνο με βάση αυτές τις ουσίες.

7. Συλλογή κυτταρικών εκγυλισμάτων για Western Blot

Ημέρα 0: Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση, μέτρημα και στρώσιμο των κυττάρων HeLa και των Hepg2 σε δύο 6× wells-platew . Σε κάθε well προστέθηκαν 300.000 κύτταρα (συνολικά:300000x6=1.800.000 για το ένα wells-plate) σε DMEM-Cis (2ml/well) και επώαστηκαν στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂, για 3 ημέρες.

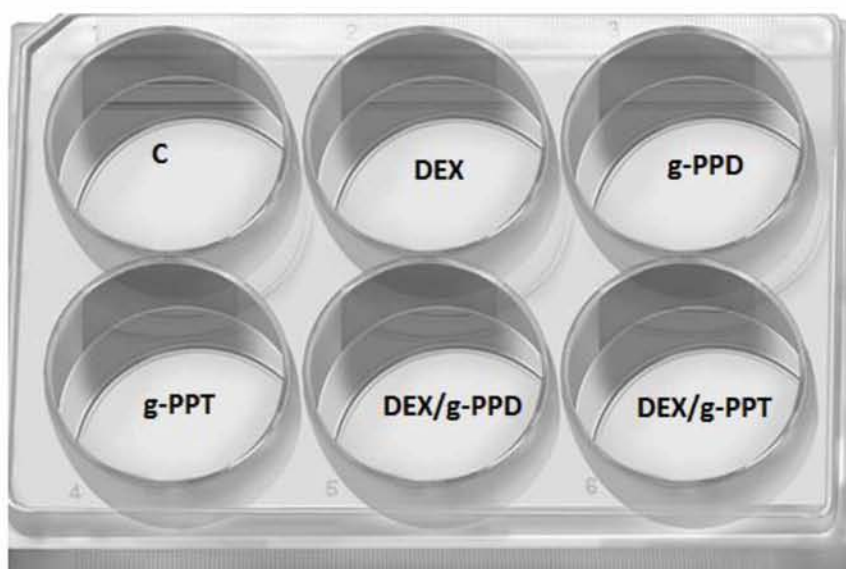
Ημέρα 2: Προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών, αφού πρώτα αφαιρεθεί το DMEM-CIS, από κάθε well. Αρχικά, φτιάχνονται 2 mix, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για να προκύψει η σύσταση των ουσιών μας[Πίνακας.2].

Πίνακας 2.

Falcon1	Falcon2
13 ml DMEM-Cis	13 ml DMEM-Cis
13 μl DEX	13μl EtOH

Η σύσταση των ουσιών φαίνεται παρακάτω [**Εικόνα 14**]:

- 1) **Control:** 4.2ml από το falcon 2 +4.2μl DMSO
- 2) **DEX:** 4.2ml από το falcon 1 +4.2μl DMSO + 4.2μl DEX 10⁻³ M
- 3) **Δείγμα με g-PPD:** 4.2ml από το falcon 2 +4.2μl g-PPD
- 4) **Δείγμα με g-PPT:** 4.2ml από το falcon 2 +4.2μl g- PPT
- 5) **Δείγμα με g-PPD και DEX:** 4.2ml από το falcon 1 +4.2μl g-PPD
- 6) **Δείγμα με g-PPT και DEX:** 4.2ml από το falcon 1 +4.2μl g-PPT



Εικόνα 16:Εικόνα του 6-well-plate μετά την προσθήκη των δειγμάτων.

Τα δύο 6wells-plate με τα κύτταρα και τις ουσίες πλέον, τοποθετούνται στον επωαστήρα στις προκαθορισμένες πάντα συνθήκες των 37°C και 5% CO₂ για 48h.

Μόλις περάσει αυτό το χρονικό διάστημα, απομακρύνονται από τον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και μεταφέρονται στο εργαστήριο, όπου και συνεχίζεται τη υπόλοιπη διαδικασία. Τα πάντα από εδώ και πέρα γίνονται στον πάγο.

Συλλογή των κυττάρων

Την πέμπτη ημέρα, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων με την όλη διαδικασία να πραγματοποιείται στους 4 °C. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων απομακρύνεται με αναρρόφηση και ακολουθεί η έκπλυση των wells με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS. Με τη χρήση ειδικού scraper πραγματοποιείται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων τα οποία μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου erpendorf των 1.5 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 1000 rpm στους 4 °C και στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο, ενώ το ίζημα των κυττάρων αποθηκεύεται στους -80 °C.

Λύση των κυττάρων

Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε Lysis Buffer (LB), το οποίο αποτελείται από:

- ❖ 20mM Tris pH 7.5
- ❖ 0.5% Triton X-100
- ❖ 250mM NaCl
- ❖ 3mM EDTA

Τα 4 αυτά αντιδραστήρια συγκροτούν το 1^ο Buffer , το οποίο φυλάσσεται στους 4°C. Σε ένα 1ml του διαλύματος αυτού προστίθενται τα εξής:

- ❖ 10μl Protease Inhibitors 1/100
- ❖ 2μl DTT 1M, το οποίο χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας
- ❖ 0.5μl PMSF 20mM

Η ποσότητα του LB που θα προστεθεί σε κάθε erpendorf εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος. Συνήθως προστίθεται ποσότητα των 50-70μl. Τα κύτταρα επωάζονται με το LB για διάστημα 40min. Αποφεύγονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, λόγω της ύπαρξης του PMSF στο διάλυμα.

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Κατά το βήμα αυτό, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonicator). Πραγματοποιούνται τρεις επαναλήψεις των 20 sec με ενδιάμεσο διάλειμμα του 1 min, δουλεύοντας στον πάγο (4 °C). Στο επόμενο βήμα, γίνεται προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των κυτταρικών εκχυλισμάτων, με την μέθοδο της Bradford.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών κατά Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Rad. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ έως 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η μέθοδος Bradford είναι χρωματική και στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής Coomassie® Brilliant Blue G-250. Σε περιβάλλον όπου επικρατούν 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 $\lambda=595 \text{ nm}$. Τυχόν αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm, υποδεικνύει αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη, και με βάση αυτήν πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για την κατασκευή της καμπύλης αυτής, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκεντρώσεως. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκαν 980 μL αντιδραστηρίου Bradford 1 \times , σε όγκο 20 μL από το κάθε δείγμα. Στη συνέχεια, έγινε ανάδευση των δειγμάτων με την βοήθεια του Vortex και τα διαλύματα αφήθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου 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 $\lambda=595 \text{ nm}$. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA φαίνονται στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 3].

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA BSA 1 mg/mL

BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH 7.4 (μl)	Αντιδραστήριο Bradford 1 \times (μl)	BSA (μg)	BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
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 χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Σχεδιάστηκε ένα καρτεσιανό επίπεδο συντεταγμένων, όπου στον οριζόντιο άξονα χ'χ υπήρχαν οι τιμές των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης, ενώ κατακόρυφος άξονας γ'γ, υπήρχαν οι τιμές των απορροφήσεων που προέκυψαν. 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Για το κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

- ✚ Προσθήκη 1μl του υπό εξέταση δείγματος στον πάτο ενός αριθμημένου eppendorf
- ✚ προσθήκη προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1× στο ίδιο eppendorf
- ✚ Καλή ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 20min, σε RT απουσία φωτός.
- ✚ Φωτομέτρηση στα 595nm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί. Στον πίνακα που ακολουθεί (**Πίνακας 4 και Πίνακας 5**) δίνεται η σύσταση των δειγμάτων HeLa και Hepg2, που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν (επόμενο στάδιο).

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων HeLa που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν στο επόμενο στάδιο.

<i>Δείγματα</i>	OD_{595}	Συγκέντρωση πρωτεΐνης (ug)	Ποσότητα πρωτεΐνης σε δείγμα (μl)	Tris pH 7.5 20mM (μl)	Ποσότητα S.B 4× (μl)
control	0,506	14,37391	13,9141	46,09	20
DEX	0,584	16,63478	12,023	47,98	20
g-PPD ή TFC39	0,678	19,35942	10,33089	49,67	20
g-PPT ή TFC40	0,573	16,31594	12,25795	47,74	20
g-PPD και DEX	0,56	15,93913	12,54774	47,45	20
g-PPT και DEX	0,639	18,22899	10,97154	49,03	20

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων Herg2 που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν στο επόμενο στάδιο.

Δείγματα	OD ₅₉₅	Συγκέντρωση πρωτεΐνης (ug)	Ποσότητα πρωτεΐνης σε δείγμα (μl)	Tris pH 7.5 20mM (μl)	Ποσότητα S.B 4x (μl)
control	0,315	8,837681	22,63037	37,37	20
DEX	0,284	7,93913	25,19168	34,81	20
g-PPD ή TFC39	0,275	7,678261	26,04757	33,95	20
g-PPT ή TFC40	0,261	7,272464	27,501	32,5	20
g-PPD και DEX	0,253	7,04058	28,40675	31,59	20
g-PPT και DEX	0,21	5,794203	34,51726	25,48	20

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν φυλάσσονται στους -20°C, ενώ τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στους -80°C.

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

Σε ένα βιολογικό εκχύλισμα κυττάρων μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες που θέλουμε με την μέθοδο της ανοσοαποτυπώσεως Western. Αρχικά, διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση ένα πρωτόκολλο ασυνεχούς ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS.

Το SDS φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, καταργώντας με αυτό τον τρόπο, τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τους. Έτσι, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση την μοριακή τους μάζα (MW), καθώς αυτές κινούνται κατά μήκος ενός εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες με μεγαλύτερο μέγεθος παρουσιάζουν αυξημένη τριβή κι έτσι έχουν ελαττωμένη κινητικότητα [John *et al.*, 1991].

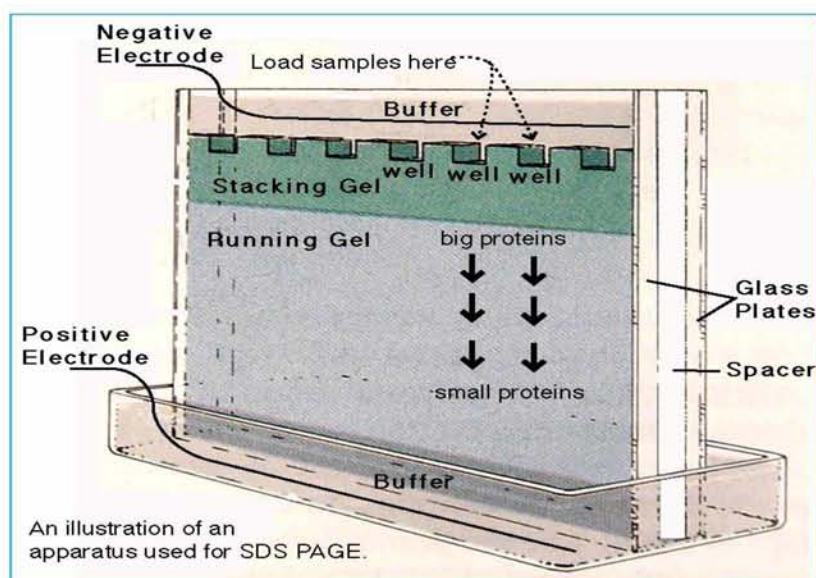
Αρχικά, γίνεται η προετοιμασία της πηκτής της ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή αποτελείται από δύο διαδοχικά πηκτώματα: το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το **πήκτωμα επιστοίβαξης** συμπυκνώνει τις πρωτεΐνες σε μια μικρή ζώνη, ώστε κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία αυτές να φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

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

Η πηκτή φτιάχνεται σε 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.

Τέλος, όταν το πήκτωμα πολυμεριστεί 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 στα <<πηγαδάκια>>, ενώ παράλληλα σε ένα από τα <<πηγαδάκια>> 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.



Εικόνα 17. Πήκτωμα επιστοίβαξης και διαχωρισμού

Πειραματική διαδικασία:

Οι συστάσεις των πηκτωμάτων αναγράφονται στον Πίνακα.6 που ακολουθεί:

Πίνακας 6. Σύσταση των πηκτωμάτων επιστοιβαξης και διαχωρισμού

Πηκτή Διαχωρισμού (10%)		Πηκτή Επιστοιβαξης	
ddH₂O	2.425ml	ddH₂O	2.025ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25ml	Tris-HCl 1.5M pH 6.8	0.21ml
SDS 10%	50μl	SDS 10%	25μl
Bis- Acrylamide 40%	1.25ml	Bis- Acrylamide 40%	0.25ml
APS 10%	25μl	APS 10%	12.5μl
TEMED	2.5μl	TEMED	2.5μl

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 μL loading sample/well και 1-2 μL από το μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών.

Ανοσοαποτύπωση Western (Western Blotting)

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

Αφού το πήκτωμα εξισορροπηθεί, 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. Τυχόν φυσαλίδες οι οποίες έχουν δημιουργηθεί, αφαιρούνται, κατά τη συνάρμωση των υλικών που θα απαρτίσουν την κασέττα, ώστε να μην παρεμβληθούν στο σύστημα και επηρεάσουν τη διέλευση των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, απαραίτητο είναι να τοποθετηθεί η κασέττα με κατάλληλο προσανατολισμό εντός της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. 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.

Υπο την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 350 mA για χρονικό διάστημα 70 min, πραγματοποιείται η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, παρουσία παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Transfer Buffer (new). Ο χρόνος εξαρτάται από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς, την πυκνότητα του πηκτώματος και το μέγεθος των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

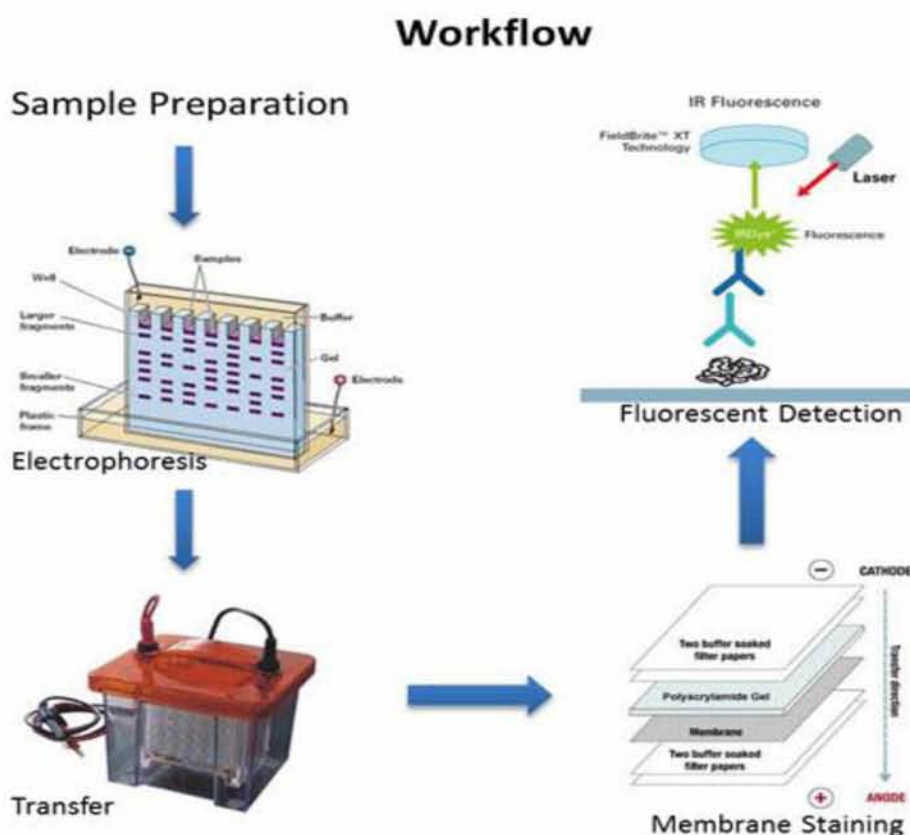
Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται με PBS-T (1×, σε ddH₂O) και σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των ζωνών του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10 % σε PBS-T (1×, σε ddH₂O) για 1 h υπό ανάδευση σε R.T., ώστε να δεσμευτούν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

Τα διαλύματα ECL A και ECL B χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση εμφάνισης σήματος ,σε αναλογία 1:1. Αφού λοιπόν αναμειχθούν τα 2 διαλύματα, με το συνολικό διάλυμα επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μίας 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.



Εικόνα 18. Αναπαράσταση της διαδικασίας της ανοσοαποτύπωσης Western.

Western Blot για PEPCK, GR και β -actin

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όπως προαναφέρθηκε εξετάστηκε ο ρόλος των ουσιών πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη στην GR σηματοδότηση. Με βάση αυτό, με Western Blot analysis μελετήθηκε η επίδραση των τριτερπενοειδών αυτών σε ορισμένα ένζυμα κλειδιά του μεταβολισμού.

Δεδομένων των δομικών ομοιοτήτων των ουσιών μας με τα GCs μελετήθηκε η επιρροή των πρώτων στα μεταγραφικά επίπεδα του γλυκονεογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK). Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PEPCK H-300 σε αραιώση 1/1.000, και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το gHRP της εταιρίας Pierce σε αραιώση 1/2.500.

Στη συνέχεια για να διαπιστωθεί, κατά πόσο οι ουσίες μας δεσμεύονται ή όχι στον GR, κι επομένως έχουν ή όχι κάποια δράση μέσω αυτού του μονοπατιού πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western και για τον υποδοχέα. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GR H-300 σε αραιώση 1/1.000, και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το το gHRP της εταιρίας Pierce σε αραιώση 1/100.000. Τέλος, ως μάρτυρας ισοφόρτωσης (loading control) των δειγμάτων μας στην

ανοσοαποτύπωση Western χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Οι ακτίνες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική κίνηση, δομή και ακεραιότητα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή των συμπερασμάτων από την ανοσοαποτύπωση αυτή γίνεται με βάση την β-ακτίνη.

8. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων μας, στη συγκεκριμένη εργασία έγινε με την μέθοδο των λιποσωμάτων στα κύτταρα HeLa και με την χρήση του CaCl_2 στα κύτταρα COS.7. Στη μέθοδο των λιποσωμάτων, το εξωγενές γενετικό υλικό βρίσκεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της λιπιδικής φύσης της μεμβράνης. Από την άλλη μεριά, στο transfection με CaCl_2 , το CaCl_2 βοηθά το DNA να προσδεθεί στην επιφάνεια των κυττάρων και στη συνέχεια, με ενδοκύτωση εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου.

Όσον αφορά την μέθοδο των λιποσωμάτων, έγινε χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA/χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1/1. Τα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, με βάση τα χρησιμοποιούμενα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά και βέβαια το σκοπό εκτέλεσης κάθε πειράματος. Στην επόμενη υποενότητα δίνεται η διαδικασία απομόνωσης των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν και στις επόμενες υποενότητες ακολουθεί αναλυτική περιγραφή του κάθε πειράματος.

9. Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακών φορέων

Για την επίτευξη ημιστείων συνθηκών, η συγκεκριμένη διαδικασία έγινε στον πάγκο του εργαστηρίου παρουσία αναμένου λύχνου. Αρχικά, δεκτικά κύτταρα *E.coli* στελέχους DH5aTM (Life Technologies- Invitrogen) μετασχηματίστηκαν με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Να αναφερθεί πως τα κύτταρα αυτά βρίσκονται αποθηκευμένα σε 30-40% γλυκερόλη στους -20°C . Στη συνέχεια, έγινε εισαγωγή 1μl του επιθυμητού πλασμιδίου (αποθηκευμένο στους -20°C σε γλυκερόλη) σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5ml) το οποίο περιείχε 80μl από τα κύτταρα *E.coli*. Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 30min τουλάχιστον και στη συνέχεια το erpendorf επώαστηκε σε υδατόλουτρο για 1min στους 42°C . Έπειτα, τοποθετήθηκε για 2min στους 4°C και ακολούθησε η προσθήκη 1ml αποστειρωμένου LB Broth. Ακολούθησε, επώαση στους 37°C για 1h και κατόπιν έγινε επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τρυβλίο, το οποίο περιέχει αντιβιοτικό, αμπικιλίνη ή καναμυκίνη σε συγκέντρωση 100mg/ml ή 50mg/ml, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου έγινε η διασπορά των κυττάρων στο τρυβλίο, κι έπειτα επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 16h.

Μετά το πέρας των 16h, έγινε απομόνωση κι καθαρισμός των νέων πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN (QIAGEN® 2012) κάνοντας χρήση το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλής καθαρότητας και επαρκούς συγκέντρωσης για

τα πειράματα διαμόλυνσης. Ο έλεγχος καθαρότητας καθώς και η ποσοτικοποίηση του pDNA έγινε με φωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1/200. Τέλος, τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

10.Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & pMMTV-GRE-Luc

Στο πρώτο πείραμα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSV40- βGal και pMMTV-GRE-Luc σε αρχικές συγκεντρώσεις 920ng/μl και 882ng/μl, αντίστοιχα. Στο πείραμα αυτό, θέλαμε να εξετάσουμε εάν οι ουσίες μας, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη, μπορούν να ενεργοποιήσουν την μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μετά από απευθείας πρόσδεση του στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) που εντοπίζονται στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το συγκεκριμένο πείραμα έγινε παρουσία κι απουσία δεξαμεθαζόνης, η οποία είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που ενεργοποιεί τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και τον μεταφέρει στον πυρήνα, προκαλώντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής. Έτσι, συγκρίνοντας την δράση των ουσιών μας με αυτήν της δεξαμεθαζόνης, μπορούμε να δούμε αν αυτές δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά παρουσία DEX.

Πειραματική διαδικασία

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο ενός 24wells-plate (19wells). Σε κάθε well στρώθηκαν 50.000cells, επαναδιαλυτοποιημένα σε 0,5 ml DMEMcis.

Day 1: Transfection των κυττάρων με pSV40- βGal και pMMTV-GRE-Luc σε συγκεντρώσεις 0.15 μg/well και 0.15 μg/well, αντίστοιχα. Αρχικά, σε κάθε well αφαιρείται το θρεπτικό που περιέχεται σε αυτό και προστίθεται 200μl OPTIMEM (θρεπτικό της διαμόλυνσης), στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή αντιβιοτικού. Στη συνέχεια, τα plates επανατοποθετούνται στον επωαστήρα μέχρι να γίνει η διαμόλυνση τους με το εξωγενές γενετικό υλικό.

Το transfection, γίνεται με την χρήση λιποφεκταμίνης® 2000 σε αναλογία εξωγενούς DNA/ χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1/1. Συνολικά, γίνεται εισαγωγή 0.3 μgDNA/well- 0.15 μg από το κάθε πλασμίδιο- και με βάση την αναλογία 1/1 προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης. Για τις ανάγκες του transfection του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα mix, για 19 wells:

Mix1: 475 μl OPTIMEM + 3,1 μl βGal (920ng/μl) + 3,2 μl GRE-Luc (882ng/μl).

Mix2: 475μl OPTIMEM + 5.7μl lipofectamine.

Στη συνέχεια, γίνεται ανάμιξη των 2Mix, με μεταφορά του mix1 στο mix2 και ακολουθεί επώαση του νεοσχηματιζόμενου Master-mix στο σκοτάδι για 5-10min. Σε κάθε well, εισάγουμε 50μl από το Master, έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε well να είναι 250μl. Στη συνέχεια τα plates επιστρέφουν στον επωαστήρα όπου κι επωάζονται

για 4h. Μετά το πέρας των 4h, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού με DMEM cis. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον επωαστήρα με το νέο θρεπτικό για 48h.

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 19 wells. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το σχεδιάγραμμα του plate, όπως τοποθετήθηκαν οι ουσίες, παρουσία και απουσία Dex.

control	control	control	Dex	Dex	Dex
g-PPD	g-PPD	g-PPD	g-PPD	g-PPD	g-PPD
			+	+	+
			Dex	Dex	Dex
g-PPT	g-PPT	g-PPT	g-PPT	g-PPT	g-PPT
			+	+	+
			Dex	Dex	Dex

Χρησιμοποιήθηκαν 2 (Master) Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι δεξαμεθαζόνη. Με βάση αυτά, η σύσταση των ουσιών μας δίνεται παρακάτω:

Mix₁ DEX⁻: 2.3ml DMEM cis + 2.3μl EtOH 100%

Mix₂ DEX⁺: 2.3 ml DMEM cis + 2.3μl DEX 10⁻⁴ M

Control: 750μl Mix DEX⁺ + 0.75μl DMSO

DEX: 750μl Mix DEX⁺ + 0.75μl DMSO

g-PPD ή g-PPT DEX⁻: 750μl Mix DEX⁻ + 0.75μl g-PPD ή g-PPT

g-PPD ή g-PPT DEX⁺: 750μl Mix DEX⁺ + 0.75μl g-PPD ή g-PPT

Σε κάθε well γίνεται εισαγωγή 250μl του αντίστοιχου δείγματος. Τα plates τοποθετούνται στον επωαστήρα για 6h.

Μετά το πέρας των 6h, γίνεται η λύση των κυττάρων. Αρχικά, γίνεται απομάκρυνση των ουσιών κι έκπλυση των wells με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1×. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 70μl/well παγωμένου Lysis Buffer 1× (υπάρχει σε stock σε συγκέντρωση 5×). Στη συνέχεια, τα plates επωάζονται για 30min στους 4°C σε ήπια ανάδευση. Ακολουθεί αποκόλληση του περιεχομένου κάθε well μέσω απόξεσης με tip και τοποθέτησή του σε αριθμημένο σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5ml). Τα erpendorf φυγοκεντρώνονται για 30min στους 4°C σε 13.500rpm. Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο- σε νέο αριθμημένο erpendorf χωρητικότητας 1.5ml- κι αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την εκτέλεση των δοκιμασιών λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.

11. Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Συνίσταται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες:

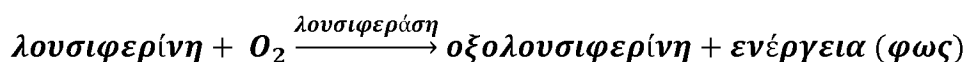
- 1) τη δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης
- 2) τη δοκιμασία μέτρησης της β-γαλακτοσιδάσης.

Με βάση τα αποτελέσματα και των δύο δοκιμασιών, κανονικοποιούνται και εξάγονται οι τιμές.

1) Δοκιμασία λουσιφεράσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες GRE αλληλουχίες, και έτσι η έκφραση του υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR. Γι' αυτό, τον λόγο, το γονίδιο της λουσιφεράσης, χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες που αφορούν τη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή.

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.

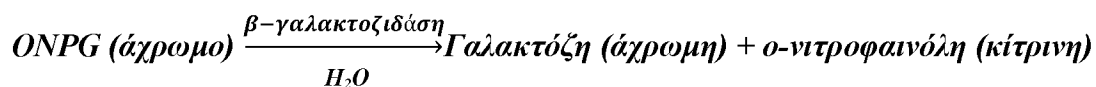
Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά, αφήνονται τα δείγματα να ξεπαγώσουν από τους -80°C σε πάγο. Στη συνέχεια, γίνεται ανάμιξη 10μl του υπό εξέταση δείγματος με 100μl διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο και απαρτίζεται από τα εξής συστατικά: 470μM λουσιφερίνη, 530μM ATP, 270μM συνένζυμο-A, 20mM Tris pH 8, 2.67mM MgSO_4 , 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, ddH₂O.

2) Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

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

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



Η αντίδραση καταστέλλεται με προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση απενεργοποιείται και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος. Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm.

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά, γίνεται εισαγωγή 20μl από κάθε υπό εξέταση δείγμα σε νέο αριθμημένο erpendorf. Σε αυτό προστίθενται 3μl διαλύματος ιόντων Mg^+ 100× και 201μl διαλύματος sodium phosphate. Το διάλυμα ιόντων Mg^{2+} αποτελείται από 31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v MgCl_2 και 58.5 % v/v ddH₂O. Τελευταίο προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, όγκου 66 μL. Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος (30 min – O/N). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500 μL διαλύματος Na_2CO_3 1 M. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm, αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του μηχανήματος με το τυφλό. Το τυφλό περιέχει ό,τι και τα υπόλοιπα διαλύματα με τη διαφορά πως αντί για δείγμα έχουν προστεθεί 20 μL από το χρησιμοποιηθέν Lysis Buffer.

12. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & pMMTV- NF-κB-Luc

Με το συγκεκριμένο πείραμα εξετάσαμε την πιθανή καταστολή του NF-κβ από τις ουσίες μας μέσω GR σηματοδότησης. Στο transfection αυτό, οι συνθήκες του πειράματος παραμένουν οι ίδιες με αυτές που προαναφέρθηκαν με μοναδικές διαφορές τις δύο παρακάτω. Στη θέση του πλασμιδίου pMMTV-GRE-Luc χρησιμοποιείται πλασμίδιο για τον NF-κβ (pMMTV-NF-κB-Luc) για ευνόητους λόγους, ενώ χρησιμοποιείται το ίδιο πλασμίδιο για τη β-γαλακτοσιδάση. Αυτή η ομάδα πειραμάτων διαμόλυνσης έγινε παρουσία και απουσία TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), κι όχι δεξαμεθαζόνης. Μέσω των πειραμάτων αυτών μελετήθηκε τόσο η πιθανή δράση των ουσιών μας μέσω της GR σηματοδότησης, όσο και η πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του TNFα και των υπό εξέταση ενώσεων.

Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται πιο πάνω. Παρακάτω δίνεται συνοπτικά η πορεία του πειράματος:

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο ενός 24wells-plate (24wells). Σε κάθε well στρώθηκαν 50.000cells, επαναδιαλυτοποιημένα σε 0,5 ml DMEMcis.

Day 1: Transfection των κυττάρων, με λιποφεκταμίνη, και με pSV40- βGal και pMMTV- NF-κB-Luc σε συγκεντρώσεις 920ng/μl και 770ng/μl, αντίστοιχα.

. Για τις ανάγκες του transfection του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα mix, για 24 wells:

Mix1: 625 μl OPTIMEM + 4.1 μl βGal (920ng/μl) + 4.87μl- NF-κB-Luc (770ng/μl).

Mix2: 625μl OPTIMEM + 7.5 μl lipofectamine.

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 24 wells. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το σχεδιάγραμμα του plate, όπως τοποθετήθηκαν οι ουσίες, παρουσία και απουσία TNFα.

Control	control	control	Control + TNFα	Control + TNFα	Control + TNFα
Dex	Dex	Dex	Dex + TNFα	Dex + TNFα	Dex + TNFα
g-PPD	g-PPD	g-PPD	g-PPD + TNFα	g-PPD + TNFα	g-PPD + TNFα
g-PPT	g-PPT	g-PPT	g-PPT + TNFα	g-PPT + TNFα	g-PPT + TNFα

Χρησιμοποιήθηκαν 2 (Master) Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι TNFα. Με βάση αυτά, η σύσταση των ουσιών μας δίνεται παρακάτω:

Mix₁ TNFα⁻: 2.5ml DMEM cis + 2.5μl EtOH 100%

Mix₂ TNFα⁺: 2.5 ml DMEM cis + 2.5μl TNFα

Control TNFα⁻: 600μlMixTNFα⁻+ 0.6μl DMSO + 0.6 μl EtOH

Control TNFα⁺: 600μlMixTNFα⁺+ 0.6μl DMSO + 0.6 μl EtOH

DEX TNFα⁻: 600μlMixTNFα⁻+ 0.6μl DMSO + 0.6μl Dex

DEX TNFα⁺: 600μlMixTNFα⁺+ 0.6μl DMSO + 0.6μl Dex

g-PPD ή g-PPT TNFα⁻: 600μlMixTNFα⁻+ 0.6μl g-PPD ή g-PPT + 0.6 μl EtOH

g-PPD ή g-PPT TNFα⁺: 600μlMixTNFα⁺+ 0.6μl g-PPD ή g-PPT + 0.6 μl EtOH

Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και τα πρωτόκολλα προσδιορισμού της λουσιφεράσης και της γαλακτοζιδάσης ακριβώς όπως περιγράφονται στα προηγούμενα εδάφια.

13. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων COS.7 με τα πλασμίδια pSV40-βGal & pMMTV- NF-κB-Luc

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η πιθανή αντιφλεγμονώδης δράση των ουσιών μας, γίνεται μέσω σηματοδότησης του GR, επαναλάβαμε το ίδιο πείραμα, που προαναφέρθηκε, σε COS-7 κύτταρα, τα οποία εκφράζουν τον GR σε χαμηλά επίπεδα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η παροδική διαμόλυνση έγινε με την μέθοδο του CaCl₂.

Πειραματική διαδικασία

Day 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων και στρώσιμο ενός 24wells-plate (24wells). Σε κάθε well στρώθηκαν 35.000cells, επαναδιαλυτοποιημένα σε 0,5 ml DMEM-cis.

Day 1: Transfection των κυττάρων με pSV40- βGal και pMMTV-NF-κB-Luc σε συγκεντρώσεις 920ng/μl και 770ng/μl, αντίστοιχα. Αρχικά, σε κάθε well αφαιρείται το θρεπτικό που περιέχεται σε αυτό και προστίθεται 270μl DMEM-cis (θρεπτικό της διαμόλυνσης), στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή αντιβιοτικού. Στη συνέχεια, τα plates επανατοποθετούνται στον επωαστήρα μέχρι να γίνει η διαμόλυνση τους με το εξωγενές γενετικό υλικό.

Το transfection, γίνεται με την χρήση CaCl₂ σε αναλογία εξωγενούς DNA/ χρησιμοποιούμενου CaCl₂, 1/5. Συνολικά, γίνεται εισαγωγή 0.3 μgDNA/well- 0.15 μg από το κάθε πλασμίδιο- και με βάση την αναλογία 1/5 προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα CaCl₂. Για τις ανάγκες του transfection του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα mix, για 24 wells:

Mix1: 375 μl HBS χ2

Mix2: 37.5 CaCl₂ + 4.07 μl βGal (920ng/μl) + 4.87 NF-κB-Luc (770ng/μl)+328.56μl ddH₂O

Στη συνέχεια, γίνεται επώαση του κάθε mix για 8 min. Ακολουθεί ανάμιξη των 2Mix, με μεταφορά του mix2 στο mix1 και ακολουθεί επώαση του νεοσχηματιζόμενου Master-mix για 25min. Σε κάθε well, εισάγουμε 30μl από το Master, έτσι ώστε ο τελικός όγκος κάθε well να είναι 300μl. Στη συνέχεια τα plates επιστρέφουν στον επωαστήρα όπου κι επωάζονται για 16h. Μετά το πέρας των 16h, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού με καινούργιο DMEM cis. Τα κύτταρα επανατοποθετούνται στον επωαστήρα με το νέο θρεπτικό για 48h.

Day 3: Προσθήκη ουσιών στα 24 wells. Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το σχεδιάγραμμα του plate, όπως τοποθετήθηκαν οι ουσίες, παρουσία και απουσία TNF α .

Control	control	control	Control + TNFα	Control + TNFα	Control + TNFα
Dex	Dex	Dex	Dex + TNFα	Dex + TNFα	Dex + TNFα
g-PPD	g-PPD	g-PPD	g-PPD + TNFα	g-PPD + TNFα	g-PPD + TNFα
g-PPT	g-PPT	g-PPT	g-PPT + TNFα	g-PPT + TNFα	g-PPT + TNFα

Χρησιμοποιήθηκαν 2 (Master) Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι TNF α . Με βάση αυτά, η σύσταση των ουσιών μας δίνεται παρακάτω:

Mix₁ TNF α ⁻: 2.5ml DMEM cis + 2.5 μ l EtOH 100%

Mix₂ TNF α ⁺: 2.5 ml DMEM cis + 2.5 μ l TNF α .

Control TNF α ⁻: 600 μ l MixTNF α ⁻ + 0.6 μ l DMSO + 0.6 μ l EtOH

Control TNF α ⁺: 600 μ l MixTNF α ⁺ + 0.6 μ l DMSO + 0.6 μ l EtOH

DEX TNF α ⁻: 600 μ l MixTNF α ⁻ + 0.6 μ l DMSO + 0.6 μ l Dex

DEX TNF α ⁺: 600 μ l MixTNF α ⁺ + 0.6 μ l DMSO + 0.6 μ l Dex

g-PPD ή g-PPT TNF α ⁻: 600 μ l MixTNF α ⁻ + 0.6 μ l g-PPD ή g-PPT + 0.6 μ l EtOH

g-PPD ή g-PPT TNF α ⁺: 600 μ l MixTNF α ⁺ + 0.6 μ l g-PPD ή g-PPT + 0.6 μ l EtOH

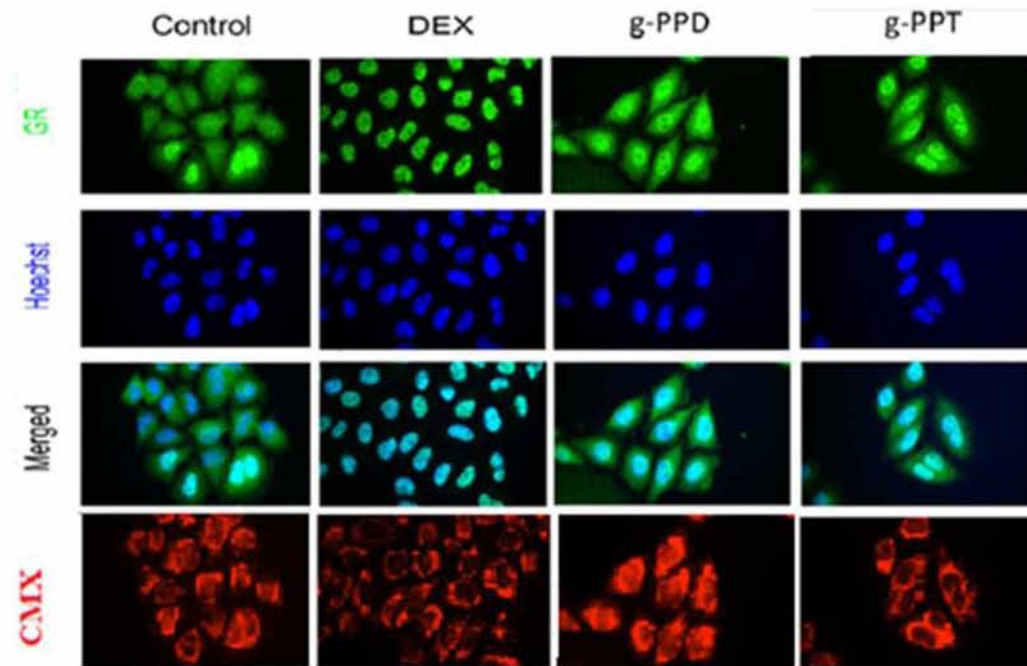
Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων και τα πρωτόκολλα προσδιορισμού της λουσιφεράσης και της γαλακτοζιδάσης ακριβώς όπως περιγράφονται στα προηγούμενα εδάφια.

Αποτελέσματα- Συζήτηση

1. Οι πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, αρχικά διεξήχθησαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας, με τα οποία ελέγξαμε αν η πρωτοπαναξαδιόλη και η πρωτοπαναξατριόλη μπορούν να προκαλέσουν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Επίσης, με ανοσοϊστοχημεία, ελέγχθηκαν και άλλες τριτερπενοειδείς ενώσεις (οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω), οι οποίες δεν προκάλεσαν την πυρηνική μετατόπιση του GR και έτσι οι εικόνες που πήραμε από αυτές τις ουσίες ήταν όμοιες με τις εικόνες του control.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, που δεν περιείχε ορμόνες, (DMEM-Cis) παρουσία ή απουσία 1μM δεξαμεθαζόνης (DEX), η οποία ήταν διαλυμένη σε EtOH ή 10μM των ουσιών μας, οι οποίες ήταν διαλυμένες σε DMSO. Η επώαση έγινε στους 37°C και σε 5% υγρασία για 2h. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές CMX και Hoechst 33342, με τις οποίες έγινε χρώση των μιτοχονδρίων και του πυρήνα, αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα έναντι του GR, ώστε να ελεγχθεί η ικανότητα μετακίνησης του στον πυρήνα, από τις ουσίες μας. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως η λήψη των εικόνων φθορισμού έγινε με την κάμερα Qimaging optiMOS, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη. Στην παρακάτω εικόνα, φαίνεται ότι η πρωτοπαναξαδιόλη και η πρωτοπαναξαδιόλη προκαλούν μια σχετική πυρηνική μετατόπιση του GR, όμοια με την DEX [Εικόνα 19].



Εικόνα 19: Κύτταρα HeLa, που έχουν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1 μ M DEX (διαλυμένη σε EtOH) ή 10 μ M g-PPD και g-PPT (διαλυμένα σε DMSO) για 2 ώρες. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως control επώαστηκαν με EtOH (1/1000) και DMSO (1/1000). Τα κύτταρα κατεργάστηκαν με κατάλληλες χρωστικές και αντισώματα για την σήμανση των μιτοχονδρίων, των πυρήνων και του GR. Ο GR απεικονίζεται με πράσινη χρωστική, ο πυρήνας με μπλε χρωστική, ενώ τα μιτοχόνδρια με κόκκινη χρωστική. Οι εικόνες ανοσοϊστοχημείας, οι οποίες λήφθηκαν μέσω κάμερας Qimaging optiMOS (ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη), έδειξαν ότι οι g-PPD και g-PPT επάγουν μετατόπιση του GR στον πυρήνα.

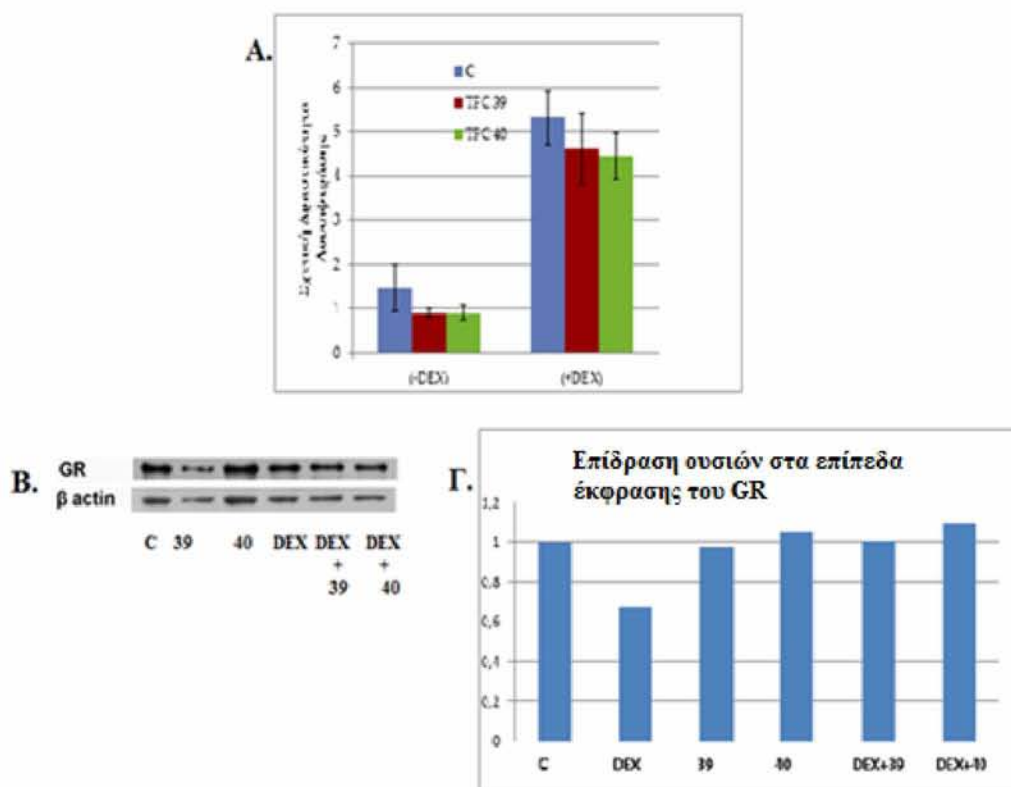
2. Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Το πείραμα της παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40- β Gal και pMMTV-GRE-Luc, παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης, είχε ως στόχο να διερευνήσει εάν οι g-PPD και g-PPT, μπορούν να ενεργοποιήσουν την μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) μετά από απευθείας πρόσδεση του στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) που εντοπίζονται στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της λουσιφεράσης. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη (DEX), η οποία, όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές και έχει την ικανότητα να προκαλεί πυρηνική μετατόπιση του GR και έναρξη της μεταγραφής.

Όπως φαίνεται στην *εικόνα 20A*, παρουσία DEX παρατηρείται αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, η οποία είναι και αναμενόμενη. Συνολικά, οι εξεταζόμενες ουσίες είτε παρουσία είτε απουσία DEX, δεν προκάλεσαν σημαντική

μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Αυτό σημαίνει ότι οι ουσίες μας δεν προκαλούν άμεση ενεργοποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Στο διάγραμμα της **εικόνας 20A**, φαίνεται ότι οι ουσίες μας προκαλούν μια σχετική μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα control, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν γενικό συμπέρασμα αρκετών επαναλήψεων που έλαβαν χώρα για τη διερεύνηση του συγκεκριμένου ερωτήματος.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η DEX μειώνει σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα του διαθέσιμου GR στους περιφερικούς ιστούς (σπλήνα και υπόφυση) αλλά και σε κύτταρα HeLa. Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η μείωση αυτή εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης δεξαμεθαζόνης [(Chenran Zhang, 2015); (Cole MA, 2000); (Nishimura K, 2001)]. Η παραπάνω πληροφορία επιβεβαιώνεται και στην ανάλυση Western σε κύτταρα HeLa (**Εικόνα 20B**), από την οποία φαίνεται ότι η δεξαμεθαζόνη μειώνει τα επίπεδα ΕΚΦΡΑΣΗΣ του GR, σε αντίθεση με τις ουσίες, οι οποίες δεν επηρεάζουν τα επίπεδά του. Η ανάλυση Western Blot, συνοδεύεται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης του διαθέσιμου GR μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης (**Εικόνα 20Γ**).

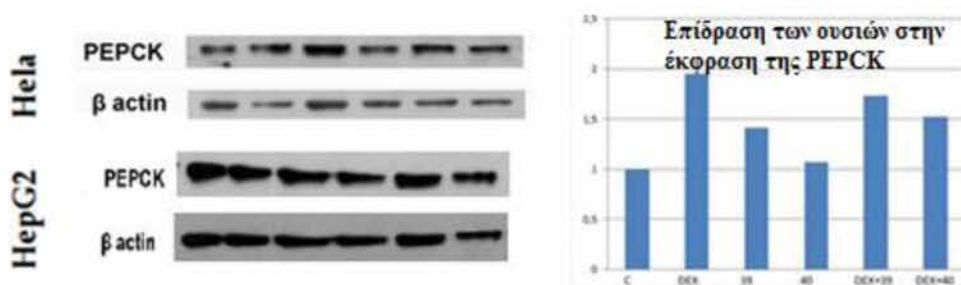


Εικόνα 20: Α) Επίδραση των ουσιών g-PPD και g-PPT στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR με δοκιμασία λουσιφεράσης- γαλακτοσιδάσης. Β) Επίδραση των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης του GR με Western Blot ανάλυση. Γ) Ποσοτικοποίηση του σήματος μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της Western, ως προς την ακτίνη.

3. Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι ουσίες μας δεν επιδρούν στη μεταγραφική ενεργότητα του GR, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης του γλυκονεογενετικού ενζύμου, καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), ενός γονιδίου στόχου του GR, μέσω Western Blot ανάλυσης, σε κύτταρα HeLa και HepG2. Είναι γνωστό, ότι το ένζυμο αυτό ρυθμίζεται από την παρουσία γλυκοκορτικοειδών και επάγεται παρουσία δεξαμεθαζόνης [(Hwang SL, 2012); (Sengupta S, 2001); (Hall RK, 2007)].

Συμπερασματικά, παρουσία δεξαμεθαζόνης υπάρχει η αναμενόμενη αύξηση των επιπέδων της PEPCK, δεδομένου και των μειωμένων επιπέδων GR παρουσία DEX σε κύτταρα HeLa. Αντίθετα, παρουσία των g-PPD και g-PPT δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, λαμβάνοντας υπό όψιν και την κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι οι ουσίες μας δεν δρουν υπερ της γλυκονεογένεσης [**Εικόνα 21**].



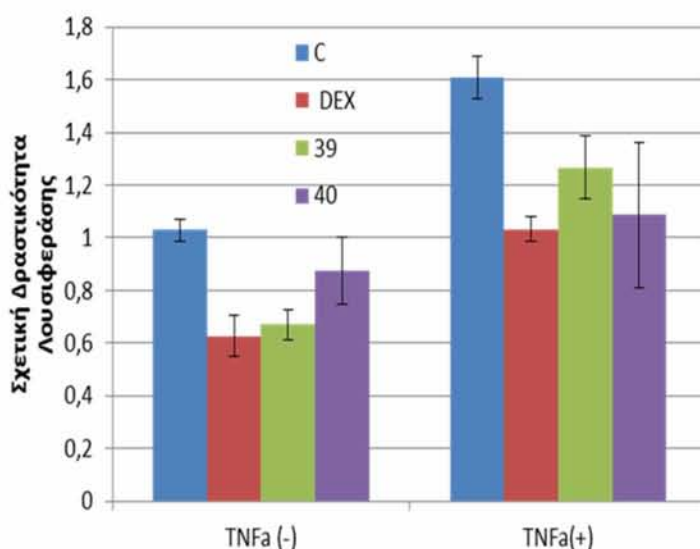
Εικόνα 21: Ανοσοαποτύπωση κατά Western της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), ενός γονιδίου στόχου του GR σε κύτταρα HeLa και HepG2 και η ποσοτικοποίηση του σήματος, η οποία προκύπτει από κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της PEPCK ως προς την ακτίνη στα κύτταρα HeLa. Οι g-PPD και g-PPT δεν επάγουν τα επίπεδα έκφρασης της PEPCK (ακτίνη, μόριο κανονικοποίησης).

4. Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στην μεταγραφική δραστηριότητα του NF- κ B σε κύτταρα HeLa

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να διερευνηθεί, κατά πόσο οι ουσίες g-PPD και g-PPT έχουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις, καταστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF- κ B. Για το λόγο αυτό, το πείραμα διεξάχθηκε παρουσία και απουσία TNF- α , ενός ενεργοποιητή του NF- κ B.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22**, στα κύτταρα control, παρουσία TNF- α , ο NF- κ B, ενεργοποιείται από τον TNF- α . Αντίθετα, όταν προστίθεται δεξαμεθαζόνη ή κάποια από τις ουσίες μας, αυτές καταστέλλουν την ενεργοποίηση του NF- κ B που επάγεται από τον TNF- α . Επίσης, σε κύτταρα που δεν έχει προστεθεί TNF- α , οι ουσίες μας προκαλούν μείωση της

δραστηκότητας του ενδογενούς μη ενεργοποιημένου NF-κΒ. Από όλα αυτά, συμπεραίνουμε ότι οι ουσίες μας έχουν αντιφλεγμονώδη δράση.



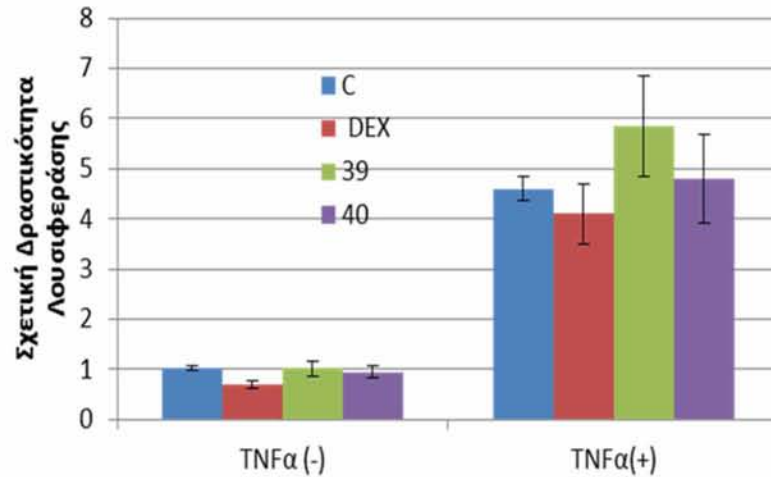
Εικόνα 22: Δοκιμασία λουσιφεράσης σε HeLa κύτταρα. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι οι g-PPD και g-PPT επάγουν την μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κΒ, ο οποίος ενεργοποιείται από τον TNF-α, σε κύτταρα HeLa, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς GR.

5. Η επίδραση των g-PPD και g-PPT στην μεταγραφική δραστηκότητα του NF-κβ σε κύτταρα COS-7

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η πιθανή αντιφλεγμονώδης δράση των ουσιών μας, γίνεται μέσω σηματοδότησης του GR, επαναλάβαμε το ίδιο πείραμα, που προαναφέρθηκε, σε COS-7 κύτταρα, τα οποία εκφράζουν τον GR σε χαμηλά επίπεδα.

Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 23**, παρουσία TNF-α, οι ουσίες g-PPD και g-PPT δεν καταστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Αντίθετα, ο NF-κΒ ενεργοποιείται σε ποσοστά παρόμοια με αυτά του δείγματος αναφοράς (control), παρουσία των ουσιών. Επίσης, σε κύτταρα που δεν έχει προστεθεί TNF-α, οι υπό μελέτη ουσίες δεν προκαλούν μείωση της ενεργότητας του πιθανώς ενδογενώς ενεργοποιημένου NF-κΒ.

Συμπερασματικά, καθώς τα κύτταρα COS-7 εκφράζουν σε χαμηλά ποσοστά τον GR, καταλήγουμε στο γεγονός ότι οι ουσίες μας έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, η οποία, επιτελείται τουλάχιστον μερικώς μέσω GR σηματοδότησης



Εικόνα 23: Δοκιμασία λουσιφεράσης σε cos.7 κύτταρα. Στο σχεδιαγράμμα φαίνεται ότι οι g-PPD και g-PPT δεν επάγουν τη μείωση της από TNF-α επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB σε κύτταρα COS-7, τα οποία εκφράζουν τον GR σε χαμηλά ποσοστά.

Συζήτηση

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, το μεταβολισμό, την ανοσολογική απόκριση και την απόπτωση μέσω του αντίστοιχου υποδοχέα τους, του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), με γενωμικό ή μη γενωμικό μηχανισμό δράσης. Τα GCs έχουν αντι-φλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις, και γι' αυτό χρησιμοποιούνται συχνά για την θεραπεία διαφόρων χρόνιων νόσων, όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι αιματολογικοί καρκίνοι. Ωστόσο, η χρόνια χρήση των GCs προκαλεί δυσμενείς παρενέργειες, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η απώλεια μυϊκής μάζας, η ανακατανομή του λίπους, κ.α. Έτσι, προκύπτει ανάγκη για επιλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRA), οι οποίοι θα είναι εξίσου αποτελεσματικοί όσο και τα κλασικά GCs, αλλά με μειωμένες παρενέργειες

Συνοψίζοντας, όσα παρουσιάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, οι ουσίες πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη επάγουν την μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα, χωρίς να ενεργοποιούν την μεταγραφική του δραστηριότητα. Επίσης, οι ουσίες αυτές έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς καταστέλλουν την μεταγραφική ενεργότητα του παράγοντα NF-κB. Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονιστεί ότι η ανοσοκατασταλτική και η αντιφλεγμονώδη δράση των συγκεκριμένων ουσιών οφείλεται σε σηματοδότηση GR, δεδομένου ότι σε κύτταρα

COS-7 με χαμηλά επίπεδα GR αίρεται αυτή η δράση. Επιπλέον, τα πειράματα ελέγχου της επίδρασης των ουσιών g-PPD και g-PPT στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK έδειξαν ότι οι g-PPD και g-PPT δεν μεταβάλλουν τα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, ενός γονιδίου στόχου του GR που παίρνει μέρος στη γλυκονεογένεση.

Επομένως, όλα αυτά καθιστούν τις g-PPD και g-PPT σημαντικούς υποψήφιους εκλεκτικούς ενεργοποιητές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και πιθανώς αντιφλεγμονώδη φάρμακα με μειωμένες παρενέργειες, τουλάχιστον όσο αφορά την επαγωγή σύνθεσης γλυκόζης και κατά συνέπεια αύξηση των επιπέδων της στο αίμα. Παρόλο του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος των ενώσεων αυτών, απαιτείται περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού δράσης τους και της διερεύνησης των μειωμένων ή μη άλλων παρενεργειών τους σε σχέση με αυτών της κορτιζόλης, γεγονός το οποίο αποτελεί αντικείμενο συνεχιζόμενων μελετών του εργαστηρίου.

Βιβλιογραφία

1. Alten R., Wiebe E. 2015. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Different Glucocorticoid Approaches. *Neuroimmunomodulation* 22:83–88.
2. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, Fava GA, Findling JW, Gaillard RC, Grossman AB, Kola B, Lacroix A, Mancini T, Mantero F, Newell-Price J, Nieman LK, Sonino N, Vance ML, Giustina A, Boscaro M 2003. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 88(12):5593-5602
3. ATCC
4. Attele, AS; Wu, JA; Yuan, CS (1 December 1999). "Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions.". *Biochemical Pharmacology* **58** (11): 1685–93.doi:10.1016/s0006-2952(99)00212-9. PMID 10571242.
5. Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C.(2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEBJ*. 26(12):4805-20.
6. Buttgerit F 2011. Do the treatment with glucocorticoids and/or the disease itself drive the impairment in glucose metabolism in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 70: 1881-3.
7. Buttgerit F, Burmester GR, Straub RH, Seibel MJ, Zhou H. 2011. Exogenous and endogenous glucocorticoids in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 63: 1-9.
8. Buttgerit F, da Silva JA, Boers M, Burmester GR, Cutolo M, Jacobs J, Kirwan J, Köhler L, Van Riel P, Vischer T, Bijlsma JW 2002. Standardised nomenclature for glucocorticoid dosages and glucocorticoid treatment regimens: current questions and tentative answers in rheumatology. *Ann Rheum Dis*. 61(8):718-22.
9. Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, Stephan Witte, Stanislaw Sierakowski, Erika Gromnica-Ihle, Slawomir Jeka, Klaus Krueger, Jacek Szechinski, and Rieke Alten 2010. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(7):1275–1280.
10. Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, Jeka S, Krueger K, Szechinski J, Alten R 2010. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(7):1275-80.
11. Buttgerit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, Gromnica-Ihle E, Jeka S, Krueger K, Szechinski J, Alten R. 2010. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(7):1275-80.
12. Buttgerit F, Mehta D, Kirwan J, Jacek Szechinski, Maarten Boers, Rieke E Alten, Supronik J, Szombati I, Romer U, Witte S, Saag KG 2012. Low-dose prednisone chronotherapy for rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial (CAPRA-2). *Ann Rheum Dis* doi:10.1136/annrheumdis-2011-201067
13. Buttgerit F, Smolen JS, Coogan AN, Cajochen C 2015. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 11(6):349-56.

14. Buttgereit F, Spies CM, Bijlsma JW 2015. Novel glucocorticoids: where are we now and where do we want to go? *Clin Exp Rheumatol* 33(4 Suppl 92) S29-33. Epub 2015 Oct 12. Review.
15. Callaway Ewen (2013). HeLa publication brews bioethical storm: Genome of controversial cell line no longer public, but another sequence is in the works. *Nature* 12689.
16. Callaway Ewen (2013b). Most popular human cell in science gets sequenced: The HeLa cell genome is riddled with errors, raising questions about its continued use. *Nature* 12609.
17. Capes-Davis A, [Theodosopoulos G](#), [Atkin I](#), [Drexler HG](#), [Kohara A](#), [MacLeod RA](#), [Masters JR](#), [Nakamura Y](#), [Reid YA](#), [Reddel RR](#), [Freshney RI](#). (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 127(1):1-8.
18. Carson SD, Pirruccello SJ. (2013). HeLa cell heterogeneity and coxsackie virus B3 cytopathic effect: implications for inter-laboratory reproducibility of results. *J Med Virol*. 85(4):677-83.
19. Chenran Zhang, **Qiang Qiang**, **Ying Jiang**, **Liuhua Hu**, **Xuehua Ding**, **Yicheng Lu**, **Guohan Hu** (2015). Effects of hypoxia inducible factor-1 α on apoptotic inhibition and glucocorticoid receptor downregulation by dexamethasone in AtT-20 cells. *BMC Endocrine Disorders*. 15:24
20. Cidlowski JA., Kadmiel M. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 34(9):518-30.
21. CohenGM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 326 (Pt 1):1-16.
22. [Cole MA](#), [Kim PJ](#), [Kalman BA](#), [Spencer RL](#). (2000) Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. . *Elsevier Science Ltd*. 25(2):151-67.
23. Collingwood TN, Umov FD, Wolffe AP. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 23(3):255-75.
24. Cutolo M 2016. Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis. *RMD Open* 2:e000203. doi:10.1136/rmdopen-2015-000203
25. Cutolo M, Serio B, Cravio C, Pizzorni C, and Sulli A 2003. Circadian rhythms in RA. *Ann Rheum Dis* 62(7):593–596.
26. De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(25):13504-9.
27. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1(2):66-74
28. Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, Markova L, Urban M, Sarek J 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* 23(3), 394–411.
29. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35(4):495-516.
30. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391(6662):43-50.
31. Feek CM, Marante DJ, Edwards CR. (1983). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin Endocrinol Metab*. 12(3):597-618.
32. Fingert JH, Alward WL, Wang K, Yorio T, Clark AF 2010. Assessment of SNPs associated with the human glucocorticoid receptor in primary open-angle glaucoma and steroid responders. *Mol Vis* 16: 596-601.

33. Fuzzati, N (5 December 2004). "Analysis methods of ginsenosides". *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **812** (1-2): 119–33. doi:10.1016/j.jchromb.2004.07.039. PMID 15556492.
34. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 13(9):1423-33.
35. Gluzman Y (January 1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants". *Cell* **23** (1): 175–82. doi:10.1016/0092-8674(81)902828. PMID 6260373.
36. Gross KL, Oakley RH, Scoltock AB, Jewell CM, Cidlowski JA 2011. Glucocorticoid receptor alpha isoform-selective regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: A new mechanism for glucocorticoid resistance. *Mol. Endocrinol.* 25(7):1087-1099.
37. Gruver-Yates AL, Cidlowski JA 2013. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells* 2(2):202-23.
38. Hall RK, Wang XL, George L, Koch SR, Granter DK. (2007). Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol Endocrinol.* 21(2):550-63.
39. Haridas V, Xu ZX, Kitchen D, Jiang A, Michels P, Gutterman JU. (2011). The Anticancer Plant Triterpenoid, Avicin D, Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling: Implications for Cellular Metabolism. *PLoS ONE* 6(11):e28037.
40. Herr, I., Gassler, N., Friess, H., Buchler, M.W 2007. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12(2):271-291.
41. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81(4):495-504.
42. Hwang SL, Kwon O, Lee SJ, Roh SS, Kim YD, Choi JH. (2012). B-cell translocation gene-2 increases hepatic gluconeogenesis via induction of CREB. *Biochem Biophys Res Commun.* 427(4):801-5.
43. Igney FH, Krammer PH.(2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2(4):277-88.
44. Jacques E, Semlali A, Boulet LP, Chakir J. (2010). AP-1 overexpression impairs corticosteroid inhibition of collagen production by fibroblasts isolated from asthmatic subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299(2):L281-7.
45. Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H (July 1964). "Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**: 53–9. doi:10.1073/pnas.52.1.53. PMC 300571. PMID 14192657.
46. Jiang CL, Liu L, Tasker JG. (2014). Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol.* 35(1):72-5.
47. John M, Clark JR & Robert L. Switzer. (1991). Ηλεκτροφόρηση σελ. 45, στο Πειραματική Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
48. Kadmiel M and Cidlowski JA 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 34(9):518–530.
49. Kino T, Iulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol.* 169(6):885-96.
50. Laszczyk M.N. 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *PlantaMed* 75(15):1549–1560.

51. Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch.*464(6):549-59.
52. Leung DY, Bloom JW.(2003). Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.*111(1):3-22.
53. Leung, KW; Wong, AS (11 June 2010). "Pharmacology of ginsenosides: a literature review.". *Chinese medicine* 5: 20. doi:10.1186/1749-8546-5-20. PMID 20537195
54. Longui CA 2007. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J Pediatr (Rio J)*. 83(5 Suppl):S163-171.
55. Longui CA, Santos MC, Formiga CB, Oliveira DV, Rocha MN, Faria CD, Faria CD, Kochi C, Monte O 2005. Antiproliferative and apoptotic potencies of glucocorticoids: nonconcordance with their anti-inflammatory and immunosuppressive properties. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 49(3):378-83.
56. Lü, J.-M.; Yao, Q.; Chen, C. (2009). "Ginseng Compounds: An Update on Their Molecular Mechanisms and Medical Applications". *Current Vascular Pharmacology* 7 (3): 293–302. doi:10.2174/157016109788340767. PMC 2928028. PMID 19601854.
57. Lu, N.Z.; Collins, J.B.; Grissom, S.F.; Cidlowski, J.A 2007. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell Biol* 27(20):7143-7160.
58. Malinowska M, Sikora E, Ogonowski J. (2013). Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. *Acta Biochim Pol.*60(4):731-5.
59. Mann, CL, Cidlowski JA 2001. Glucocorticoids regulate plasma membrane potential during rat thymocyte apoptosis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 142(1):421-429.
60. Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann-Leitner E, Molnár P, Deli J, Didizapetris R, Ferreira MJ.. (2006). Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des.*12(3):287-311.
61. Morimoto RI (2002). Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* 110(3):281-4.
62. Necela BM, Cidlowski JA 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc Am Thorac Soc* 1(3): 239-46.
63. Ni Chonghaile T, Concannon, CG, Szegezdi, E, Gorman, AM, Samali A 2006. Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. *Apoptosis* 11(7):1247-1255.
64. Nishimura KI, Nonomura N, Satoh E, Harada Y, Nakayama M, Tokizane T, Fukui T, Ono Y, Inoue H, Shin M, Tsujimoto Y, Takayama H, Aozasa K, Okuyama A. (2001).Potential Mechanism for the Effects of Dexamethasone on Growth of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 93(22):1739-46.
65. Oakley RH, Cidlowski JA 2013. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. *J Allergy Clin Immunol.* 132(5): 1033–1044.
66. Olswang Y, Blum B, Cassuto H, Cohen H, Biberman Y, Hanson RW, Reshef L 2003. Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GIP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem* 278(15):12929-12936.
67. Ortsäter Henrik, Sjöholm Åke and Rafacho Alex. (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. *InTeck* .
68. Prigent H, Maxime V, Annane D (2004). Clinical review: Corticotherapy in sepsis. *Critical Care* 8(2):122-129.

69. Psarra AM, Sekeris CE. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783(1):1-11.
70. Qi, LW; Wang, CZ; Yuan, CS (June 2011). "Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity.". *Phytochemistry* 72 (8): 689–99.[doi:10.1016/j.phytochem.2011.02.012](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.012). [PMC 3103855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396670/). [PMID 21396670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396670/)
71. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 4(3):138-44.
72. Refojo D, Liberman AC, Holsboer F, Arzt E. 2001. Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol*. 79(4):385-94.
73. Runnebaum, IB, Bruning A 2005. Glucocorticoids inhibit cell death in ovarian cancer and up-regulate caspase inhibitor cIAP2. *Clin. Cancer Res*. 11(17):6325-6332.
74. Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci*. 65(19):2979-99.
75. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
76. Schlossmacher G, Stevens A 2011. White, A. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: Mechanisms of resistance in cancer cells. *J. Endocrinol*. 211(1):17-25.
77. Scott DK, Mitchell JA, and Granner, DK 1996. The orphan receptor COUP-TF binds to a third glucocorticoid accessory factor element within the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J. Biol. Chem*. 271(50):31909-14.
78. Scott DK, Stromstedt PE, Wang, JC, and 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.
79. Sengupta S, Wasyluk B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev*. 15(18):2367-80.
80. Shah SA, Tan HL, Sultan S, Faridz MA, Shah MA, Nurfazilah S, Hussain M (2014). Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. *Int J Mol Sci*. 15(7):12027-60.
81. Shibata, S.; Tanaka, O.; Sado, M.; Tsushima, S. (1963). "The genuine sapogenin of ginseng". *Tetrahedron Letters* 4 (12): 795–800.[doi:10.1016/S0040-4039\(01\)90718-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90718-X).
82. Smith, LK, Cidrowski JA 2010. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog. Brain Res* 182, 1-30.
83. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*. 192(4):571-80.
84. Tanaka, O.; Nagai, M.; Shibata, S. (1964). "Stereochemistry of protopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng". *Tetrahedron Letters* 5(33–34):22917. [doi:10.1016/S0040-4039\(00\)71705-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)71705-9)
85. ThermoFisher Scientific Inc. (2013). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=717EAB22-C50E-319F-D227-C1EB41C4343C>
86. Uen YH, Ko PH, Yin PH, Liu TY, Chi CW, Lui WY 2008. Glucocorticoid protects hepatoma cells against metabolic stress-induced cell death. *Int. J. Oncol*. 33(6):1263-1270.

87. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C 2013. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154(3):993-1007.
88. Vegiopoulos A, Herzig S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1-2):43-61.
89. Wang JC, Stafford JM, Scott DK, Sutherland C, Granner DK 2000. The Molecular Physiology of Hepatic Nuclear Factor 3 in the Regulation of Gluconeogenesis. *J Biol Chem* 275(19):14717-21.
90. Wang JC, Stromstedt PE, Sugiyama T, and Granner DK 1999. The phosphoenolpyruvate carboxykinase gene glucocorticoid response unit: identification of the functional domains of accessory factors HNF3 beta (hepatic nuclear factor-3 beta) and HNF4 and the necessity of proper alignment of their cognate binding sites. *Mol. Endocrinol.* 13(4):604-18.
91. Wang M 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2:2(1):3.
92. Wu JC, Kelsoe JR, Schachat C, Bunney BG, DeModena A, Golshan S, Gillin JC, Potkin SG, Bunney WE 2009. Rapid and sustained antidepressant response with sleep deprivation and chronotherapy in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 66(3):298-301.
93. Wu W, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T, Conzen SD 2004. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 64(5):1757-1764.
94. Yamada, K, Duong, D T, Scott, DK, Wang, JC, and Granner, DK 1999. CCAAT/enhancer-binding protein beta is an accessory factor for the glucocorticoid response from the cAMP response element in the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 274(9):5880-7.
95. Yan XJ, Gong LH, Zheng FY, Cheng KJ, Chen ZS, Shi Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discov Today.* 19(4):482-8.
96. Yuanzheng He, Wei Yi, Kelly Suino-Powell, X Edward Zhou, W David Tolbert, Xiaobo Tang, Jing Yang, Huaiyu Yang, Jingjing Shi, Li Hou, Hualiang Jiang, Karsten Melcher, H Eric Xu 2014. Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. *Cell Research* 24:713-726.
97. Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, Liu Z, Rittgen W, Edler L, Büchler P, Debatin KM, Büchler MW, Friess H, Herr I 2006. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int. J. Oncol* 29(5):1295-1301.
98. Zhang C, Kolb A, Büchler P, Cato AC, Mattern J, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Büchler MW, Friess H, Herr I 2006. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 15:6, 61.
99. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME & Hogenesch JB 2014. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111(45):16219-24.
100. Zhang X, Wang N, Schachat AP, Bao S and Gillies MC 2014. Glucocorticoids: Structure, Signaling and Molecular Mechanisms in the Treatment of Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Current Molecular Medicine* 14, 376-384.
101. Zheng Y, Izumi K, Li Y, Ishiguro H, Miyamoto H 2012. Contrary regulation of bladder cancer cell proliferation and invasion by dexamethasone-mediated glucocorticoid receptor signals. *Mol. Cancer Ther* 11(12):2621-2632.

102. Αναπλιώτου Μ, Χατζησιμάλης Π 2014. *Κεφ. 11. Επιπτώσεις (οστεοπόρωση, μεταβολικό σύνδρομο, νοητική και ψυχική λειτουργία)*. Στο: Εντατική εκπαίδευση στην ενδοκρινολογία: 13ος κύκλος - γονάδες. Τμήμα Ενδοκρινολογίας, Διαβήτη και Μεταβολισμού, Ν.Ε.Ε.Σ , Αθήνα. Σελ. 191-202. Διαθέσιμο από: <http://e-endocrinology.gr/wp-content/uploads/2014/10/10-11.pdf>
103. Σμοκοβίτης Αθανάσιος (2007). *Φυσιολογία*. Θεσσαλονίκη: Αδερφών Κυριακίδη α.ε.