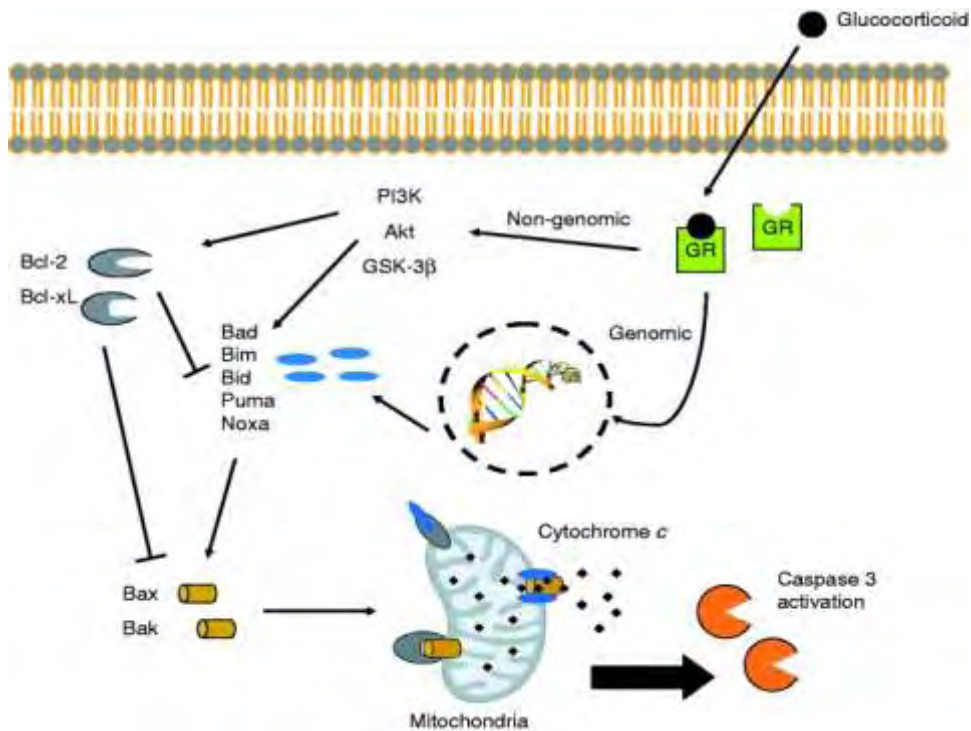




Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας- Μοριακή Γενετική, Διαγνωστικοί Δείκτες

Διερεύνηση των αποπτωτικών μηχανισμών δράσεων των τριτερπενοειδών πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη σε καρκινικά κύτταρα HeLa και HepG2



Κωνσταντίνου Μαρία
ΛΑΡΙΣΑ 2016

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Άννα-Μαρία Ψαρρά

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: *Διερεύνηση των αποπτωτικών μηχανισμών δράσεων των τριτερπενοειδών πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη σε καρκινικά κύτταρα HeLa και HepG2*

Thesis Topic: *Investigation of apoptotic mechanisms of protopanaxadiol and protopanaxatriol in HeLa and HepG2 cells.*

Τριμελής Επιτροπή

Άννα-Μαρία Ψαρρά (Επιβλέπουσα καθηγήτρια) Επίκουρος
Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Θεσσαλίας

Βασιλική Σκαμνάκη Λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού του
τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.

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

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Άννα – Μαρία Ψαρρά, καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα για όλη την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην φίλη μου και συνάδελφό μου Καρρά Αικατερίνη, που μαζί καταφέραμε να φέρουμε εις πέρας τα πειράματα που μας ανατέθηκαν. Η παρουσία της συνέβαλε στην σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων και υπέδειξε πόσο σημαντική είναι η ομαδική δουλειά.

Ευχαριστώ πολύ όλους τους συνάδελφούς μου στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και τον Κωνσταντίνο Γκαραγκούνη που μας παρείχε τις σημαντικές τριτερπενοειδείς ουσίες από το εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας Φυτών.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Στεροειδείς ορμόνες - Κορτικοστεροειδή	9
1.2 Γλυκοκορτικοειδή.....	11
1.2.1 Δομή γλυκοκορτικοειδών	12
1.2.2 Βιολογικός ρόλος γλυκοκορτικοειδών	13
1.2.3 Θεραπευτική προσέγγιση	16
1.2.4 Παρενέργειες.....	16
1.2.5 Καινούργιες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις – SEGRAs (Selective GR agonists)	18
1.2.6 Γλυκοκορτικοειδή και απόπτωση.....	19
1.3 Πυρηνικοί Υποδοχείς – Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR).....	28
1.3.1 Δομή GR	29
1.3.2 Βιολογική δράση του GR.....	31
1.3.3 Διάφορες ισομορφές του GR και η αποπτωτική τους δράση	40
1.4 Τριτερπενοειδείς ενώσεις.....	41
1.4.1 Γενικές πληροφορίες	41
1.4.2 Βιολογική δράση τριτερπενείων	42
1.4.3 Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη	43
2. Σκοπός	44
3. Υλικά & Μέθοδοι.....	46
3.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa & HepG2	46
3.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών	48
3.2.1 Απόψυξη κυττάρων	49
3.2.2 Θρυψινοποίηση των κυττάρων.....	50
3.2.3 Πάγωμα των κυττάρων	51
3.2.4 Μέτρηση & Στρώσιμο κυττάρων	51
3.3 Ανοσοϊστοχημεία.....	52
1.2 Western- Blot Analysis	56
1.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	56
2.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)	60
2.4.3 Ανοσοαποτύπωση Western	63

2.4.4 Western Blot για Caspase 3, Caspase 9 &β-actin	67
4. Αποτελέσματα	69
4.1 Οι ουσίες Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα	69
4.2 Οι ουσίες g-PPD και g-PPT, όπως και η DEX προκαλούν την.....	71
4.2.1 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2).....	71
4.2.2 BAX, pro-Casp9, pro-Casp3.....	71
4.3. Επαγωγή μιτοχονδριακά εξαρτώμενης απόπτωσης σε κύτταρα HepG2 υπό την επίδραση των ουσιών g-PPD και g-PPT.....	73
5.Συζήτηση	75
Συντμήσεις	78
Βιβλιογραφία	80

Περίληψη

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 δράσεις, και γι' αυτό χρησιμοποιούνται συστηματικά για τον έλεγχο χρόνιων φλεγμονωδών νόσων ή χορηγούνται τοπικά σε ασθενείς που πάσχουν από αλλεργίες. Επίσης, χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά φάρμακα σε διάφορους τύπους καρκίνων. Όμως, 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. Η πρωτοπαναξαδιόλη (g-PPD) και η πρωτοπαναξατριόλη (g-PPT) είναι τριτερπενοειδείς ενώσεις που έχουν δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή και εμφανίζουν αντι-φλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε αν οι δύο αυτές τριτερπενοειδείς ενώσεις ασκούν τις δράσεις τους, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης των GCs. Δείξαμε ότι η g-PPD και η g-PPT ασκούν δράσεις ανάλογες με αυτές των GCs μέσω της ρύθμισης της πυρηνικής μετατόπισης του GR, και της μη ή αρνητικής επίδρασης τους στη ρύθμιση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων στόχων του GR, που εμπλέκονται στην επαγόμενη από GCs απόπτωση, σε HeLa ή/και HepG2, GR-θετικά καρκινικά κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η g-PPD και η g-PPT μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και να αξιοποιηθούν, μετά από περαιτέρω μελέτες, ως εν δυνάμει θεραπευτική χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα.

Abstract

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones, which regulate cell growth, metabolism, immune response and apoptosis, through their cognate receptor, the glucocorticoid receptor (GR), by genomic or non-genomic mechanisms of action. Due to GCs anti-inflammatory activities, GCs are used systemically to control chronic inflammatory diseases or they are administered locally to patients suffering from allergies. On the other hand, the chronic use of GCs gives rise to adverse side effects such as diabetes, osteoporosis, muscle wasting, fat redistribution, mood disorders and suppression of the HPA axis.

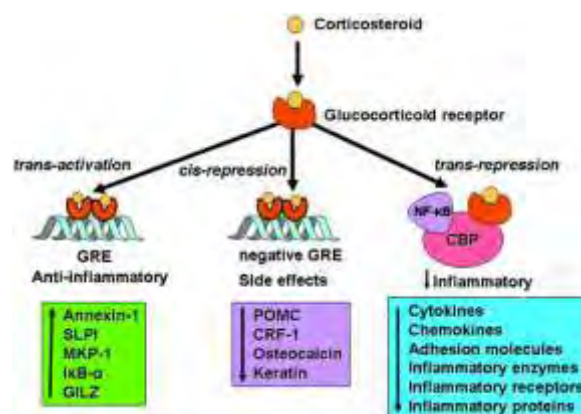
Thus, there is a high need for selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRA) as effective as classic GCs, but with reduced side effects. Protopanaxadiol (g-PPD) and Protopanaxatriol (g-PPT) are triterpenoids that show structural similarities with GCs and exhibit anti-inflammatory and anti-cancer activities. In this study, we examined whether g-PPD and g-PPT exert their actions, at least in part, through the regulation of GR signaling. We showed that g-PPD and g-PPT exert potent GCs actions through the regulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation and no effect or down-regulation of certain glucocorticoid receptor target genes expression, involved in the GCs-induced apoptosis, in HeLa and/or in HepG2 GR-positive cells.. Our results indicate that g-PPD and g-PPT are potent selective glucocorticoid receptor agonists and could be further analyzed for their potential for therapeutic use in many cancers.

1. Εισαγωγή

1.1 Στεροειδείς ορμόνες - Κορτικοστεροειδή

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλες ορμόνες που παράγονται από την φλοιώδη μούρα των επινεφριδίων. Παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, την αύξηση, την ανάπτυξη και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Psarra and Sekeris, 2007). Όλες οι στεροειδείς ορμόνες έχουν παρόμοια δομή και οι διαφορές τους έγκεινται στην δομή του δακτυλίου και στις πλευρικές αλυσίδες που συνδέονται σε αυτόν.

Διακρίνονται σε δύο τύπους : τα κορτικοστεροειδή και τα σεξοτρόπα στεροειδή. Τα κορτικοστεροειδή συντίθενται από την χοληστερόλη μέσα στον φλοιό των επινεφριδίων. Τα κορτικοστεροειδή είναι ανάμεσα στα πιο διαδεδομένα φάρμακα στον κόσμο και είναι αποτελεσματικά σε ασθένειες που προκαλούν φλεγμονώδεις αντιδράσεις, καθώς και προβλήματα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η αποτελεσματικότητα των κορτικοειδών ως φάρμακα για την καταπολέμηση χρόνιων φλεγμονωδών αντιδράσεων έγκειται στο γεγονός ότι έχουν την δυνατότητα να αποσιωπούν γονίδια που συνδέονται με την έναρξη της φλεγμονής σε ένα οργανισμό (κυτοκίνες, χημειοκίνες, κ.α) Η πιο κοινή χρήση των κορτικοστεροειδών είναι στην θεραπεία του άσθματος. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι η θεραπεία με κορτικοστεροειδή συνδέεται με την οστεοπόρωση, την καθυστέρηση ανάπτυξης σε παιδιά καθώς και την μεταβολικές αλλαγές (Peter J Barnes, 2005).



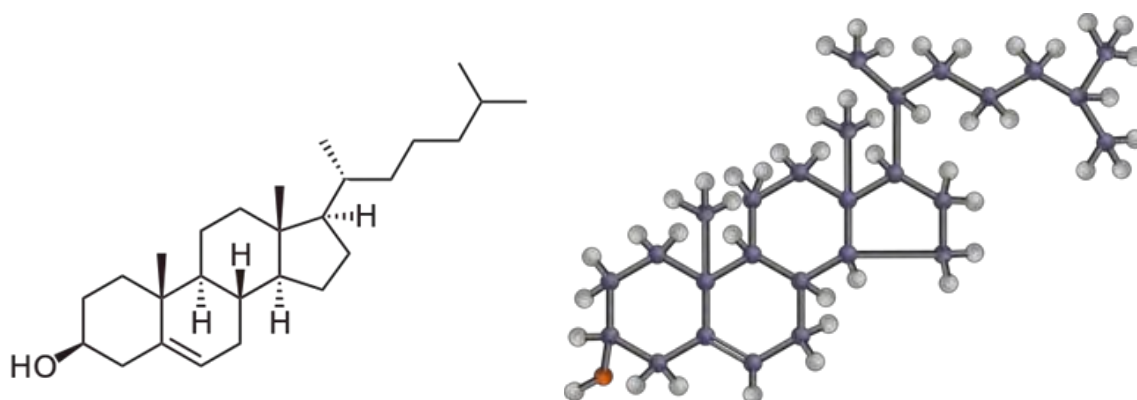
Εικόνα 1. Τα κορτικοστεροειδή ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω ποικίλων μονοπατιών. Εισέρχονται στο κύτταρο και συνδέονται με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Τα ομοδιμερή GR συνδέονται στο πλαίσιο GRE στην περιοχή του υποκινητή (promoter) και έτσι επάγουν την μεταγραφή αντιφλεγμονωδών πρωτεϊνών.

Η δράση των στεροειδών ορμονών γίνεται με την βοήθεια ενδοκυτταρικών υποδοχέων. Οι στεροειδείς ουσίες εισέρχονται στο κύτταρο και συνδέονται με ενδοκυτταρικό υποδοχέα. Το σύμπλεγμα στεροειδούς ορμόνης – υποδοχέα εισέρχεται στον πυρήνα, προκαλεί διέγερση του DNA προς μεταγραφή σε mRNA, το οποίο με την σειρά του εξερχόμενο από τον πυρήνα οδηγεί σε πρωτεϊνοσύνθεση στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο. Η έλλειψη τους ή η μη φυσιολογική δραστηριότητά τους οδηγεί σε παρενέργειες.

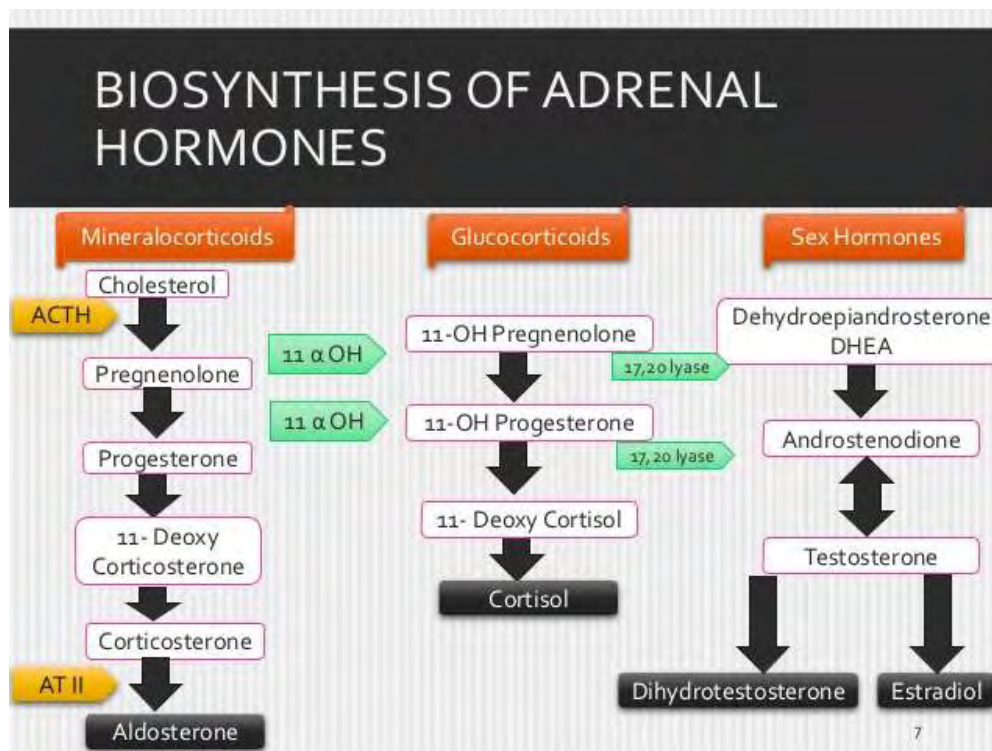
Τα γλυκοκορτικοειδή, τα οποία αποτελούν το κύριο θέμα της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, μαζί με τα αλατοκορτικοειδή ανήκουν στην ομάδα των κορτικοστεροειδών (Σμοκοβίτης, 2007).

Τα κύτταρα του φλοιού των επινεφριδίων χρησιμοποιούν ως πρόδρομο μόριο την χοληστερόλη για την παραγωγή των εξής στεροειδών ορμονών:

- Γλυκοκορτικοειδή. Επηρεάζουν την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα καθώς και άλλων μορίων που συμμετέχουν στον μεταβολισμό. Κυριότερος εκπρόσωπος είναι η κορτιζόλη.
- Αλατοκορτικοειδή. Επηρεάζουν την εξωκυττάρια ιοντική ισορροπία. Κυριότερος εκπρόσωπος είναι η αλδοστερόνη.
- Σεξοτρόπα στεροειδή. Διεγείρουν την ανάπτυξη των γεννητικών οργάνων (sexual development) και την ικανότητα αναπαραγωγής. Εκκρίνονται σε μικρές ποσότητες από τον φλοιό των επινεφριδίων. Κυριότεροι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα (Ortsäter H, 2012).



Εικόνα 2. Η δομή της χοληστερόλης



Εικόνα 3. Μονοπάτια παραγωγής στεροειδών ορμονών. Πρόδρομο μόριο είναι η χοληστερόλη. Η εικόνα πάρθηκε από την παρουσίαση Corticosteroids του Dr Mayur Chaudhari, Assistant Professor, Department of Pharmacology, Government Medical College, Surat.

1.2 Γλυκοκορτικοειδή

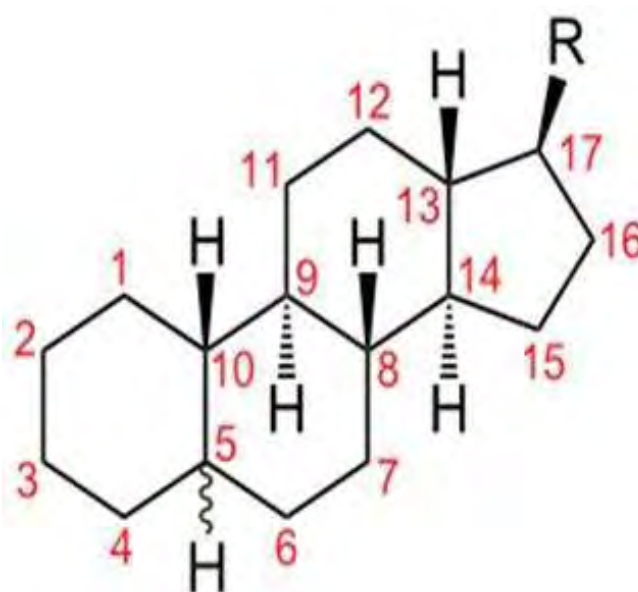
Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR).

Η σύνθεση και η έκκριση της πεπτιδικής ορμόνης κορτιζόλης, της κύριας γλυκοκορτικοειδούς ορμόνης στον άνθρωπο, ρυθμίζεται από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και τις αντίστοιχες ορμόνες αυτών [C. M. Feek et al. 1983]. Υπό τον έλεγχο της απελευθερωτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης, της CRH (που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο κατά τη διάρκεια στρες) εκκρίνεται (στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης) η ορμόνη κορτικοτροπίνη (ACTH) με έναν παλμικό και κιρκάδιο τρόπο, με την ACTH να ελέγχει με τη σειρά της την έκκριση της κορτιζόλης η οποία με μηχανισμό ανάδρομης ρύθμισης ελέγχει την έκκριση των προαναφερθέντων ορμονών. Πιο συγκεκριμένα, η ACTH προέρχεται από το πρόδρομο πεπτίδιο οπιομελανοκιρτίνη (POMC) με πρωτεόλυση [Reichardt and Schütz, 1998; Balsalobre et al., 2000; McKay and Cidlowski, 2003]. Η έκκρισή της ACTH υπόκειται σε έναν

αυτόματο κιρκάδιο ρυθμό (Day-Night Rhythm), με τις μέγιστες τιμές το πρωί (περίπου 6 π.μ) και τις ελάχιστες το βράδυ. Όπως προαναφέρθηκε, η σύνθεση και απελευθέρωσή της ελέγχεται και ρυθμίζεται από τον CRH του υποθαλάμου, καθώς και από τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών (κυρίως της κορτιζόλης) στο αίμα με μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης [Vegiopoulos & Herzig, 2007]. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των φυσικών γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς καθορίζεται από τα επίπεδα της προσδεμένης με κορτικοστεροειδή σφαιρίνης στον ορό καθώς επίσης και από τα επίπεδα των τοπικά εκφρασμένων ενζύμων της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης (11βHSD).

1.2.1 Δομή γλυκοκορτικοειδών

Βασική δομή στην σύνθεση όλων των στεροειδών είναι το μόριο του κυκλοπενταφαινανθρενίου, με 3 εξαμελείς (A, B, C δακτύλιους), 1 πενταμελή D δακτύλιο, με συνολικό αριθμό 17 ατόμων άνθρακα (1-17). Από το βασικό πυρήνα του κυκλοπενταφαινανθρενίου προκύπτουν διαφορετικές ουσίες, για παράδειγμα με προσθήκη 2 ατόμων C στον άνθρακα 17, δηλαδή C₂₀, C₂₁ προκύπτει το πρεγνάνιο και από αυτό προέρχονται τα C₂₁ στεροειδή, με κύριους αντιπροσώπους τις ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων (κορτιζόλη, και αλδοστερόνη) καθώς και την προγεστερόνη.



Εικόνα 4. Η δομή του κυκλοπενταφαινανθρενίου.

Τα γλυκοκορτικοειδή στο αίμα είναι προσδεμένα σε πρωτεΐνες φορείς τους. Η τρανσκορτίνη (corticosteroid-binding globulin-CBG) είναι η κύρια πρωτεΐνη φορέας τους και λειτουργεί ως μια μικρής χωρητικότητας και υψηλής συγγένειας δεξαμενή, ενώ υπό ορισμένες συνθήκες, η αλβουμίνη στο αίμα μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως φορέας με μεγαλύτερη χωρητικότητα και χαμηλότερη συγγένεια από την CBG. Λόγω της λιπιδικής φύσης τους, τα γλυκοκορτικοειδή εξαρτώνται από την CBG για την μεταφορά τους στον εγκέφαλο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Επιπλέον, η CBG αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή για την πρόσβαση και δράση των ορμονών αυτών στον εγκέφαλο. Τα επίπεδα της CBG στο αίμα είναι σχετικά σταθερά, παρόλο που μπορεί να εμφανιστούν ελάχιστα μειωμένα στις μεγαλύτερες ηλικίες στους ανθρώπους, αλλά παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές ανάμεσα στα φύλα (τα θήλεα έχουν υψηλότερα επίπεδα) [Netherton C, 2004; Purnell JQ 2004].

Η κορτιζόλη είναι το ενδογενές παραγόμενο γλυκοκορτικοειδές, με διακυμαινόμενη ημερήσια παραγωγή (η συγκέντρωσή της στο αίμα ποικίλλει από 110 nmol/l στις 4πμ μέχρι περίπου 450 nmol/l στις 8πμ), τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή περιλαμβάνουν την πρεδνιζόλη, την δεξαμεθαζόνη κ.α.

1.2.2 Βιολογικός ρόλος γλυκοκορτικοειδών

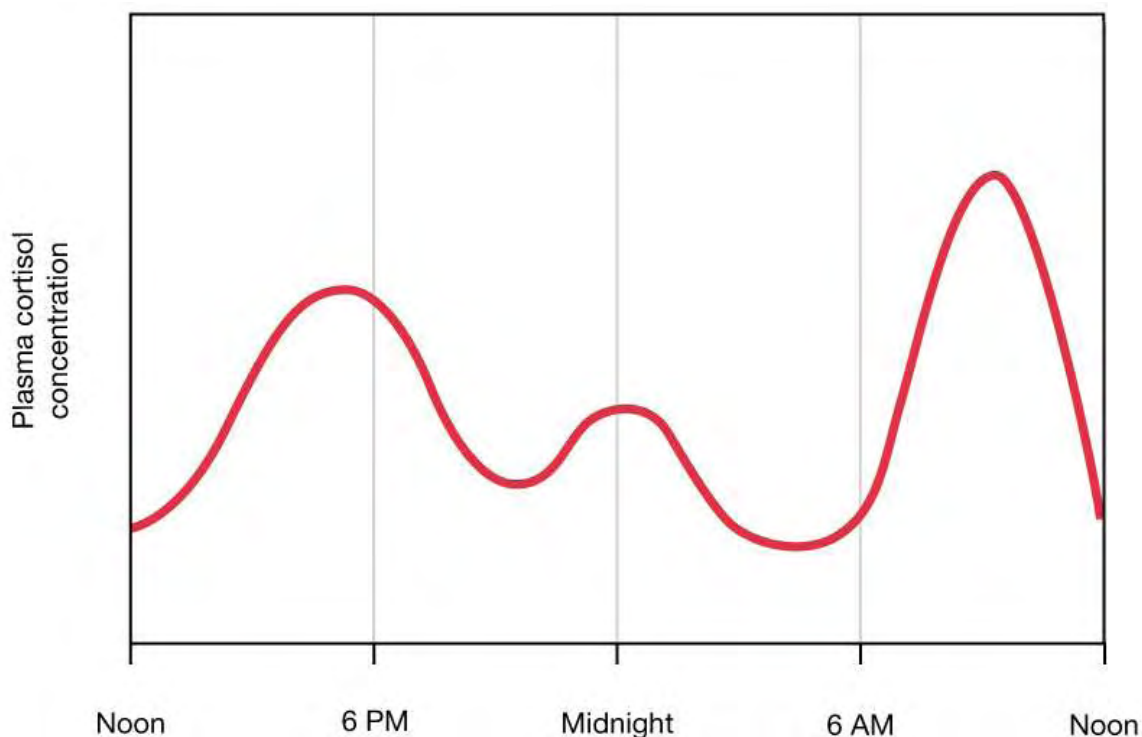
Τα κορτικοειδή και κυρίως τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού των θηλαστικών. Ρυθμίζουν ένα μεγάλο αριθμό μεταβολικών διεργασιών. Η σημαντικότερη δράση των GCs έχει να κάνει με την επίδρασή τους στον μεταβολισμό των υδατανθράκων [Wajchenberg et al., 1984]. Αρχικά, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την γλυκονεογένεση, μέσω της σύνθεσης της γλυκόζης, καθώς και με την παραγωγή γλυκογόνου στο ήπαρ. Επιπλέον, στο ήπαρ ενισχύουν την δράση γλυκαιμικών ορμονών (όπως οι κατεχολαμίνες, το γλυκογόνο και αυξητικές ορμόνες), οι οποίες επάγουν την απελευθέρωση της γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα. Τα GCs συμμετέχουν μαζί με την ινσουλίνη, την γλυκαγόνη και τις κατεχολαμίνες του οργανισμού στην ρύθμιση του μεταβολισμού και του ενεργειακού ισοζυγίου.

Στους σκελετικούς μύες και στον λιπώδη ιστό, η κορτιζόλη αναστέλλει την πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης μέσω παρεμβολής στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Επίσης, η ίδια ορμόνη δημιουργεί καταβολική κατάσταση (επιβράδυνση στον αναβολισμό των πρωτεϊνών και επιτάχυνση του καταβολισμού των πρωτεϊνών, προκαλώντας τελικά αυξημένη

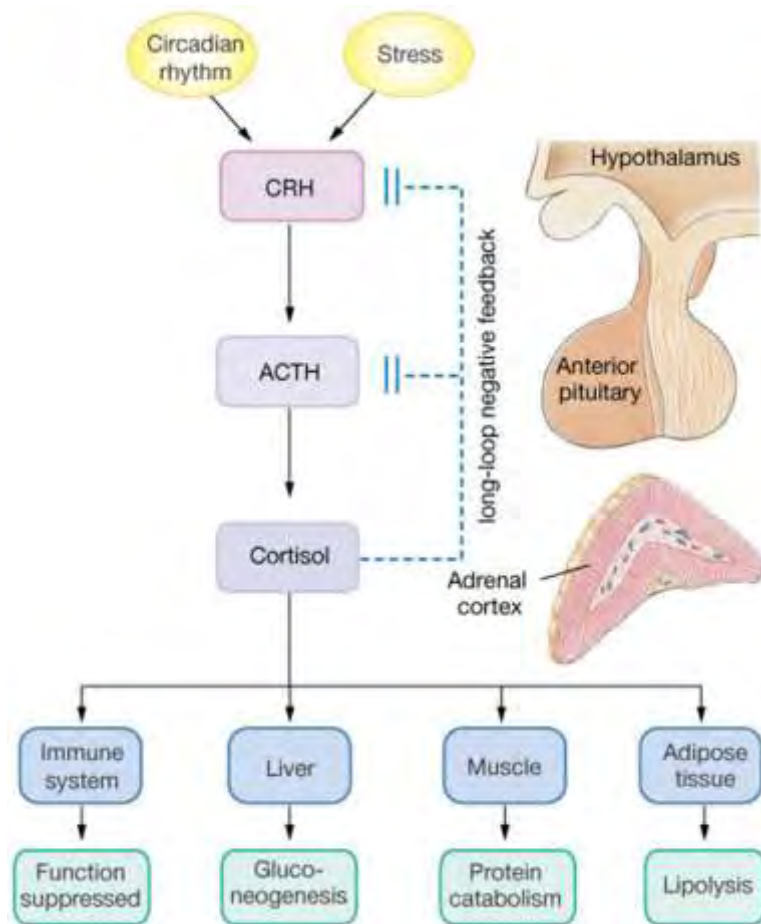
απελευθέρωση αμινοξέων) με αποδόμηση των πρωτεϊνών, η οποία οδηγεί σε μείωση της μυϊκής μάζας και προκαλεί χάλαση των μυών.

Στον λιπώδη ιστό, η λιπολυτική δραστηριότητα αυξάνεται και γίνεται ανακατανομή του λίπους στο σώμα. Ταυτόχρονα η πυροδοτούμενη από την κορτιζόλη διάσπαση των τριγλυκεριδίων, καταλήγει τόσο σε περεταίρω αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όσο και σε ενίσχυση της παροχής ενέργειας και υποστρωμάτων για τη γλυκονεογένεση. Συμπερασματικά ο μεταβολισμός του μυϊκού και του λιπώδους ιστού μετατοπίζεται από την κατανάλωση αμινοξέων και λίπους και άρα συνεισφέρουν στην αύξηση της γλυκόζης στο αίμα. Επιπρόσθετα, η αυξημένη ταχύτητα του μεταβολισμού των πρωτεϊνών οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση αζώτου και επαγωγή των ενζύμων του κύκλου της ουρίας [Ortsäter H, 2012].

Τα GCs, και ιδιαίτερα η κορτιζόλη, είναι σημαντικά για την προστασία του σώματος ενάντια στο στρες, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης και της πίεσης του αίματος [Grünfeld and Eloy, 1987].



Εικόνα 5. Κυρκαδικός ρυθμός έκκρισης κορτιζόλης



Εικόνα 6. Έλεγχος έκκρισης κορτιζόλης και μονοπάτι σηματοδότησης μέσω κορτιζόλης.

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

Όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση των GCs, εκτός από τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στον μεταβολισμό, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν καθοριστικά και τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω παρεμπόδισης εμφάνισης και εξέλιξης της φλεγμονής και, γενικότερα, παρεμπόδιση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος [Stahn C and Buttgereit F., 2008]. Όλες αυτές οι ανοσοκατασταλτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-αλλεργικές επιδράσεις των GCs πάνω σε πρωτογενή και δευτερογενή κύτταρα του ανοσοποιητικού, ιστούς και όργανα, σε συνδυασμό με τη μείωση των δυσάρεστων επιπτώσεων διαφόρων σχημάτων χημειοθεραπειών πάνω σε ασθενείς (χορήγηση ως αντι-εμετικά) [Maranzano E. et al., 2005], κατέστησε τα γλυκοκορτικοειδή ικανά να χρησιμοποιηθούν τόσο για τη συστηματική όσο και για την τοπική θεραπεία. Η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοκορτικοειδών επιτυγχάνεται, ως ένα σημείο, μέσω της αναστολής της δράσης της φωσφολιπάσης A2 (PLA2) που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της

απελευθέρωσης του αραχιδονικού οξέος από την μεμβράνη των φωσφολιπιδίων. Το αραχιδονικό οξύ δρα ως πρόδρομο μόριο για την σύνθεση διαφόρων εικοσανοειδών.

Θα γίνει αναφορά των ασθενειών που καταπολεμούνται με χορήγηση γλυκοκορτικοειδών παρακάτω.

1.2.3 Θεραπευτική προσέγγιση

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν τα πιο κοινά αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα. Χρησιμοποιούνται σε αλλεργικά, φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα καθώς και στην θεραπεία της αναφυλακτικής καταπληξίας.

Επίσης, χρησιμοποιούνται για την πρόληψη απόρριψης οργάνων μετά από μεταμόσχευση καθώς και στην θεραπεία κακοήθων νοσημάτων σε συνδυασμό με κυτταροτοξικά φάρμακα (θεραπεία για καρκινοπαθή άτομα).

Στην δερματολογία, χρησιμοποιούνται για τη καταπολέμηση εκζεμάτων.

Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση φλεγμονών σε συνδετικούς ιστούς, για την ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς και για παθήσεις του εντέρου.

Τα εισπνεόμενα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για την θεραπεία αλλεργικών αντιδράσεων του αναπνευστικού, όπως το άσθμα.

Όταν τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται επί μακρόν εξωγενώς, λόγω του μηχανισμού της αρνητικής παλινδρομικής ρύθμισης, η ενδογενής παραγωγή ελαττώνεται και ο επινεφριδιακός άξονας καταστέλλεται. Τέτοιοι ασθενείς, επομένως, δεν έχουν λειτουργικό άξονα υπόφυσης-φλοιού επινεφριδίων, και η απότομη διακοπή χρήσης εξωγενών γλυκοκορτικοειδών, θα οδηγήσει σε οξεία ανεπάρκεια του επινεφριδιακού φλοιού, λόγω μη έκκρισης ενδογενούς κορτιζόλης. Γι' αυτό η διακοπή χρόνιας χορήγησης γλυκοκορτικοειδών οφείλει να είναι σταδιακή.

Σύμφωνα με μελέτες, στις Ηνωμένες Πολιτείες συνταγογραφούνται ετήσια περίπου στα 10 εκατομμύρια κορτικοστεροειδή από του στόματος χορήγηση. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή που χορηγούνται κατά κόρον είναι η πρεδνισολόνη, η μεθυλπρεδνισολόνη, η δεξαμεθαζόνη και η βηταμεθαζόνη, τα οποία ενεργοποιούν αποτελεσματικά τον GR και έχουν μειωμένη αλατοκορτικοειδή δράση [Schacke et al., 2002].

1.2.4 Παρενέργειες

Η αποτελεσματικότητα των γλυκοκορτικοειδών που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για την θεραπεία ασθενειών συνοδεύεται, πολλές φορές, από σοβαρές και μη αναστρέψιμες παρενέργειες. Οι παρενέργειες εξαρτώνται από την δόση καθώς και από την διάρκεια της θεραπείας με GCs. Ακολουθεί μία λίστα με παρενέργειες από την θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή:

- Διαβήτης και αύξηση γλυκόζης στο αίμα [S. E. P. Miller and J. McE. Neilson, 1964].
- Αϋπνία και διαταραχές κατά την διάρκεια του ύπνου [R Turner and E Elson, 1993].
- Οξεία μυοπάθεια (ατροφία και παράλυση των μυών) [P K Panegyres, 1993].
- Άνιση κατανομή λίπους [Rockall et al., 2003; Asensio et al., 2004]
- Υπερφαγία [Debons et al., 1986].
- Ηπατική στεάτωση (Σύνδρομο Cushing) [Rockall et al., 2003].
- Δυσλιπιδαιμία [Taskinen et al., 1983; Rafacho et al., 2008].
- Αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσανεξία στην γλυκόζη [Stojanovska et al., 1990; Binnert et al., 2004; Rafacho et al., 2008]
- Μεταβολικό σύνδρομο

Πιθανές Επιπτώσεις σε Όργανα και/ή σε Ιστούς
Δέρμα: ατροφία, καθυστερημένη επουλώση πληγών
Σκελετός και μύες: οστεοπόρωση, ατροφία μυών/ μυοπάθεια
Μάτια: γλαύκωμα, καταράκτης
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα: διαταραχή στην διάθεση, στην συμπεριφορά και στην μνήμη
Ενδοκρινικό Σύστημα/Μεταβολισμός: δυσλιπιδαιμία, ανοχή στην ινσουλίνη και/ή δυσανεξία στην γλυκόζη, δυσλειτουργία Β κυττάρων
Καρδιαγγειακό Σύστημα: Υπέρταση
Ανοσοποιητικό Σύστημα: αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης, κίνδυνος από ιούς
Γαστρεντερικό Σύστημα: πεπτικό έλκος, παγκρεατίτιδα

Εικόνα 7. Ορισμένες παρενέργειες που εμφανίζονται σε ασθενείς στους οποίους χορηγείται θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή [Schacke et al., 2002].

Οι χρόνιες θεραπείες που βασίζονται σε μέτρια ή υψηλή δόση GCs προκαλούν διαβήτη σε υγιή άτομα. Σε ευπαθείς ομάδες (όπως άτομα με παχυσαρκία, άτομα με χαμηλή απόκριση σε ινσουλίνη, πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με T2DM, έγκυες, κ.α.) ακόμα και η μικρή

δότη GCs μπορεί να διαταράξει την ομοίωση της γλυκόζης. Οι παρενέργειες των GCs ποικίλλουν ανάλογα την απόκριση του κάθε ιστού στην ορμόνη.

1.2.5 Καινούργιες Θεραπευτικές Προσεγγίσεις – SEGRAs (Selective GR agonists)

Η συνεχής θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή επιφυλάσσει πολλούς κινδύνους για τους ασθενείς. Ωστόσο, οι παρενέργειες μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με συνεχή παρακολούθηση και χρησιμοποιώντας την σωστή θεραπεία. Η προφύλαξη από την εμφάνιση οστεοπόρωσης, για παράδειγμα, μπορεί να προληφθεί δίνοντας στον ασθενή ασβέστιο και βιταμίνη D καθώς και διφωσφονικά στην αρχή της θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή [Siamak Moghadam-Kia and Victoria P. Werth, 2010].

Στον τομέα της έρευνας των γλυκοκορτικοειδών, κύριος στόχος είναι η εύρεση και μελέτη νέων φαρμάκων, τα οποία θα έχουν μειωμένες παρενέργειες ενώ ταυτόχρονα θα έχουν την αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση των κλασικών γλυκοκορτικοειδών. Μία καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση αποτελούν οι εν δυνάμει αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs). Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονίσουμε ότι η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοκορτικοειδών οφείλεται σε ένα μεγάλο βαθμό στην καταστολή (transrepression), ενώ πολλές παρενέργειες οφείλονται στην ενεργοποίηση (transactivation) [H. Schacke et al. 2002; Löwenberg M., 2008].

Το 2003, διεξήχθη έρευνα όπου επιστήμονες μελέτησαν την ουσία ZK 216348, ένα εν δυνάμει αγωνιστή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η συγκεκριμένη ουσία είχε αντιφλεγμονώδη δράση παρόμοια με την δράση της πρεδνισολόνης. Στην συγκεκριμένη μελέτη, βρέθηκε ότι η ουσία κατέστρεψε την αδρενοκορτικοτροπίνη. Η ZK 216348 έχει λιγότερες πιθανότητες για εμφάνιση παρενεργειών, όπως η επαγωγή διαβήτη [Heike Schacke et al., 2003].

Το 2010, μελετήθηκε η ουσία maprocat (BOL-303242-X ή ZK 245186), ακόμα ένας εν δυνάμει αγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, και χρησιμοποιήθηκε στην θεραπεία του συνδρόμου ξηρού οφθαλμού. Στην συγκεκριμένη έρευνα έγινε αξιολόγηση της αντι-φλεγμονώδους δράσης της ουσίας σε συνθήκες οσμωτικού στρες, το οποίο μιμείται τις παθοφυσιολογικές αλλαγές της ασθένειας. Η επώαση των επιθηλιακών κυττάρων με την ουσία maprocat είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυτταροκινών, με την ίδια δράση όπως η δεξαμεθαζόνη. Η maprocat μείωσε την μεταγραφική δράση του NF-κΒ και του AP-1,

τα οποία είναι μόρια που συνδέονται άμεσα με την εμφάνιση φλεγμονής. Ενώ ταυτόχρονα οδήγησε στην απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη-6, η ιντερλευκίνη-8 και η MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). Η ουσία marrocat έχει παρόμοια δράση με την δεξαμεθαζόνη (χρησιμοποιήθηκε ως control) και ταυτόχρονα μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης ατροφίας δέρματος, απόπτωσης θυμοκυττάρων και υπεργλυκαιμίας [Megan E. Cavet et al., 2010].

Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη της πρωτοπαναξαδιόλης (g-PPD) και πρωτοπαναξατριόλης (g-PPT) ως εν δυνάμει εκλεκτικοί αγωνιστές του GR, έτσι ώστε να διερευνηθεί η αποπτωτική τους δράση.

Συμπερασματικά, οι εκλεκτικοί αγωνιστές του GR αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη πιθανή ομάδα φαρμάκων με βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη σε σχέση με τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή. Επιπλέον, τα SEGRAs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

1.2.6 Γλυκοκορτικοειδή και απόπτωση

1.2.6.1 Απόπτωση

Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και λαμβάνει χώρα όταν κύτταρα δεν είναι απαραίτητα για τον οργανισμό ή όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί μετάλλαξη και μπορεί να είναι βλαβερά και επικίνδυνα για τον ίδιο τον οργανισμό. 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. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης το κύτταρο συρρικνώνεται, το ίδιο και η χρωματίνη, η μιτοχονδριακή μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κύτταρο αποικοδομείται και σχηματίζει αποπτωτικά σώματα, τα οποία φαγοκυτταρώνονται, χωρίς φλεγμονή. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης έχουμε πρωτεϊνοσύνθεση. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι καταστροφική και μη αντιστρεπτή.

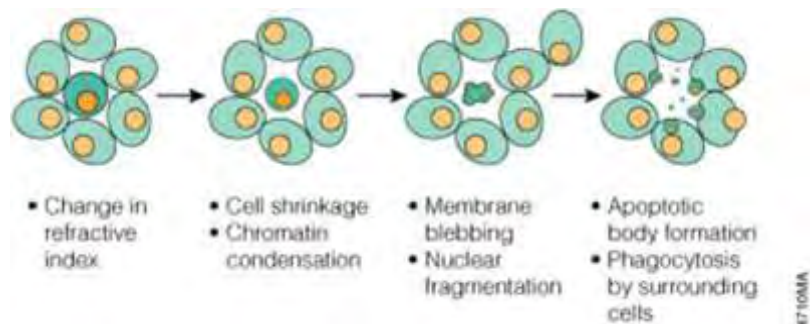
Διακρίνονται τουλάχιστον δύο μονοπάτια απόπτωσης, το εξωγενές και το ενδογενές. Η σηματοδότηση, και στα δύο μονοπάτια, έχει ως αποτέλεσμα στην ενεργοποίηση της οικογένειας των πρωτεασών κυστεΐνης (Cys), οι οποίες ονομάζονται κασπάσες, και δρουν μέσω ενός καταρράκτη πρωτεόλυσης για να απομακρύνουν τα αποπτωτικά κύτταρα. Η

ενεργοποίηση των κασπασών αποτελεί το σημείο ελέγχου της απόπτωσης [Czerski L and Nunez G., 2004].

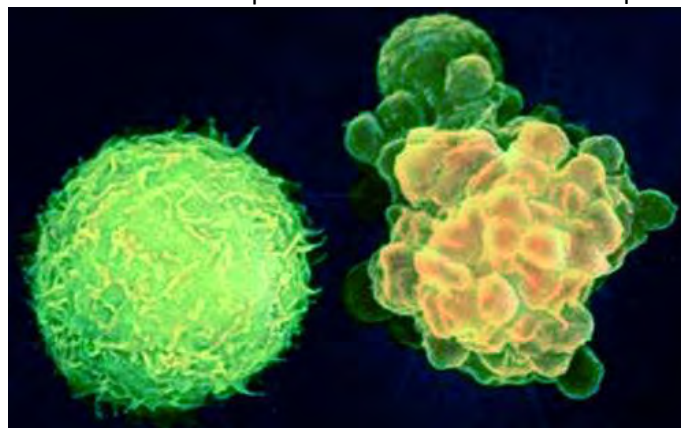
Το εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη εξωκυττάρων σημάτων (όπως FasL, TRAIL), τα οποία ενεργοποιούν υποδοχείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF (tumor necrosis factor), σχηματίζοντας έτσι το DISC (death inducing signaling complex), το οποίο με την σειρά του ενεργοποιεί την κασπάση 8 για να αρχίσει την διαδικασία της απόπτωσης μέσω μηχανισμών που είτε εξαρτώνται από τα μιτοχόνδρια είτε όχι [Herr I., 2007]. Το ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης αποτελεί απάντηση σε ερεθίσματα/σήματα μέσα στο κύτταρο, όπως τα γλυκοκορτικοειδή, έκθεση σε UV και απουσία τροφής-θρεπτικών (starvation).

Η απόπτωση προκαλείται από πολλούς εξωκυτταρικούς και ενδοκυτταρικούς παράγοντες. Αποπτωτικοί παράγοντες είναι οι ιοί, η ακτινοβολία και η κόπωση ή και η αδυναμία επιδιόρθωσης του DNA. Η απόπτωση αποτελεί μέρος της ανοσοποιητικής απόκρισης.

Η απόπτωση είναι εξαιρετικά σημαντική διαδικασία και λαμβάνει μέρος τόσο σε ενήλικα όσο και εμβρυικά κύτταρα. Στα έμβρυα τα κύτταρα πεθαίνουν όταν η δομή που σχηματίζουν δεν είναι πλέον απαραίτητη. Πολλές φορές, ο κυτταρικός θάνατος είναι απαραίτητος για τη ρύθμιση του κυτταρικού αριθμού. Τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στην απόπτωση με αποτέλεσμα ο αριθμός τους να μεγαλώνει και να δημιουργούν όγκους. Ωστόσο, και η αυξημένη απόπτωση είναι επιβλαβής επειδή οδηγεί σε εκφυλιστικές ασθένειες.



Εικόνα 8. Κύτταρο που υπόκειται σε απόπτωση.



Εικόνα 9. Στα αριστερά φυσιολογικό κύτταρο. Στα δεξιά κύτταρο που υπόκειται σε απόπτωση. Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

1.2.6.2 Μηχανισμός απόπτωσης που επάγεται από GCs

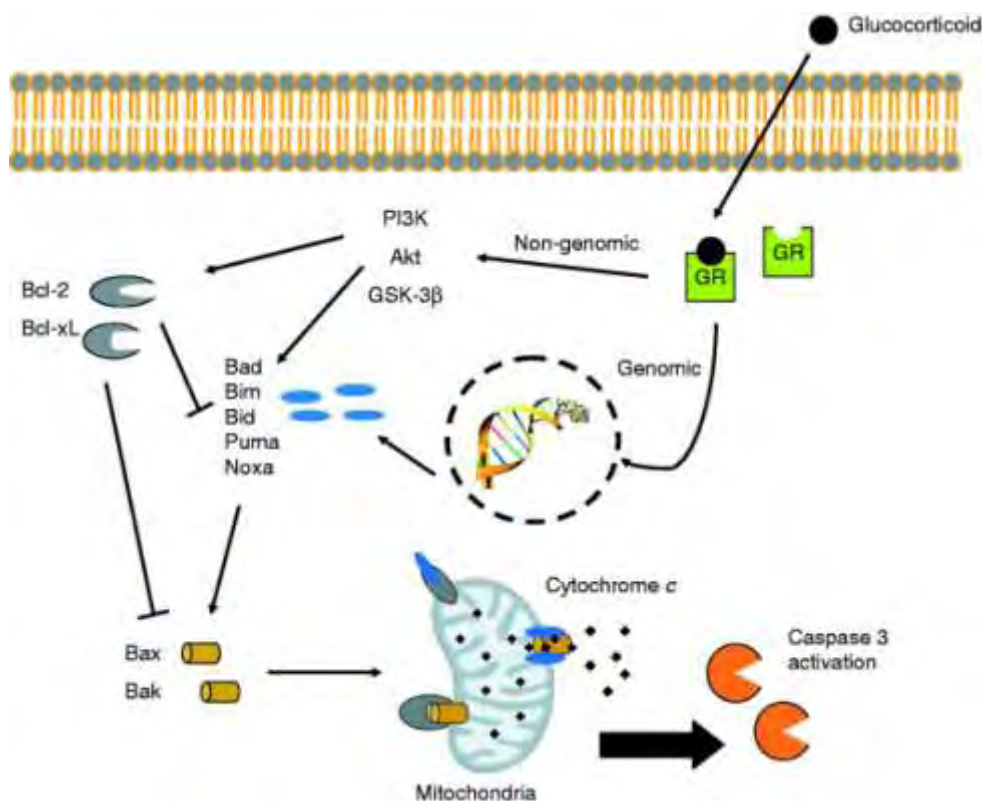
Τα γλυκοκορτικοειδή, αρχικά, χαρακτηρίστηκαν για την επίδρασή τους στον μεταβολισμό και την ανοσοκατασταλτική τους δράση και πολλές φορές χρησιμοποιούνται για την θεραπεία φλεγμονής. Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση σε πολλούς τύπους κυττάρων και σε ιστούς. Η απόπτωση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζει το σκελετικό σύστημα, το μυϊκό σύστημα, το κυκλοφορικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το ενδοκρινικό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα και τέλος το ανοσοποιητικό σύστημα [Amanda L. et al., 2013].

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα για τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Η πολύπλευρη βιολογική τους δράση τα καθιστά απαραίτητα για πολλές θεραπείες. Ωστόσο, μπορεί να προκληθούν αυξημένα ποσοστά είτε από τον παράγοντα του στρες, είτε από συνεχή χρήση και αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανεπιθύμητων αποτελεσμάτων. Τα γλυκοκορτικοειδή, όντως, έχουν πιθανή αποπτωτική δράση σε πολλούς τύπους κυττάρων, μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR.

Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση μέσω πολλών και διαφόρων μηχανισμών. Τα συμβάντα που λαμβάνουν χώρα στην *de novo* μεταγραφή και μετάφραση είναι πολύ σημαντικά, καθώς η ακτινομυκίνη D και το κυκλοεξιμίδιο εμποδίζουν τα λεμφοκύτταρα να από-πολώσουν την μεμβράνη του πλάσματος και να υποβληθούν σε απόπτωση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή, υποδηλώνοντας την γεωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών στην επαγωγή απόπτωσης. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η από-πόλωση της μεμβράνης είναι άμεσα συνδεδεμένη με την απόπτωση [Mann CL and Cidlowski JA., 2001]. Επιπλέον, υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών που έχουν υποστεί μεταλλάξεις στην περιοχή όπου προσδέεται το DNA, και έμμεσα στερούνται της δράσης ενεργοποίησης τους, δεν υπόκεινται σε απόπτωση μέσω σηματοδότησης GCs [Reichardt HM et al., 1998].

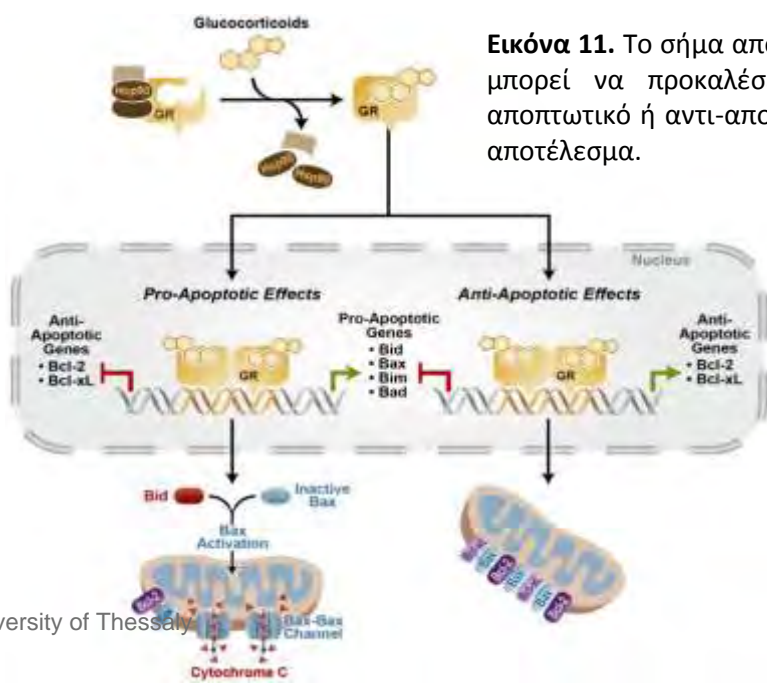
Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση μέσω του εξωγενούς μονοπατιού απόπτωσης, ενώ ταυτόχρονα σε αυτή την διαδικασία συμπεριλαμβάνεται και η ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού απόπτωσης. Τα γλυκοκορτικοειδή στέλνουν σήματα, τα οποία αυξάνουν τα επίπεδα της Bim (προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2) και κατά συνέπεια ενεργοποιούνται οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax/Bak για να διασπάσουν την μεμβράνη των μιτοχονδρίων, έτσι ώστε να απελευθερωθεί το κυτόχρωμα C και άλλες αποπτωτικές πρωτεΐνες. Το συγκεκριμένο μονοπάτι σηματοδότησης οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και της κασπάσης 3,

και τελικά στην απόπτωση [Saleh A., 1999]. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης που επάγεται από τα GCs είναι η θετική ρύθμιση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bad και η Puma, και η αρνητική ρύθμιση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως η Bcl-2 και η Bcl-xL. Η ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή και αλλάζει και το αποτέλεσμα (απόπτωση ή όχι) εξαρτάται από τον ιστό ή/και το κύτταρο (ιστοειδικότητα) [Amanda L. et al., 2013].



Εικόνα 10. Μονοπάτι απόπτωσης επαγόμενη από GCs. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ασκούν την δράση τους με γενωμικό ή μη γενωμικό τρόπο. Αν και ο ακριβής μηχανισμός της απόπτωσης που επάγεται από γλυκοκορτικοειδή δεν είναι ακριβής και μπορεί να ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων, θεωρείται ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού για να προκαλέσουν την ενεργοποίηση των κασπασών.

Το προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα από την σηματοδότηση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή είναι άμεσα εξαρτώμενο από τον τύπο του



Εικόνα 11. Το σήμα από τα GCs μπορεί να προκαλέσει προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό αποτέλεσμα.

κυττάρου που λαμβάνει το σήμα. Πολλοί τύποι κυττάρων υπόκεινται σε απόπτωση επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή. Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί τύποι κυττάρων που αντιστέκονται ή αντιδρούν με αντί-αποπτωτικούς μηχανισμούς στο σήμα των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή συχνά χορηγούνται ως φαρμακευτικά σκευάσματα για την καταπολέμηση ασθενειών, και πολύ συχνά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου: σε αιματολογικούς καρκίνους, λεμφική υπερπλασία, λόγω των αποπτωτικών τους δράσεων σε λεμφοειδή κύτταρα. Μέσω επιστημονικών μελετών έχει αποδειχθεί ότι πολλοί τύποι κυττάρων μπορούν να ανταποκριθούν στα γλυκοκορτικοειδή με ένα τρόπο που προάγει την επιβίωση τους παρά την επικείμενη απόπτωσή τους. Στο σχήμα που ακολουθεί διακρίνεται η ιστοειδικότητα της απόπτωσης που επάγεται από τα GCs στο ανθρώπινο σώμα [Amanda L. et al., 2013].

Μελέτες διαγονιδιακών ζώων που υπερεκφράζουν το ένζυμο 11-β'- υδροξυστεροειδή δευδρογονάση 2, ένα ένζυμο που μειώνει τα επίπεδα των ενεργών κορτικοστεροειδών, στους οστεοβλάστες και στα οστεοκύτταρα υποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν άμεση αποπτωτική δράση στα κύτταρα των οστών [O'Brien CA, 2004]. Ωστόσο, ένα καλό αναπάντητο ερώτημα αποτελεί το πώς τα γλυκοκορτικοειδή εξειδικευμένα σκοτώνουν κύτταρα των οστών και ταυτόχρονα προστατεύουν άλλα κύτταρα, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα. Πιθανή απάντηση θα δωθεί παρακάτω στις ισομορφές του GR.

Η απόπτωση που επάγεται από γλυκοκορτικοειδή διακρίνεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, συμπεριλαμβάνει την ενεργοποίηση του GR και την ρύθμιση της μεταγραφής. Το δεύτερο στάδιο (decision stage), διακρίνεται από την επιστράτευση αποπτωτικών παραγόντων σε μιτοχονδριακό επίπεδο. Το τελευταίο στάδιο (execution stage), χαρακτηρίζεται από την ενεργοποίηση προ-αποπτωτικών κασπασών και ενδονουκλεασών [Frankfurt O and Rosen ST, 2004].

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Ο κύριος θεραπευτικός τους ρόλος βασίζεται στην ενεργοποίηση του υποδοχέα GR και στους μηχανισμούς που υπόκεινται στην ρύθμισή του, που μπορούν να αποτελέσουν το έναυσμα για τον κυτταρικό θάνατο, αλλά αυτό το αποτέλεσμα ποικίλλει σύμφωνα με τον τύπο του καρκίνου. Οι τρεις κύριοι τύποι καρκίνου που αντιστέκονται στην απόπτωση που επάγεται από τα GCs είναι η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, το οστεοσάρκωμα και το καρκίνωμα των πνευμόνων. Ένα πιθανό αίτιο είναι η δυσλειτουργία του GR και/ή η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του GR που οδηγεί στην αποτυχία απόπτωσης. Η έλλειψη της λειτουργίας του GR οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του. Η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του GR μπορεί

να οφείλεται σε μειωμένη δράση του υποκινητή του, σε αυξημένη μεθυλίωση στην περιοχή πρόσδεσης του υποκινητή ή σε αυξημένη έκφραση διαφορετικών ισομορφών του GR, οι οποίες μειώνουν την μεταγραφική του ικανότητα [Schlossmacher G et al., 2011].

1.2.6.3 Απόπτωση επαγόμενη από GCs σε συστήματα οργάνων

Όπως προαναφέρθηκε, η απόπτωση που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή είναι ιστοειδική, δηλαδή εξαρτάται από τον τύπο κυττάρων ή/και από τον ιστό. Ακολουθούν κάποια συστήματα οργάνων και η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε αυτά.

▪ Σκελετικό Σύστημα

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αντι-πολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική επίδραση στους οστεοβλάστες, κύτταρα υπεύθυνα για τον σχηματισμό οστών. Οι μηχανισμοί της δράσης τους περιλαμβάνουν την θετική ρύθμιση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι Bim, και την αρνητική ρύθμιση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως είναι η Bcl-2, Bcl-XL και η Mcl-1 [Moutsatsou P. et al., 2012]. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η δεξαμεθαζόνη εμποδίζει/αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη του οστεοβλάστη MC3T3-E1 μέσω της παύσης του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 και επαγωγής της απόπτωσης μέσω θετικής ρύθμισης (που εξαρτάται από την p53) του CDK αναστολέα της p21, και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών NOXA και PUMA [Li H. et al., 2012]. Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή βοηθούν την επιβίωση των οστεοκλαστών, κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την επαναρρόφηση στα οστά. Επιπλέον, παρατηρείται η αποπτωτική δράση της δεξαμεθαζόνης σε χονδροκύτταρα. Κύριο ρόλο σε αυτό το μονοπάτι απόπτωσης στα χονδροκύτταρα παίζει η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bax. Η αποσιώπηση του γονιδίου της Bax, είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην υπόκεινται σε απόπτωση από την δεξαμεθαζόνη [Zaman F. et al., 2012]. Ένας πιθανός μηχανισμός που η δεξαμεθαζόνη επάγει την απόπτωση είναι μέσω ενεργοποίησης κασπασών και αναστολής του μονοπατιού PI3K/AKT [Chrysis D. et al., 2005]. Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά τα δεδομένα, μπορούμε να πούμε ότι τα GCs έχουν προ-αποπτωτική δράση, η οποία μπορεί να έχει αρνητική επίδραση στο σκελετικό σύστημα και μπορεί να συμβάλλει στην εμφάνιση οστεοπόρωσης.

▪ Μυϊκό Σύστημα

Υπερβολική δόση γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη μυοπάθειας, μία ασθένεια που οδηγεί στην αποδυνάμωση των μυών [Dirks-Naylor AJ & Griffiths CL., 2009]. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε μυοπάθεια επαγόμενη από GCs, περιλαμβάνουν τον αυξημένο

καταβολισμό πρωτεϊνών καθώς και την απόπτωση. Το συνθετικό κορτικοστεροειδές TA (triamcinolone acetonide) έχει την δυνατότητα να επάγει απόπτωση στον υποκνιμήδιο μυ. Σε άτομα που χορηγούταν το TA ως θεραπεία, βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα Fas, προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών FADD, Bax, Bad και κασπάσης 8 [Lee MC et al., 2005]. Η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη επάγει απόπτωση σε μυϊκά κύτταρα L6 αρουραίου, πιθανώς μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) [Orzechowski A. et al., 2003].

▪ Αναπνευστικό Σύστημα

Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν απόπτωση σε κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος ASMC (airway smooth muscle cells), το οποίο παρατηρήθηκε με χρήση δεξαμεθαζόνης σε αρουραίους. Η απόπτωση στα συγκεκριμένα κύτταρα επάγεται μέσω αύξησης των επιπέδων Bax και μείωσης της έκφρασης μορίων Bcl-2. Αποτέλεσμα αυτών είναι η καταστροφή του επιθηλίου των αεραγωγών και η εμφάνιση άσθματος. Περαιτέρω έρευνα συνιστάται για την κατανόηση της απόπτωσης που επάγεται από GCs [Ding MJ et al., 2008; Dorscheid DR et al., 2001].

▪ Κυκλοφορικό Σύστημα

Σε μελέτες που έγιναν η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε απόπτωση κυττάρων του ενδοθηλίου, που με την σειρά της οδήγησε σε αραίωση των τριχοειδών αγγείων, η οποία σχετίζεται με την υπέρταση σε ζώα και ανθρώπους [Vogt CJ & Schmid-Schönbein GW., 2001]. Ωστόσο, η αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ενδοθηλίου είναι αμφιλεγόμενη καθώς υπάρχουν μελέτες που τονίζουν την αντι-αποπτωτική τους δράση.

▪ Νευρικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα χαρακτηρίζεται από πολλά αγγεία και περιλαμβάνει εξειδικευμένα κύτταρα, τα περικύτταρα, τα οποία καλύπτουν τα κύτταρα του ενδοθηλίου και βοηθούν στην ομοίωση των αιμοφόρων αγγείων. Πρώιμα περικύτταρα απομονώθηκαν από αγγεία (του κεντρικού νευρικού συστήματος) αρουραίου και καλλιεργήθηκαν. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρήθηκε η επαγωγή απόπτωσης από γλυκοκορτικοειδή, ένα φαινόμενο το οποίο ο ανταγωνιστής του GR RU486 το εμπόδιζε [Katychev A. et al., 2003]. Κάποιοι άλλοι τύποι κυττάρων του νευρικού συστήματος που μπορούν να υποστούν απόπτωση επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή συμπεριλαμβάνουν και τα κύτταρα του ματιού. Η χρόνια χρήση ή υψηλή δόση GCs συχνά μπορεί να αυξήσει την πίεση του οφθαλμού και μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στα κύτταρα του δοκιδωτού δικτύου, οδηγώντας έτσι στην ασθένεια του γλαυκώματος [Wordinger RJ & Clark AF, 1999]. Υψηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης προκαλούν απόπτωση και νέκρωση σε επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς βοοειδών [Chen WL et al.,

2006] και σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς [Bourcier T. et al., 2000]. Είναι ξεκάθαρο ότι οφθαλμικά κύτταρα που παίζουν σημαντικό ρόλο υπόκεινται σε απόπτωση επαγόμενη από GCs, ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως η επίδραση in vivo των γλυκοκορτικοειδών στον οφθαλμό.

Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την επίδραση την απόπτωσης και στον εγκέφαλο, παρά την παρουσία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη μπορεί να προκαλέσει απόπτωση στον ιππόκαμπο σε αντίθεση με το φυσικό γλυκοκορτικοειδές κορτικοστερόνη [Hassan AH et al., 1996]. Χρόνια υψηλή δόση κορτικοστερόνης μπορεί να καταστείλει την νευρογένεση στον ιππόκαμπο, ένας μηχανισμός που μπορεί να εμπλέκεται στην εμφάνιση κατάθλιψης [Brummelte S & Galea LA, 2010]. Η πλήρης απουσία ή τα υπερβολικά επίπεδα GCs στον εγκέφαλο μπορεί να αποβεί μοιραία.

▪ Πεπτικό Σύστημα

Το πεπτικό σύστημα συγκροτείται από το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το πάγκρεας, το συκώτι, τη χοληδόχο κύστη και το κόλον. Το μεγαλύτερο μέρος της παγκόσμιας βιβλιογραφίας για την απόπτωση που επάγουν τα GCs στο πεπτικό σύστημα επικεντρώνεται στα επιθηλιακά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η δεξαμεθαζόνη συμβάλλει στην εμφάνιση έλκους μέσω της αναστολής της συνθετάσης της προσταγλανδίνης και της υπεροξειδάσης [Bandyopadhyay U et al., 1999].

▪ Ενδοκρινικό Σύστημα

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα στο ενδοκρινικό σύστημα. Αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στον μεταβολισμό της γλυκόζης και αυτό μπορεί να συμβάλει στην δημιουργία διαβήτη τύπου II [Di Dalmazi G. Et al., 2012]. Το πάγκρεας, το οποίο παράγει ινσουλίνη, υπόκειται άμεσα στην αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών. Κύτταρα ποντικού, β-παγκρεατικά και κύτταρα INS-1, σε καλλιέργεια υπόκεινται στην αποπτωτική δράση της δεξαμεθαζόνης. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην απόπτωση περιλαμβάνουν την καταστολή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και στην ενεργοποίηση της καλσινευρίνης, που με την σειρά της οδηγεί στην από-φωσφορυλίωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών BAD και στην από-πόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης [Ranta F. et al., 2006].

▪ Αναπαραγωγικό Σύστημα

Παρά το γεγονός ότι τα γλυκοκορτικοειδή είναι πολύ σημαντικά για την σωστή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, λίγα είναι γνωστά από την διεθνή βιβλιογραφία για την αποπτωτική τους επίδραση [Waddell BJ. et al., 2000]. Σε αρουραίους, η θεραπεία με

δεξαμεθαζόνη προκαλεί απόπτωση στον πλακούντα, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές στην εγκυμοσύνη, όπως είναι η καθυστερημένη ανάπτυξη του εμβρύου. Ακόμα, η δεξαμεθαζόνη μπορεί να έχει επιπτώσεις στην δημιουργία ωκυττάρων και έχει αντίκτυπο στην γονιμότητα των θηλέων [Roulain M et al., 2012].

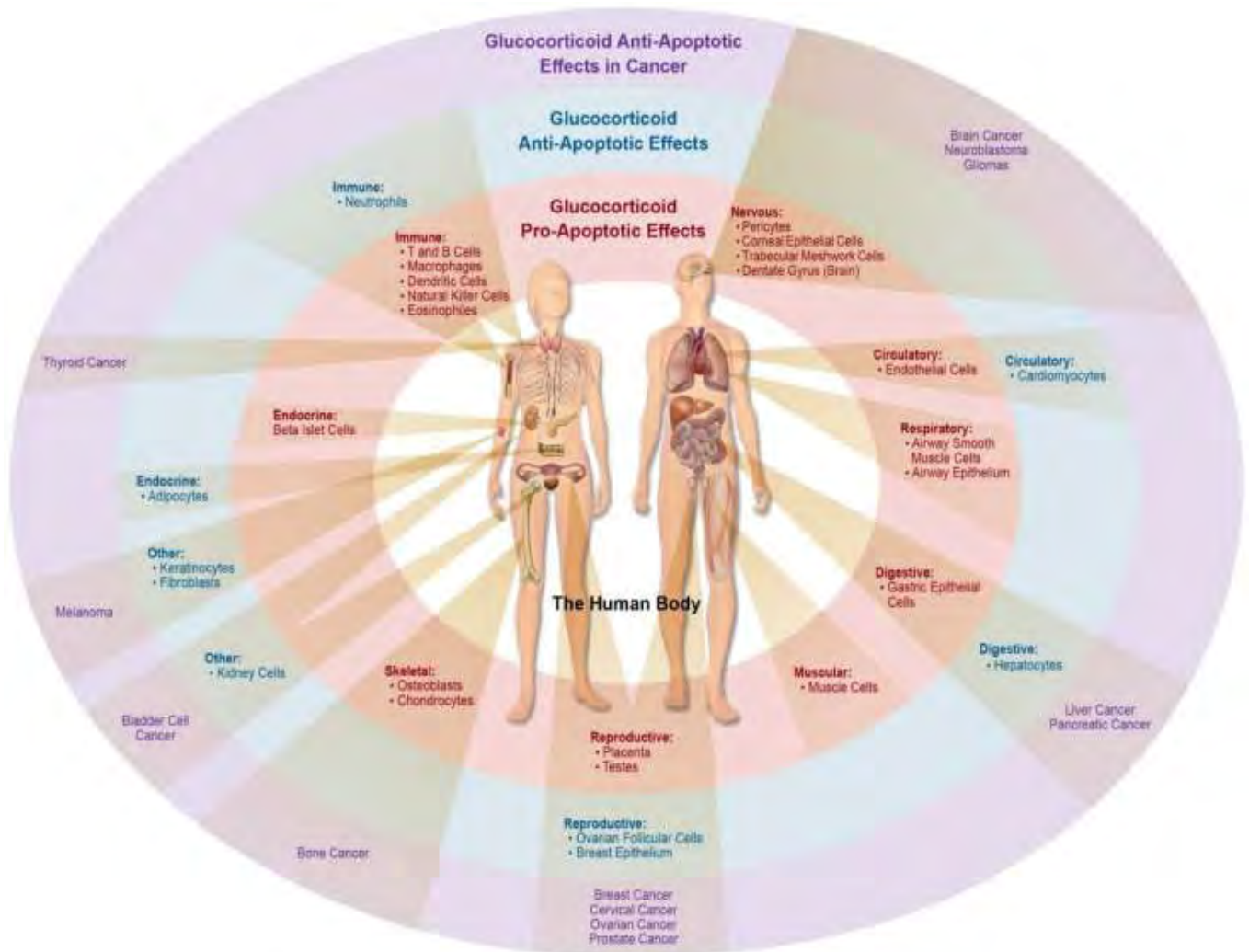
Λίγες μελέτες έχουν διεξαχθεί για την αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στο αναπαραγωγικό σύστημα των ανδρών. Κάποιες από αυτές τις μελέτες υποδεικνύουν ότι επάγεται απόπτωση σε κύτταρα των όρχεων σε αρσενικά ποντίκια [Orazizadeh M. Et al., 2010]. Κάποιες άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι επάγεται απόπτωση σε κύτταρα Leydig, τα οποία είναι η κύρια πηγή τεστοστερόνης [Andric SA. et al., 2013]. Οι μηχανισμοί για την απόπτωση που επάγεται από GCs στα κύτταρα Leydig συμπεριλαμβάνει τα μόρια Fas/FasL, την ενεργοποίηση της κασπάσης 3, την από-πόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης καθώς και τα αυξημένα επίπεδα των ROS [Gao HB et al., 2003].

▪ Ανοσοποιητικό Σύστημα

Η αποπτωτική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν μελετηθεί διεξοδικά με την πάροδο των χρόνων, και τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν πλειοτροπικές δράσεις. Η επαγωγή της απόπτωσης από GCs είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι βασικά για την σωστή επιλογή των T κυττάρων, για την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και για την ανοσοαπόκριση που ακολουθεί μιας φλεγμονής [Ashwell JD. et al., 2000]. Υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών επάγουν απόπτωση στα κύτταρα του θύμου αδένου [Caron-Leslie LM. Et al., 1991]. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που υπόκεινται στην αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών είναι τα T κύτταρα [Brunetti M. et al., 1995], τα B κύτταρα [Lill-Elghanian D. Et al., 2002], τα μακροφάγα [Zhou JY. Et al., 2010], τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα [Cao Y. Et al., 2013], τα ηωσινόφιλα [Meagher LC et al., 1996], και τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα [Migliorati G. Et al., 1992]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα γλυκοκορτικοειδή δεν έχουν την ίδια αποπτωτική επίδραση στα ουδετερόφιλα, αντιθέτως τα προστατεύουν από την απόπτωση [Meagher LC et al., 1996].

Πρόσφατες μελέτες έχουν υποδείξει τον σημαντικό ρόλο ενός καινούργιου παράγοντα, του TNFAIP8 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 8) στην απόπτωση των θυμοκυττάρων. Η αρνητική ρύθμιση του παράγοντα αυτού προστατεύει τα κύτταρα του θύμου αδένου από την απόπτωση που επάγει η δεξαμεθαζόνη [Woodward MJ et al., 2010]. Επιπλέον, η δεξαμεθαζόνη μειώνει την έκφραση σημαντικών πυρηνικών (Drosha and

DGCR8/Pasha) και κυτταροπλασματικών (Dicer) microRNAs, ενισχύοντας έτσι την αποπτωτική της δράση [Smith LK et al., 2010]. Η απόπτωση που επάγεται από GCs μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην θεραπεία καρκίνου των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.



Εικόνα 12. Ιστοειδική απόπτωση των γλυκοκορτικοειδών στο ανθρώπινο σώμα.

1.3 Πυρηνικοί Υποδοχείς – Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)

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

Στις πλείστες των περιπτώσεων, οι προκείμενοι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται από προσδέτες και μεταξύ άλλων, έχουν ενεργό ρόλο και στην αναδιάταξη της χρωματίνης. Μπορούν να λειτουργούν είτε μόνοι τους είτε σε συνεργασία με μόρια συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχουν και πυρηνικοί υποδοχείς των

οποίων η μεταγραφική ενεργότητα δεν είναι προσδετο-εξαρτώμενη, αλλά ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά μέσω φωσφορυλίωσης ή ακετυλίωσης ή μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς [Mangelsdorf and Evans, 1995; Hermanson et al., 2002].

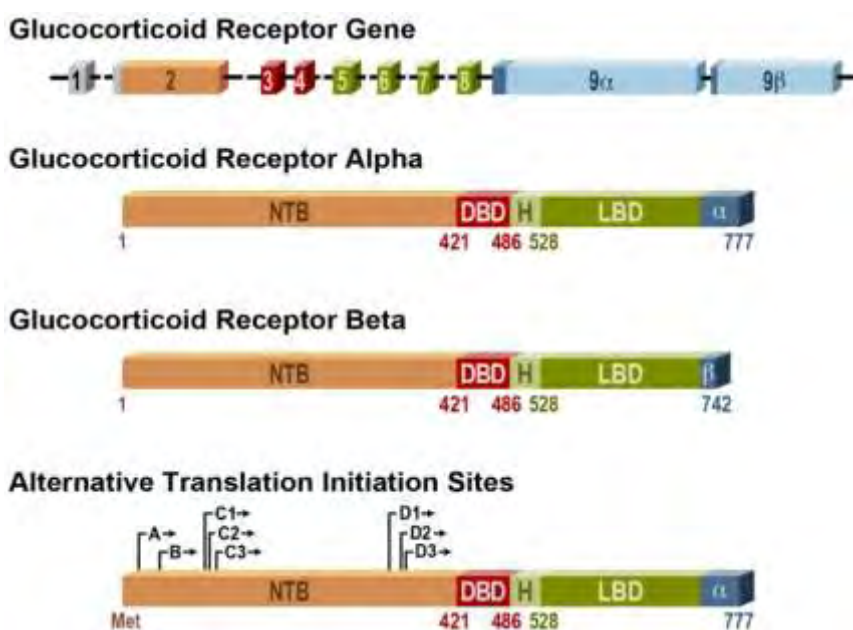
1.3.1 Δομή GR

Ο GR είναι υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR), είναι μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιείται κατόπιν πρόσδεσης. Ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, και του έχει αποδοθεί διττός ρόλος, αυτός του μεταγραφικού παράγοντα που προσδέεται σε στοιχεία απόκρισης του γλυκοκορτικοειδούς (GREs) σε πυρηνικό και μεταγραφικό DNA και εκείνος του ρυθμιστή άλλων παραγόντων μεταγραφής [Ortsäter H, 2012; Mangelsdorf, 1995; PsarraAM, 2011]. Μόλις οι στεροειδείς ορμόνες συνδεθούν με τον GR, ο τελευταίος μετατοπίζεται στον πυρήνα και έχει γενωμική ή μη γενωμική δράση. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα ανθρώπινα κύτταρα (hGR) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5, και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή 31-32 (5q31-32). Ο υποδοχέας έχει 3 κύριες λειτουργικές περιοχές : την περιοχή N-τελικό, την περιοχή όπου συνδέεται με το DNA (DBD) και την περιοχή LBD [Lu NZ and Cidlowski JA, 2004].

Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, είναι η περιοχή NTD που διαθέτει μία ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-1) η οποία προσδέεται σε διάφορους συν-ρυθμιστές και συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Αλληλουχίες στην περιοχή NTD είναι πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πυρηνική τοποθέτηση του υποδοχέα, στην έξοδο από τον πυρήνα, ή/και στη διατήρηση του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα. Στην περιοχή NTD 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 αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης και είναι ο στόχος ποικίλων κινασών σηματοδότησης, όπως είναι οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cdk). Κεντρικά του υποδοχέα εντοπίζεται η περιοχή DBD καθώς επίσης και μια εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης (HR). Η DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της υπερικογένειας και αποτελείται από δύο ιόντα ψευδαργύρου και σχηματίζει σύμπλοκο με 8 κυστεΐνες, σχηματίζοντας έτσι το γνωστό μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου, τα οποία αναγνωρίζουν και δένουν σε αλληλουχίες των DNA-στόχων, τις αποκαλούμενες GREs. Επιπλέον, στην κεντρική περιοχή βρίσκεται η περιοχή διμερισμού, η οποία σχηματίζει μία έλικα που αντιδρά με την

αντίστοιχη περιοχή σε έναν ταυτόσημο υποδοχέα προκειμένου να επέλθει διμερισμός. Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται η περιοχή LBD, η οποία αποτελείται από 12 α-έλικες και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, δημιουργώντας ένα υδροφοβικό θυλάκιο για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών [Bledsoe et al., 2002]. Η LDB, ξεκινά με την περιοχή αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins, HSP) και τελειώνει με μία δεύτερη AF-2. Η περιοχή αυτή περιέχει, επίσης, αλληλουχίες που διμερισμού και πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα (Εικόνα 13) [Ortsäter H, 2012; Mitre-Aguilar IB, 2015; Ma H, 1999].

Το εναλλακτικό μάτισμα του εξωνίου 9 του hGR έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο ισομορφών του υποδοχέα : την ισομορφή hGRα και την ισομορφή hGRβ. Η ισομορφή hGRα, όταν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα, είναι υπεύθυνη για την κλασική σηματοδότηση και την ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων. Αντιθέτως, ο κύριος ρόλος της ισομορφής hGRβ δεν είναι ακόμα γνωστός και πιθανώς να λειτουργεί ως αναστολέας της σηματοδότησης μέσω hGRα [Oakley RH et al., 1996]. Επιπλέον, εναλλακτικές περιοχές μετάφρασης και μεταμεταγραφικές ρυθμίσεις του GR έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολλών ισομορφών GR. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η μεταφραστικές ισομορφές του GRα επάγουν απόπτωση σε διαφορετικά επίπεδα. Η ισομορφή GRα-C θεωρείται ως ο κύριος εν δυνάμει επαγωγέας απόπτωσης, ενώ η ισομορφή GRα-D θεωρείται ως ο πιο ασθενής εν δυνάμει επαγωγέας της απόπτωσης. Αυτά τα στοιχεία αποκαλύπτουν, επίσης, ότι η σχετική αναλογία συγκεκριμένων ισομορφών GR σε ιστούς και σε κύτταρα επηρεάζει την απόκριση τους σε απόπτωση επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή [Lu NZ et al., 2007].



Εικόνα 13. Δομή του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο (hGR). Ο hGR είναι πρωτεΐνη αποτελούμενη από διακριτές περιοχές. Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, είναι η περιοχή NTB, 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 (H). 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).

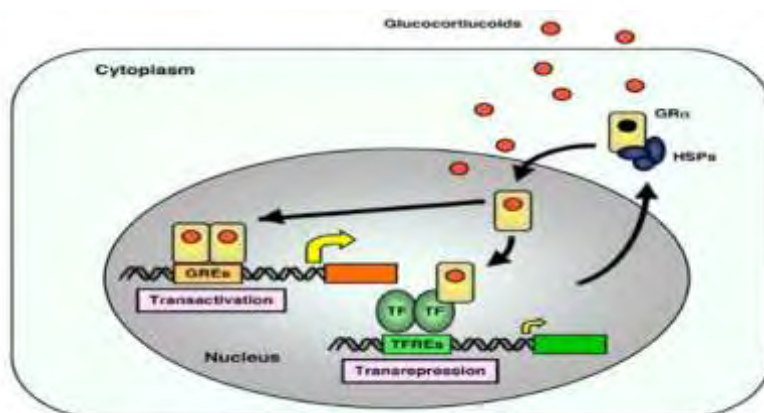
1.3.2 Βιολογική δράση του GR

1.3.2.1 Γενικά

Όπως προαναφέρθηκε, τα γλυκοκορτικοειδή είναι αποτελεσματικά φάρμακα για χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως είναι το άσθμα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Δρουν μέσω της σύνδεσής τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που βρίσκεται στο κυτταρόσολιο και έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής γονιδίων.

Της δέσμευσης του στεροειδούς στον υποδοχέα του εντός του κυτταροπλασματικού χώρου, έπεται μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, που έχει ως συνέπεια το διαχωρισμό του από το σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και την πυρηνική ή τη μιτοχονδριακή του μετατόπιση. Τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια οι υποδοχείς ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, δρώντας κυρίως ως προσδετο-εξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες. Διακρίνονται δύο διεργασίες [Ian M Adcock et al., 1999]:

- Ενεργοποίηση (transactivation). Απευθείας σύνδεση του GR στο DNA
- Καταστολή (tranrepression). Παρεμπόδιση της δράσης μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο AP-1 και ο NF-κB.



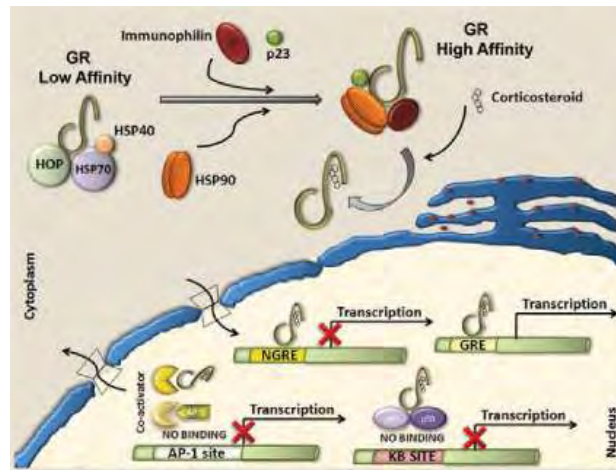
Εικόνα 14. Μετά την πρόσδεση των GCs στον GR έπεται η ενεργοποίηση ή η καταστολή γονιδίων στόχων.

Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση ή η καταστολή γονιδίων μέσω του GR μπορεί να επηρεάζεται από την ορμόνη που συνδέεται σε αυτόν με τέτοιο τρόπο που αντικατοπτρίζει την συγγένεια του προσδέτη καθώς και τις διαφορετικές επιδράσεις που έχει κάθε προσδέτης στην δράση του GR στο DNA και σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η διαφοροποίηση αυτών των δύο διεργασιών (ενεργοποίηση και καταστολή) οδηγεί στην πιθανότητα ανάπτυξης πιο εξειδικευμένων γλυκοκορτικοειδών.

1.3.2.2 Αλληλεπίδραση GR και μοριακών συνοδών

Ο ανενεργός GR βρίσκεται στο κυτοσόλιο και είναι προσδεμένος με πρωτεΐνες. Πρόκειται για πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς και η μοίρα του GR είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με αυτές, γεγονός που παρατηρείται από τη στιγμή της σύνθεσής του και διαρκεί μέχρι την αποσύνθεση του. Μεταξύ όλων των συνοδών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις διάφορες φάσεις της ζωής του υποδοχέα, δύο από αυτές ξεχωρίζουν: η Hsp70 και η Hsp90. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, αν και είναι κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικές, υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες στον οργανισμό και συμμετέχουν σε πληθώρα λειτουργιών, ξεκινώντας από την αναδίπλωση και καταλήγοντας στην μεταγωγή σήματος. Η Hsp70 δεσμεύει μικρά υδρόφοβα πεπτίδια και βοηθά στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων. Αντίθετα, η Hsp90 δεσμεύει πρωτεΐνες που ήδη έχουν υποστεί πλήρη ή μερική αναδίπλωση και τις βοηθά να αποκτήσουν ή να διατηρήσουν την ενεργή τους κατάσταση [Grad I, 2007].

Η σωστή ωρίμανση του GR, για να μπορεί να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια ορμόνες, απαιτεί την παρουσία των Hsp70, Hsp40, Hsp90, Hop και p23 [Pratt & Dittmar, 1998]. Η Hsp40 επιταχύνει την υδρόλυση του ATP από την Hsp70, με αποτέλεσμα την ισχυρή πρόσδεση του GR με την Hsp70, η οποία με την σειρά της διευκολύνει την πρόσδεση του επόμενου στοιχείου στο σύμπλοκο, του TPR (tetratricopeptide repeat), ο οποίος περιέχει την Hop. Η Hop αποτελείται από 3 δομές TPR μέσω των οποίων γίνεται η αλληλεπίδραση της Hsp70 με την Hsp90, και έτσι επιτρέπεται η μεταφορά του υποστρώματος από την Hsp70 στην Hsp90 [Grad & Picard, 2007]. Ο GR έχει μικρότερη συγγένεια ως προς την δέσμευση γλυκοκορτικοειδών απουσία της Hsp90, η οποία ρυθμίζει το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του GR μέσω της πρόσδεσής της με ATP [Grenert et al., 1999; Nemoto et al., 1990]. Παρουσία ATP η συγγένεια της Hsp90 για την Hop μειώνεται και η Hop εγκαταλείπει έτσι το σύμπλοκο, αφήνοντας ελεύθερη την περιοχή πρόσδεσης μορίων, που περιέχουν TPR, της Hsp90 για την πρόσδεση των ανοσοφιλινών FKBP52, FKBP51 και της κυκλοφιλίνης 40, αλλά και άλλων μοριακών συνοδών που ρυθμίζουν την δράση του συμπλόκου GR-Hsp90.



Εικόνα 15. Συμπαράγοντες και πρωτεΐνες αγκυροβόλησης διαμορφώνουν την γενωμική απόκριση σε κορτικοστεροειδή μέσω της απευθείας σύνδεσής τους στον GR.

Επιπλέον, η μεταγραφική δράση του GR ρυθμίζεται, αρνητικά ή θετικά, μέσω φωσφορυλίωσης από κινάσες και φωσφατάσες. Η δράση αυτών των πρωτεϊνών έχουν εμφανείς επιπτώσεις στην δράση του GR καθώς ρυθμίζουν την αναδίπλωση, την ωρίμανση, την φωσφορυλίωση, την μετακίνηση και την αποσύνθεση (degradation) του GR [Ismaili & Garabedian, 2004]. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι πρωτεΐνες που επιδρούν στον GR.

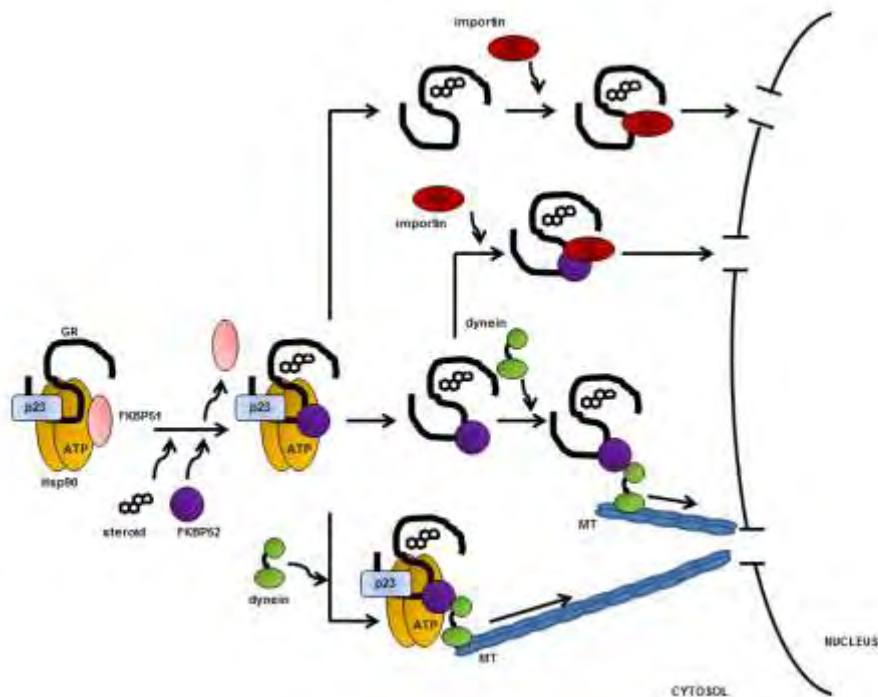
Συντομογραφία	Πλήρες Όνομα	Χαρακτηριστικά
Hsp90	Heat-shock protein 90	Μοριακή συνοδός που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης
Hsp70, Hsc70	Heat-shock protein 70	Μοριακή συνοδός που εμπλέκεται στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης
Hsp40	Heat-shock protein 40	Συν- συνοδός της Hsp70:ενεργοποιεί τη δράση της Hsp70 ATPάσης
Hop, p60	Hsp70–Hsp90 organizing protein	Συνδέει τις Hsp70 και Hsp90 μέσω των πολλαπλών TRR περιοχών
Hip, p48	Hsp70 interacting protein	Συν-συνοδός της Hsp70: σταθεροποιεί το σύμπλοκο Hsp70-ADP & παρατείνει την αλληλεπίδραση του με τον GR

Bag-1, Hsp46, RAP46		Συν-συνοδός της Hsp70: ενεργοποιεί την ανταλλαγή του ADP με ATP & την απελευθέρωση του GR
p23, cPEGS3, tebp	Hsp90 co-chaperone p23; cytosolic prostaglandin E2 synthase; telomerase-binding protein p23	Συν-συνοδός της Hsp90: σταθεροποιεί το σύμπλοκο ATP-δεσμευμένου Hsp90 και την πρόσδεση του GR
Aha1		Συν-συνοδός της Hsp90: διεγείρει την Hsp90 ATPάση
FKBP51, FKBP52	FK506-binding proteins 51 and 52	Συν-συνοδοί της Hsp90: περιέχουν μία περιοχή πεπτιδυλο-προλυλο-ισομεράσης

Πίνακας 1. Συγκεντρικός πίνακας των μοριακών συνοδών που επηρεάζουν κάποιο ή κάποια από τα στάδια ζωής του GR και τα χαρακτηριστικά τους. Grad I, 2007.

1.3.2.3 Μηχανισμός σηματοδότησης GR

Όπως προαναφέρθηκε, απουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αποτελώντας μέρος ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου με ποικίλες πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς, όπως η Hsp90. Παρουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR διαχωρίζεται από τις 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.



Εικόνα 16. Διαδικασία μεταφοράς του GR στον πυρήνα. Η μεταφορά του GR στον πυρήνα. Απουσία συνδέτη, το σύμπλοκο GR-Hsp90 βρίσκεται συνδεδεμένο με την ανοσοφιλίνη FKBP51. Αμέσως μετά την πρόσδεση της ορμόνης, παρατηρείται αντικατάσταση της FKBP51 από την FKBP52. Η συνεργική δράση της FKBP52 με τη δυνεΐνη έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση του συμπλόκου GR-Hsp90 στους μικροσωληνίσκους για τη μεταφορά προς τον πυρήνα. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό αν σε αυτά τα σύμπλοκα μεταφοράς εξακολουθεί να είναι παρούσα η Hsp90 ή αν η συνδεδεμένη με τον GR FKBP52 συνδέεται με τη δυνεΐνη και τους μικροσωληνίσκους, χωρίς την Hsp90. Εναλλακτικά, ο GR μόνος του ή σε σύμπλοκο με την FKBP52 μπορεί να δεσμεύεται σε ιμπορτίνες και να μεταφέρεται μέσω των πυρηνικών πόρων (MT: μικροσωληνίσκοι, C: κυτταρόπλασμα, N: πυρήνα) [Grad I, 2007].

Γενωμικός τρόπος δράσης GR

Η λιπόφιλη φύση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών τους επιτρέπει να διαπερνούν τη κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση. Όπως έχει ήδη ειπωθεί, ο GR δύναται να ρυθμίσει τα γονίδια στόχων του με ένα θετικό ή αρνητικό τρόπο. Η θετική ρύθμιση διαμεσολαβείται κυρίως από την άμεση σύνδεση του ενεργοποιημένου από προσδέτη ομοδιμερισμένου GR (GR α) επάνω στα επαγωγίμα στοιχεία ενισχυτών στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου-στόχου, τα οποία είναι γνωστά ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs). Διαφορετικά, ο GR μπορεί να παρεμποδίσει τη δραστηριότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Αυτό δύναται να γίνει συνδεδεμένος σε αρνητικά GREs (nGREs), αλλά και με την αλληλεπίδρασή του με παράγοντες που δρουν ως συγκαταστατολείς [Reichardt et al., 2000; De Bosscher et al., 1997].

Ενεργοποίηση (transactivation). Απευθείας σύνδεση του GR στο DNA.

Η θετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τον GR προκύπτει κυρίως από την απευθείας σύνδεση των ομοδιμερών του υποδοχέα σε ειδικές αλληλουχίες, τα GREs, στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων. Έχουν διακριθεί 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]. Αμέσως μόλις επιτευχθεί η πρόσδεση αυτή, ο GR στρατολογεί τους συν-παράγοντες εκείνους που συμμετέχουν στην τροποποίηση της χρωματίνης και την μεταγραφική συσκευή, συμπεριλαμβανομένου της RNA πολυμεράσης II (Pol II) για την έναρξη της μεταγραφής. Η πρόσληψη των συν-παραγόντων αυτών, όπως του Brg1, ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HAT) CBP/p300 και άλλων μελών της οικογένειας των p160 πρωτεϊνών- όπως οι SRC1 και PGC- από τον GR μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης κάνοντας την προσιτή στην επικείμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου.

Στην περίπτωση των προσδεδεμένων (tethering) GREs παρατηρείται ένας εναλλακτικός μηχανισμός ενεργοποίησης. Στην οδό αυτή, η αλληλεπίδραση με το DNA μέσω της βοήθειας μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο STAT5, ο AP1, ο Stat3 και ο NF-κB, ενώ αξίζει να σημειωθεί, πως μέσω αυτής της οδού ενεργοποίησης, δεν είναι απαραίτητος ο διμερισμός του υποδοχέα προκειμένου να επέλθει ενεργοποίηση [Schäcke H, 2007; Schlossmacher G, 2011].

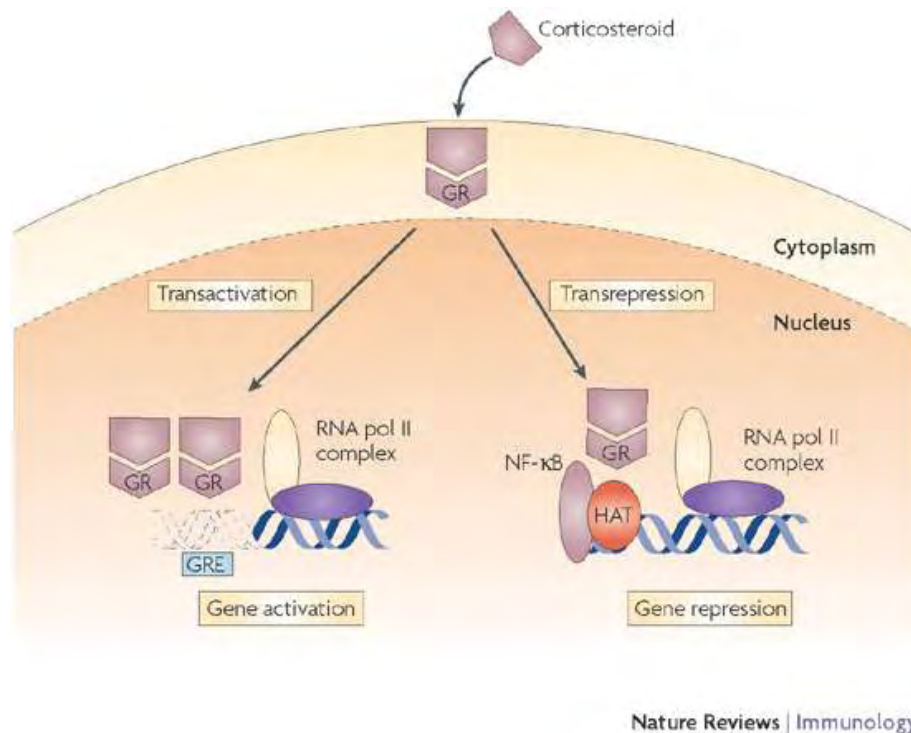
Καταστολή (transrepression). Παρεμπόδιση της δράσης μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι ο AP-1 και ο NF-κB.

Η καταστολή επέρχεται μετά από πρόσδεση του υποδοχέα σε αρνητικά GREs (negative GREs, nGREs). Τα στοιχεία αυτά διαφέρουν από τα κλασικά GREs που συναντώνται στους μηχανισμούς ενεργοποίησης τόσο δομικά- αποτελούν ανάστροφες αλληλουχίες με ένα ενδιάμεσο κενό μήκους 0-2bp- όσο και λειτουργικά. Τα στοιχεία αυτά είναι διάσπαρτα στις περιοχές κοντά στον υποκινητή. Η πρόσδεση του υποδοχέα πάνω στα nGREs ακολουθείται από άμεση στρατολόγηση συν-καταστολέων, όπως είναι οι NCoR και SMRT, οι οποίοι με τη σειρά τους στρατολογούν αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Με αυτόν τον τρόπο η χρωματίνη αποκτά πλέον μία κλειστή δομή που δεν ευνοεί την μεταγραφή [Schlossmacher G, 2011; Hudson WH, 2013].

Ο κύριος μηχανισμός καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής βασίζεται στην ικανότητα του υποδοχέα να καταστέλλει τη δράση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων όντας προσδεμένος 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 [Heck et al. 1994, Reichardt et al. 1998]. Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων στους οποίους προσδέεται ο GR, είναι ο NF-κB (nuclear factor-κB), ο IRF3 (interferon regulatory factor 3) και ο AP-1 (activator protein 1) [Ogawa et al. 2005, Reily et al. 2006]. 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.

Τονίζοντας την περιπλοκότητα αυτού του συστήματος, σε έρευνα το 2005 [Bladh et al. 2005] αποδείχθηκε ότι διαφορετικές περιοχές του GR είναι υπεύθυνες για την επίδραση στον NF-κB ή τον AP-1. Μεταλλαγμένος GR (R488Q) που δεν μπορεί να καταστείλει την δράση του NF-κB μπορούσε να καταστείλει την δράση του AP-1, ενώ η δράση επαγωγής γονιδίων του GR έμεινε ανέπαφη. Όλοι αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων, για το λόγο αυτό η αρνητική τους ρύθμιση από τον GR αποτέλεσε σημείο αναφοράς για την αντι-φλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση των κορτικοστεροειδών. Έχουν αναφερθεί και άλλοι μηχανισμοί για την κατανόηση της κατασταλτικής δράσης του GR, όπως είναι η πρόσδεσή του στην JNK (Jun N-terminal kinase), που οδηγεί στην καταστολή της δράσης της JNK, και στην συνέχεια στην καταστολή του AP-1 [Caelles et al. 1997, Bruna et al. 2003].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η γενωμική δράση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.



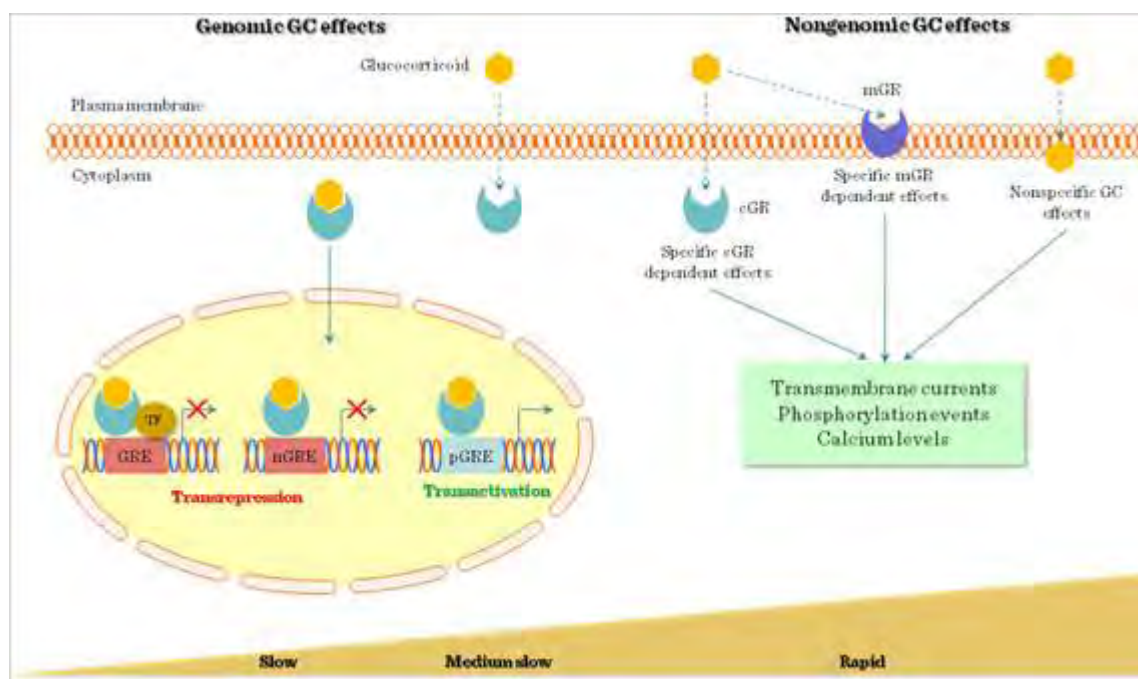
Εικόνα 17. Τα κορτικοστεροειδή εισέρχονται στο κύτταρο, προσδένονται στον υποδοχέα GR στο κυτταρόπλασμα και τον μετατοπίζουν στον πυρήνα, όπου αρχίζει η μεταγραφή γονιδίων στόχων. Πολλά γονίδια περιέχουν GREs. Μέσω ενεργοποίησης, η πρόσδεση του ενεργοποιημένου ομοδιμερούς GR σε GRE οδηγεί στην μεταγραφή γονιδίων όπως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες : annexin-1 (lipocortin-1), secretory leukoprotease inhibitor (SLPI), interleukin-10 (IL-10) and the inhibitor of nuclear factor-kappaB (IκappaBα). Μέσω καταστολής, το σύμπλοκο GR-κορτικοστεροειδές αλληλεπιδρά με μόρια συν-ενεργοποιητές (όπως το κυκλικό AMP, η CBP), τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί από προ-φλεγμονώσους παράγοντες (όπως ο NF-kappaB και ο AP-1).

Μη γενωμικός τρόπος δράσης GR

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.

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

Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτιση της έκφρασης του mGR και της απόπτωσης που επάγεται από τα GCs σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (λευχαιμικά κύτταρα). Ο mGR, πρόσφατα, βρέθηκε σε αυξημένα επίπεδα σε μονοκύτταρα σε άτομα με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ωστόσο, η ενδοκυτταρική δράση του mGR παραμένει ακόμα άγνωστη.



Εικόνα 18. Η γενωμική και η μη γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών.

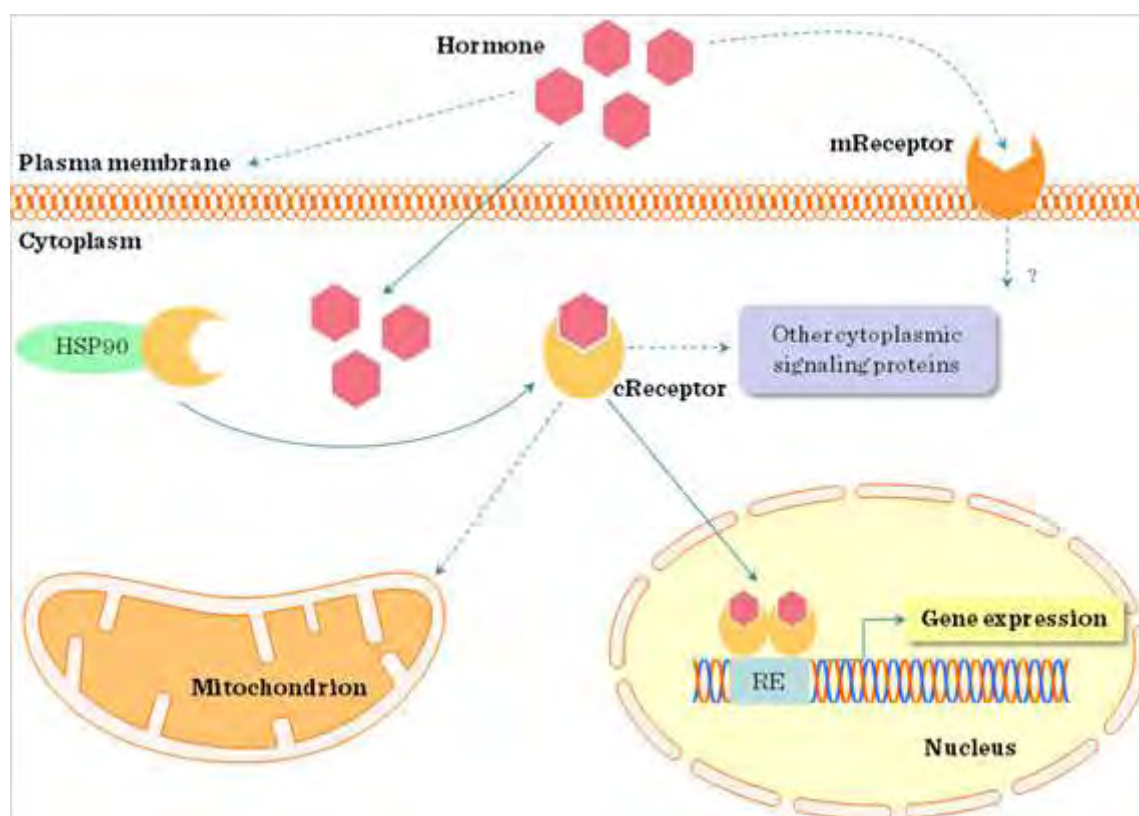
Δράση GR μέσω μιτοχονδρίων

Μετά την πρόσδεση της ορμόνης ο GR μπορεί να μετατοπιστεί απευθείας στα μιτοχόνδρια σε λεμφοειδή ή μη λεμφοειδή κύτταρα, όπου μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για την σηματοδότηση του καταρράκτη της απόπτωσης. Η μιτοχονδριακή μετατόπιση του GR πιθανόν να συσχετίζεται με την απόπτωση που επάγουν τα γλυκοκορτικοειδή σε πολλούς τύπους κυττάρων. Όσον αφορά τα θυμοκύτταρα CD4+ CD8+ παρατηρείται στις πλείστες των περιπτώσεων η μιτοχονδριακή μετατόπιση του GR παρά η πυρηνική μετατόπισή του και αυτό μπορεί να εμπλέκεται και στο γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα υπόκεινται στην αποπτωτική δράση των GCs. Στα μιτοχόνδρια ο GR μπορεί να δρα μέσω ποικίλων μηχανισμών, οι οποίοι είναι οι εξής:

- Δρα ως μεταγραφικός παράγοντας των μιτοχονδρίων.
- Αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στα μιτοχόνδρια.
- Αλληλεπιδρά με προ- ή αντι- αποπτωτικές πρωτεΐνες (π.χ. της οικογένειας Bcl-2).

- ο Μειώνει το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Συμπερασματικά, διακρίνονται τρεις κύριοι μηχανισμοί δράσης του GR. Το μονοπάτι που θα ακολουθήσει εξαρτάται από το ερέθισμα, δηλαδή από την ορμόνη που θα τον ενεργοποιήσει. Ο πρώτος είναι ο γενωμικός τρόπος δράσης, ο οποίος περιλαμβάνει τον GR στο κυττосόλιο, οι 2 εναπομείναντες τρόποι δράσης αποτελούν μη γενωμική δράση του GR. Ο ένας μηχανισμός συμπεριλαμβάνει τον υποδοχέα GR που εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ ο άλλος περιλαμβάνει έναν άλλο τύπο μεμβρανικού GR [Irma B Mitre-Aguilar et al., 2015].



Εικόνα 19. Η ορμόνη (γλυκοκορτικοειδή) προσδένεται στον αντίστοιχο υποδοχέα της (GR) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Όταν προσδένονται στον GR που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, τότε αυτός αποδεσμεύεται από τα μόρια συνοδούς (Hsp90). Ακολουθούν γενωμικές ή μη γενωμικές διεργασίες, καθώς τα GCs μπορεί να έχουν και επίδραση στις λειτουργικές μιτοχονδριακές διεργασίες.

1.3.3 Διάφορες ισομορφές του GR και η αποπτωτική τους δράση

Σε προηγούμενη ενότητα τέθηκε το ερώτημα πως γίνεται τα γλυκοκορτικοειδή να προκαλούν ιστοειδική απόπτωση. Αν και το γεγονός αυτό μπορεί να προκύπτει από την ιστο-

ειδική διαθεσιμότητα του προσδέτη και των συμπαραγόντων του, πρόσφατα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η έκφραση ισομορφών του GR σε συγκεκριμένους ιστούς μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ιστοειδική απόκριση των γλυκοκορτικοειδών.

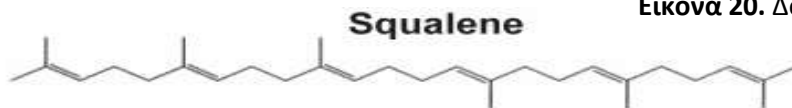
Οι κυριότερες ισομορφές του GR είναι ο GRα και ο GRβ, οι οποίες προέρχονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος. Η ισομορφή GRα εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην πλειοψηφία των ιστών. Η συγκεκριμένη ισομορφή είναι η μεγαλύτερη, καθώς οι υπόλοιπες 7 ισομορφές έχουν μικρότερο αμινοτελικό άκρο. Το 2007 διεξήχθη μελέτη όπου σε κύτταρα U-2 OS, ανθρώπινα οστεοβλαστικά κύτταρα σαρκώματος τα οποία στερούνται τον ενδογενή GR, έγινε έκφραση άγριου τύπου ισομορφής GRα και έδειξε ότι αυτές οι ισομορφές GRα ρυθμίζουν ειδικά το γένωμα. Κυρίως, φάνηκε ότι οι ισομορφές GRα έχουν χαρακτηριστικές δυνατότητες να επάγουν απόπτωση, παρά το γεγονός ότι είχαν ίδιες περιοχές πρόσδεσης DNA και του προσδέτη. Η μοριακή βάση για αυτές τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των ισομορφών GR έδειξε να συμπεριλαμβάνει ειδικούς συνεργοποιητές και τροποποίηση της χρωματίνης σε προαποπτωτικά γονίδια. Επιπλέον, η ικανότητα καταστολής της δράσης του NF-κΒ ήταν διαφορετική ανάμεσα στις 8 ισομορφές [Lu NZ et al., 2007].

1.4 Τριτερπενοειδείς ενώσεις

1.4.1 Γενικές πληροφορίες

Τα τριτερπένια αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που υπάρχουν στην επίγεια (μήλα, ελιές, γκι, λεβάντα, ρίγανη, κ.α.) και θαλάσσια χλωρίδα (θαλάσσια φύκη) και πανίδα. Η διατήρησή τους, κυρίως στο φυτικό βασίλειο, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τόσο εξελικτικά όσο και λειτουργικά [Bhatti HN, 2014].

Πρόκειται για ολιγομερείς μεταβολίτες του πυροφωσφορικού ισοπεντενυλίου, αποτελούμενους από έξι μονάδες ισοπρενίου (C_6H_8), και αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα φυτικών χημικών. Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν πάνω από 20,000 τριτερπενοειδή στο φυσικό περιβάλλον [Liby KT et al., 2007]. Οι σκελετοί του άνθρακα κυκλοποιούνται από την οικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου, η οποία είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στα φυτά. Οι κυκλάσες αυτές μετατρέπουν το οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες κυκλικές αλκοόλες τριτερπενίου με έως και έξι καρβοκυκλικούς δακτυλίους. Το απλούστερο τριτερπένιο βάση του οποίου σχηματίζονται τα απλούστερα τριτερπενοειδή είναι το



σκουαλένιο (C₃₀).

Βάση του σκουαλενίου, προκύπτει μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων, αποτελούμενη από περισσότερα από 20.000 γνωστά μέλη [Petronelli A, 2009; Γαλάτης Β., 2009; Phillips DR, 2006; Yan XJ, 2014]. Η πιο πλούσια πηγή σκουαλενίου είναι το λάδι που προέρχεται από το συκώτι καρχαρία, καθώς έχει περιεκτικότητα 40%. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ανθρώπινο σώμα παράγει περίπου 1,5gr την μέρα [Liu GC et al., 1976]

1.4.2 Βιολογική δράση τριτερπενείων

Αν και για πολλά χρόνια θεωρούσαν ότι τα μόρια αυτά δεν έχουν σημαντική βιολογική δράση, πλέον υπάρχουν απτές αποδείξεις για το ευρύ φάσμα των φαρμακευτικών δράσεών τους. Τα τριτερπενοειδή χρησιμοποιούνται σε πολλές ασιατικές χώρες ως φάρμακα αντικαρκινικά, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά, αναλγητικά, αντικά, αντιμυκητιακά, ανοσορρυθμιστικά και με ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες [Sultana N & Ata A., 2008].

Ένας αυξανόμενος αριθμός τριτερπενοειδών παρατηρείται να έχει κυτταροτοξικές ιδιότητες απέναντι σε καρκινικά κύτταρα, χωρίς να ασκούν την τοξικότητά τους στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού [Petronelli A, et al., 2009]. Το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην τροποποίησή τους με τη βοήθεια χημικών και βιοτεχνολογικών τεχνικών έτσι ώστε να ενισχυθεί η δράση τους. Κάποια από τα τροποποιημένα τριτερπένια θεωρούνται ισχυρά εν δυνάμει αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά φάρμακα [Liby KT. et al., 2007]. Η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα πολλών τριτερπενείων υπόκειται σε αξιολόγηση στην φάση I [Petronelli A. et al., 2009].

Δεν έχει βρεθεί ο κύριος μηχανισμός της αποπτωτικής δράσης των τριτερπενοειδών, ωστόσο στην παγκόσμια βιβλιογραφία έχουν γίνει πολλές μελέτες για να τον κατανοήσουν. Κάθε ουσία δρα διαφορετικά στον οργανισμό. Το τριτερπένιο CDDO-Me εμποδίζει την έκκριση της IL-6, την φωσφορυλίωση της STAT3 και την πυρηνική μετατόπιση της STAT3, δηλαδή διεργασίες που επάγουν την ανάπτυξη όγκων και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [Zhenfeng Duan et al., 2009]. Το συνθετικό τριτερπενοειδές AECHL-1 έχει την ικανότητα να σταματάει τον κυτταρικό κύκλο στην φάση της μίτωσης και να επάγει την απόπτωση, πιθανώς μέσω της αύξησης της p21, η οποία προσδένεται με τις CDK2/CDK4/CDK6 και εμποδίζει έτσι τον κυτταρικό κύκλο [Manish S. Lavhale et al., 2009].

Συμπερασματικά, 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-κΒ
- 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.

1.4.3 Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη

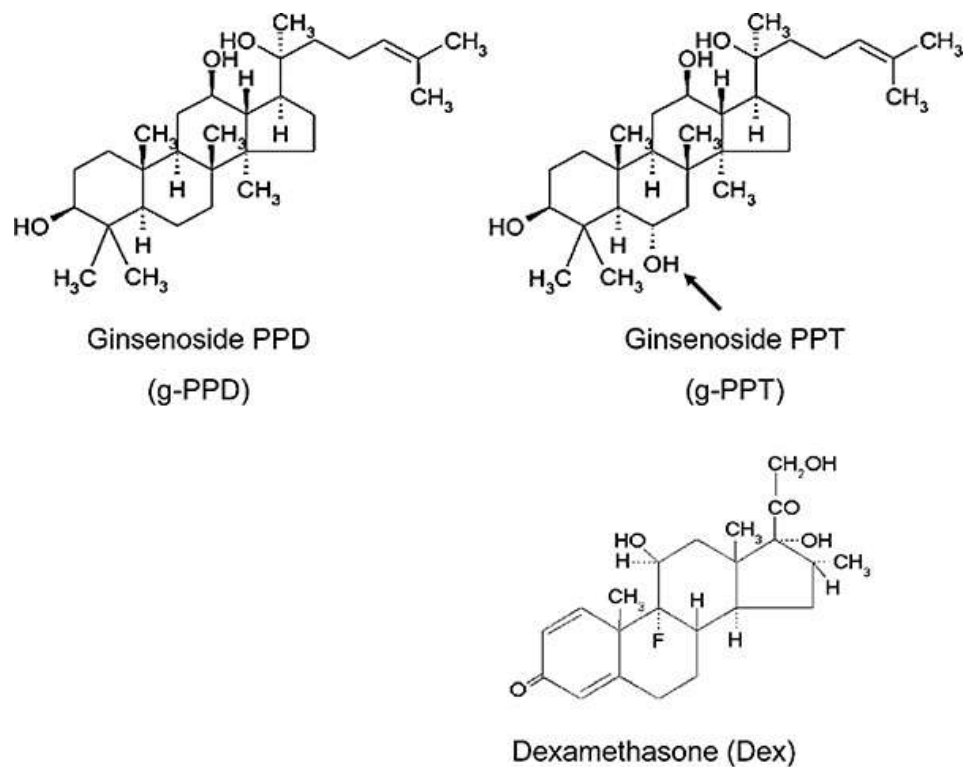
Τα φυσικά προϊόντα που απομονώνονται από τα φυτά παρέχουν μία ποικιλία από χημικά μόρια τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτο ενδιαφέρον, λόγω της βιολογικής τους δράσης. Στην συγκεκριμένη δλωματική εργασία το ενδιαφέρον στρέφεται στις ουσίες πρωτοαναξαδιόλη (PPD) και πρωτοπαναξατριόλη (PPT). Πρόκειται για δύο τριτερπενοειδείς ουσίες που ανήκουν στην οικογένεια των ginseng/ginsenosides. Τα μόρια ginseng χρησιμοποιούνται παγκοσμίως υπό μορφή κάψουλας, σιροπιού, ριζών, καθώς και σε μία ποικιλία τσάι. Ανήκουν στο γένος *Panax*, που στα ελληνικά σημαίνει «πανάκεια» [Lian-Wen Qi. et al., 2011].

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες που υποδεικνύουν την αποπτωτική δράση της πρωτοπαναξαδιόλης. Η PPD σταματάει την ανάπτυξη τουλάχιστον 8 τύπων ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων [JIAN-LI GAO et al., 2013]:

1. Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου (HCT116 and SW480)
2. Κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (MDA-MB-468 and MDA-MB-231)
3. κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη (PC3 and DU145)
4. κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος (MG63 and 143B)

5. κύτταρα HEK-293

Επιπλέον, η PPD επάγει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στην φάση G0-G1 σε κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος SMMC7721 [Ming YL et al., 2007] και στην φάση G1 σε μονοκυτταρικά λευχαιμικά κύτταρα U937 [Kang KA. et al., 2005]. Γι' αυτό το λόγο θελήσαμε να διερευνήσουμε την αποπτωτική της δράση μέσω ενεργοποίησης του GR σε κύτταρα HeLa και HepG2.



Εικόνα 21. Στην εικόνα παρατηρούμε την δομή της πρωτοπαναξαδιόλης (g-PPD), της πρωτοπαναξατριόλης (g-PPT), καθώς και την δομή της δεξαμεθαζόνης, ενός τεχνητού γλυκοκορτικοειδούς. Μπορούμε να διακρίνουμε ότι οι δομές των μορίων παρουσιάζουν μία εμφανή ομοιότητα, ο κύριος σκελετός είναι ίδιος.

2. Σκοπός

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για την θεραπεία πολλών ασθενειών λόγω της πολύπλευρης δράσης τους. Ωστόσο, η θετική τους δράση συνοδεύεται από ανεπιθύμητες και επιβλαβείς δράσεις για τον οργανισμό, όπως είναι η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης, ο καταβολισμός των πρωτεϊνών και η οστεοπόρωση. Δεδομένων των δομικών ομοιοτήτων που παρατηρούνται μεταξύ των τριτερπενοειδών ουσιών, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη, με τα γλυκοκορτικοειδή, των προβλημάτων που έχουν παρουσιαστεί σε ασθενείς μετά την θεραπεία με GCs και της ανάγκης εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs) αποτελεσματικών στον ίδιο βαθμό με τα γλυκοκορτικοειδή, όσον αφορά την αντικαρκινική τους δράση, αποφασίστηκε να εξεταστεί κατά πόσο οι ουσίες πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη έχουν αντικαρκινική δράση, σε συσχέτιση με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, τη δεξαμεθαζόνη.

3. Υλικά & Μέθοδοι

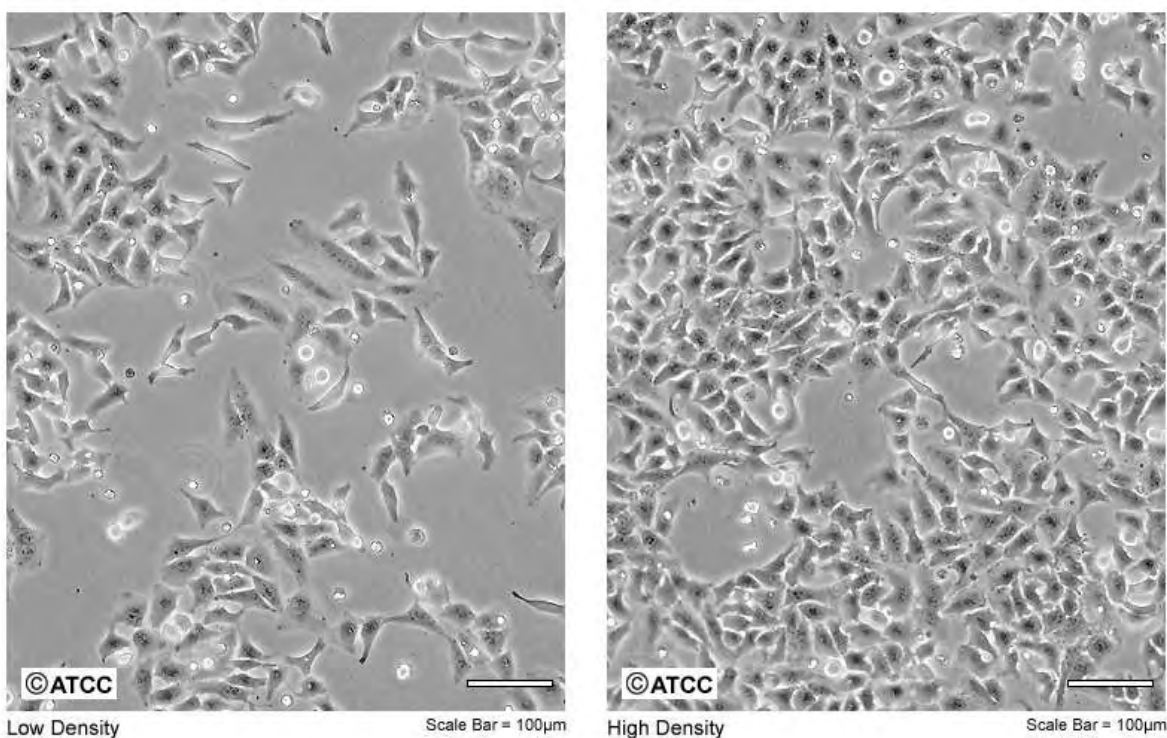
Προκειμένου να εξεταστεί η συνεισφορά των τριτερπενοειδών ουσιών, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη, στην ενεργοποίηση και πυρηνική μετατόπιση του GR, καθώς και στην προκαλούμενη από τον υποδοχέα απόπτωση μέσω των μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοϊστοχημείας και αναλύσεις στυπώματος κατά Western Blot σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές HeLa και HepG2.

3.1 Καρκινικές κυτταρικές σειρές HeLa & HepG2

Αρωγός στις προσπάθειες κατανόησης των βιοχημικών μηχανισμών εξέλιξης διαφόρων ασθενειών είναι οι συνεχείς κυτταρικές σειρές. Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές αποτελούν κύτταρα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται επ' άοριστον όταν καλλιεργούνται κάτω υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Τις περισσότερες φορές, αυτό αποτελεί ένα σπάνιο γεγονός, αφού η πλειοψηφία των κυττάρων, ακόμη και αυτά που βρίσκονται σε έναν καρκινικό ιστό, σταματά να πολλαπλασιάζεται μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Ωστόσο, μία συνεχής κυτταρική σειρά μπορεί να υποστεί ανακαλλιέργεια άπειρες φορές, χωρίς να χάσει κάποια ιδιότητα του κυτταρικού τύπου ή του ιστού απ' όπου προέρχεται. Το γεγονός αυτό, καθιστά τις συνεχείς κυτταρικές σειρές ένα εξαιρετικό σύστημα μελέτης διαφόρων κυτταρικών διεργασιών [Capes-Davis A, 2010]. Γενικά, οι κυτταρικές σειρές προκύπτουν μετά από ασηπτική αφαίρεση κυττάρων τμημάτων του υπό μελέτη ιστού, διαχωρισμό των κυττάρων με ενζυμική κατεργασία του ιστού, για την καταστροφή του διακυτταρικού πλέγματος, και τέλος επίχριση του προκύπτοντος εναιωρήματος σε μία επίπεδη επιφάνεια, όπως είναι ο πυθμένας μίας φιάλης ή ένα τρυβλίο Petri. Η προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα μίας φιάλης ή σε ένα τρυβλίο στηρίζεται στην ύπαρξη γλυκοπρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων μέσα στο κυτταρικό εναιώρημα [Madigan T. Michael, 2007].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όλα τα πειράματα που θα περιγραφούν στη συνέχεια αυτής της ενότητας πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Η σειρά αυτή αποτελείται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας κι απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1951 από τον George Otto Gey , γνωστό ερευνητή της Ιατρικής Σχολής του John Hopkins. Ονομάστηκαν HeLa από τα αρχικά του ονόματος της ασθενούς από την οποία απομονώθηκαν, την 31-ετών Henrietta Lacks.

Εικόνα 22. Κύτταρα HeLa

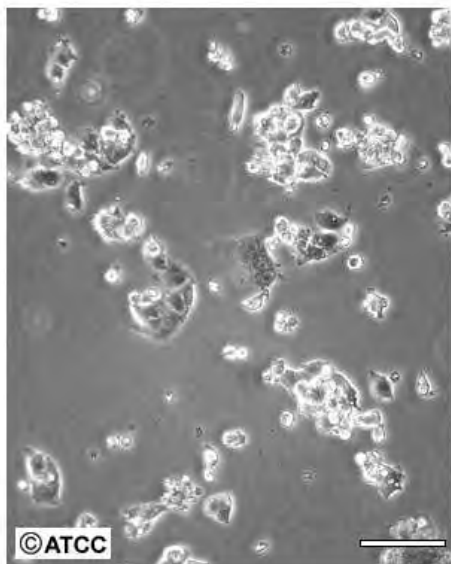


Όλα ξεκίνησαν μετά την παρατήρηση του Gey πως σε αντίθεση με άλλα καρκινικά κύτταρα που βρίσκονταν σε καλλιέργεια και πέθαιναν μετά από συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, τα κύτταρα της Henrietta's συνέχιζαν να μεγαλώνουν και μάλιστα με πολύ γρήγορο ρυθμό. Έτσι, ο ερευνητής απομόνωσε ένα και μόνο κύτταρο από το οποίο και προέκυψε ολόκληρη η κυτταρική σειρά. Να αναφερθεί πως τα HeLa αποτελούν την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά που απομονώθηκε κι η καλλιέργεια τους αποτέλεσε αναπόσπαστο κομμάτι κάθε έρευνας που είχε σχέση με τον καρκίνο παγκοσμίως [Carson SD, 2013; O'Brien SJ, 2001; Callaway, 2013; Callaway, 2013b].

Ωστόσο, ένα πιο μικρό ποσοστό των πειραματικών διαδικασιών διεξήχθησαν στην ανθρώπινη ηπατική καρκινική σειρά HepG2. Τα κύτταρα HepG2 αποτελούν μία καθαρή καρκινική κυτταρική σειρά, απομονωμένη από ανθρώπινο ηπατικό καρκίνωμα. Απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον ηπατικό ιστό ενός 15χρονου καυκάσιου Αμερικανού με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα HepG2 είναι επιθηλιακά στη μορφολογία τους κι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους είναι 55. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα κατά του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, μιας θανατηφόρας ασθένειας που μαστίζει εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως. Σε γενικές γραμμές, το προφίλ της γονιδιακής

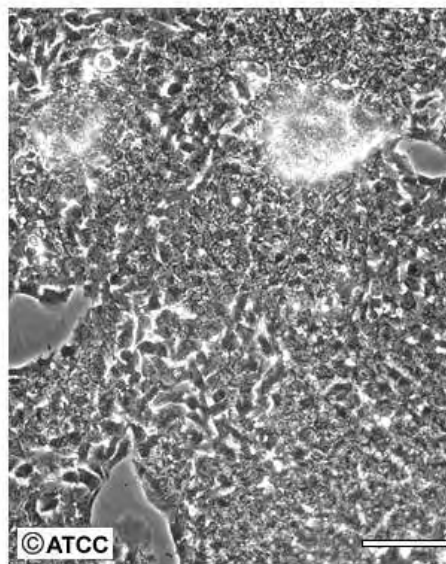
τους έκφρασης αποτελεί για πολλά εργαστήρια καλό δείκτη στα πλαίσια προσυμπτωματικών ελέγχων [Costantini S, 2013].

Εικόνα 23. Κύτταρα HepG2



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

3.2 Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

Πριν ξεκινήσει η περιγραφή των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, να αναφερθεί πως η HeLa κυτταρική σειρά με την οποία εκπονήθηκαν τα περισσότερα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω ήταν ευγενική χορηγία του ΕΙΕ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών). Επιπλέον, όσον αφορά το πρακτικό τμήμα των κυτταροκαλλιιεργειών, αξίζει να τονιστούν τα εξής:

- ✓ Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εκπονούνται μέσα στον απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ψεκάζεται με 70% EtOH πριν εισαχθεί στον απαγωγό.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιιεργειες ανοίγει και κλείνει αυστηρά μέσα στον απαγωγό

- ✓ ΠΑΝΤΑ αφού λήξει η εργασία στον απαγωγό, εφαρμόζεται UV ακτινοβολία για 30min για εσωτερικό καθαρισμό του χώρου. Συνίσταται έλεγχος καθαρότητας και πριν την έναρξη της εργασίας στον απαγωγό.

3.2.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C ή σε υγρό άζωτο μέσα σε ειδικά φιαλίδια, τα cryovials. Η απόψυξή τους λαμβάνει χώρα στο υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37°C , κι αφού ξεπαγώσει το εσωτερικό του vial, εισάγεται στο εσωτερικό του απαγωγού, όπου και ανοίγεται το vial. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το εσωτερικό του vial σε ένα πλαστικό σωλήνα τύπου falcon μαζί με περίπου 10ml θρεπτικού κι όλο μαζί φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε RT ($19-25^{\circ}\text{C}$). Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης, υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη ($4,5\text{mg/ml}$) εμπλουτισμένου με 1% v/v 200mM-L-γλουταμίνη (L-Glut), 1% v/v πενικιλίνης/στρεπταμυκίνης (P/S) και 10%v/v FBS. Η ποσότητα του θρεπτικού που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την επαναδιαλυτοποίηση εξαρτάται από τη φλάσκα που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια. Ειδικότερα, για T25 (φλάσκα επιφάνειας 25cm^2) χρησιμοποιούνται 5ml DMEM, ενώ για T75 (φλάσκα επιφάνειας 75cm^2) χρησιμοποιούνται 15ml DMEM. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται για ανάπτυξη στον επωαστήρα, όπου επικρατούν οι εξής συνθήκες: $\theta=37^{\circ}\text{C}$ και συνθήκες υγρασίας 5% CO_2 , κι αφήνονται εκεί μέχρι η πληρότητα της φλάσκας (confluency) να φτάσει το 80-85%. Το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να φτάσουν τα κύτταρα σε αυτό το ποσοστό πληρότητας διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών, κι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι ο αριθμός των περασμάτων που έχει υποστεί η χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, καθώς επίσης και από το πόσο καλά έχει χειριστεί τα συγκεκριμένα κύτταρα ο χρήστης. Σε κάθε περίπτωση, συνίσταται τακτική παρακολούθηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης), ούτως ώστε να αποφευχθεί πληρότητα μεγαλύτερη του 90%. Σε περίπτωση που συμβεί κάτι τέτοιο κάποια από τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση stress, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αλλοιώσεις σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Με άλλα λόγια, παύουν πλέον να είναι αξιόπιστα για την διεξαγωγή πειραμάτων και συνίσταται η απόρριψή τους. Τέλος, να τονιστεί πως σε περίπτωση που δεν έχει παρατηρηθεί το επιθυμητό confluency μέσα σε περίπου 48h

συνοδευόμενη ή μη από χρωματική αλλαγή στο θρεπτικό μέσο συνίσταται αλλαγή του θρεπτικού μέσου.



Εικόνα 24. Cryovial.

3.2.2 Θρυψινοποίηση των κυττάρων

Μόλις το ποσοστό πληρότητας της φλάσκας αγγίξει περίπου το 80% πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με χρήση διαλύματος πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την επιφάνεια της φλάσκας και προστίθεται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,25% κι αφήνεται να δράσει στον επωαστήρα. Να αναφερθεί πως η ποσότητα της θρυψίνης που θα προστεθεί πρέπει να είναι τόση ώστε να διαβρέχει το εσωτερικό της φλάσκας, ενώ το χρονικό διάστημα επώασης της με τα κύτταρα εξαρτάται από το πόσο γρήγορα θα παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας. Γι αυτό τον λόγο, τα κύτταρα ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο στάδιο αυτό, καθώς επώαση της θρυψίνης με τα κύτταρα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, στρεσάρει τα κύτταρα και στην χειρότερη περίπτωση προκαλεί καταστροφή τους. Αμέσως μόλις παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων, προστίθεται τετραπλάσια (4x) ποσότητα θρεπτικού, προκειμένου να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη. Η αδρανοποίηση αυτή γίνεται μέσω αλλαγής του pH της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα μέσα στη φλάσκα. Ακολουθεί σχολαστική επαναιώρηση των κυττάρων έτσι ώστε να σπάσουν συσσωματώματα κυττάρων που πιθανότατα έχουν δημιουργηθεί, ενώ ταυτόχρονα διαβρέχεται καλά και η επιφάνεια της φλάσκας προκειμένου να αποκολληθούν τυχόν εναπομείναντα πάνω σε αυτήν κύτταρα. Στη συνέχεια, μεταφέρεται το εσωτερικό της φλάσκας σε σωλήνα τύπου falcon για 5 min στα 1000rpm σε RT (19-25°C). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος στο μέσο καλλιέργειας (DMEM). Και σε αυτήν την περίπτωση η ποσότητα του θρεπτικού που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται τόσο από τη φλάσκα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα όσο και από το σκοπό που γίνεται η ανακαλλιέργεια. Σε

περίπτωση που έχει προγραμματιστεί κάποιο πείραμα σε άμεσο χρονικό διάστημα, επιστρέφεται μεγάλη ποσότητα αρχικής καλλιέργειας και συμπληρώνεται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Αντίθετα, όταν σκοπός είναι απλά η διατήρηση της καλλιέργειας, επιστρέφεται πολύ μικρή ποσότητα για ανακαλλιέργεια και συμπληρώνεται με κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Αυτό γίνεται επειδή σε γενικές γραμμές τα κύτταρα ταλαιπωρούνται με τη θρυψινοποίηση, οπότε και αποφεύγεται όταν δεν συντρέχει λόγος. Μετά από κάθε θρυψινοποίηση σημειώνεται στην επιφάνεια της φλάσκας το νέο πέρασμα (+1 από το προηγούμενο πέρασμα) καθώς και η ημερομηνία διεξαγωγής της θρυψινοποίησης.

3.2.3 Πάγωμα των κυττάρων

Μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις γίνεται συνήθως πάγωμα κάποιων κυττάρων, έτσι ώστε να υπάρχουν μελλοντικά διαθέσιμα stock στους -80°C . Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση που πραγματοποιείται στη θρυψινοποίηση, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλη ποσότητα FBS. Η ποσότητα που θα επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα αυτό εξαρτάται από τον αριθμό των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουν, και καθορίζεται από τον λόγο $\text{FBS/DMSO} = 9/1$. Με άλλα λόγια, σε κάθε κυτταρικό προστίθενται 0,9ml διαλύματος FBS μαζί με κύτταρα και 0,1ml DMSO (SIGMA). Αμέσως μόλις γίνει η προσθήκη του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (DMSO), γίνεται γρήγορη ανακίνηση και μεταφορά-αποθήκευση στους -80°C .

3.2.4 Μέτρηση & Στρώσιμο κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Αρχικά, γίνεται θρυψινοποίηση των κυττάρων όπως περιγράφεται και παραπάνω. Αμέσως μόλις επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση, μεταφέρεται μία πολλή μικρή ποσότητα κυττάρων σε ένα erpendorf απ' όπου γίνεται λήψη 10μl πιπέτα και μεταφορά στην πλάκα Neubauer. Στο στάδιο αυτό δίνεται προσοχή στην καλή ανακίνηση του περιεχομένου του erpendorf, καθώς τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν, και η ποσότητα των 10μl που θα ληφθεί πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική. Τα 10μl κυττάρων μεταφέρονται στη μία πλευρά της πλάκας, όπου και γίνεται 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 όπως γίνεται κατανοητό γίνεται αναγωγή στο 1ml. Κατόπιν, γίνεται υπολογισμός ο όγκος του εναιωρήματος των κυττάρων λαμβάνοντας υπόψη

τον αριθμό των wells που χρειάζονται για το πείραμα. 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 1000 rpm 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 για να γίνουν κατανοητά 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 5000cells/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 cis προέκυψε μετά από κατεργασία του FBS με ενεργό άνθρακα. Η κατεργασία αυτή αποσκοπούσε στην απενεργοποίηση του FBS και έγινε με βάση αναφορά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Γενικά ο ενεργός άνθρακας προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια, μπορώντας με αυτόν τον τρόπο να αφαιρεί ορμόνες ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα τους από το FBS. Η αφαίρεση των ορμονών αυτών είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη.

3.3 Ανοσοϊστοχημεία

Με τη βοήθεια της μεθόδου αυτής, γίνεται ανίχνευση βιολογικών μορίων μέσα σε μία κυτταρική καλλιέργεια. Βασίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση του αντιγόνου με το αντίστοιχο αντίσωμα και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος. Το συγκεκριμένο πείραμα εκπονήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία έτσι ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο τα υπό εξέταση ουσίες μπορούν να επάγουν μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Οι ουσίες που εξετάστηκαν δίνονται με τις συντομογραφίες τους στον παρακάτω Πίνακα .

TFC039 (PPD)
TFC040 (PPT)
PCUPO3
PCUPO4
PCUPO5
PCUPO6
PCUPO7
PCUPO9
PCUPO10
PCUPO12
PCUPO13
PCUPO15
PCUPO16
PCUPO17
PCUPO18
PCUPO19
PCUPO20
PCUPO21
PCUPO22
PCUPO23
PCUPO24
PCUPO25
PCUPO26
PCUPO27
PCUPO28

Αρχικά, σε δύο 24 well-plate τοποθετήθηκαν 29 καλυπτρίδες (coverslips), σε 29 πηγαδάκια (1 coverslip/well). Ακολούθησε αποστείρωση των wells με 2 πλύσεις με 70% EtOH (χημική απολύμανση) και ακολούθησε έκθεση του plate σε UVακτινοβολία για 30min (αποστείρωση με ακτινοβολία). Μετά το πέρας των 30min, το plate τοποθετήθηκε κλειστό στον κλίβανο μέχρι τη στιγμή της χρησιμοποίησής του.

Πειραματική διαδικασία

Day 0: Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και μέτρηση των κυττάρων. Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν 13.000cells/well. Άρα $13.000\text{cells} \times 29\text{wells}=377.000\text{cells}$.

Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε DMEM cis(0.5ml/well), κι ακολούθησε διανομή στα πηγαδάκια στα οποία έχουν προηγουμένως προστεθεί οι καλυπτρίδες. Τα plates τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για επώαση.

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

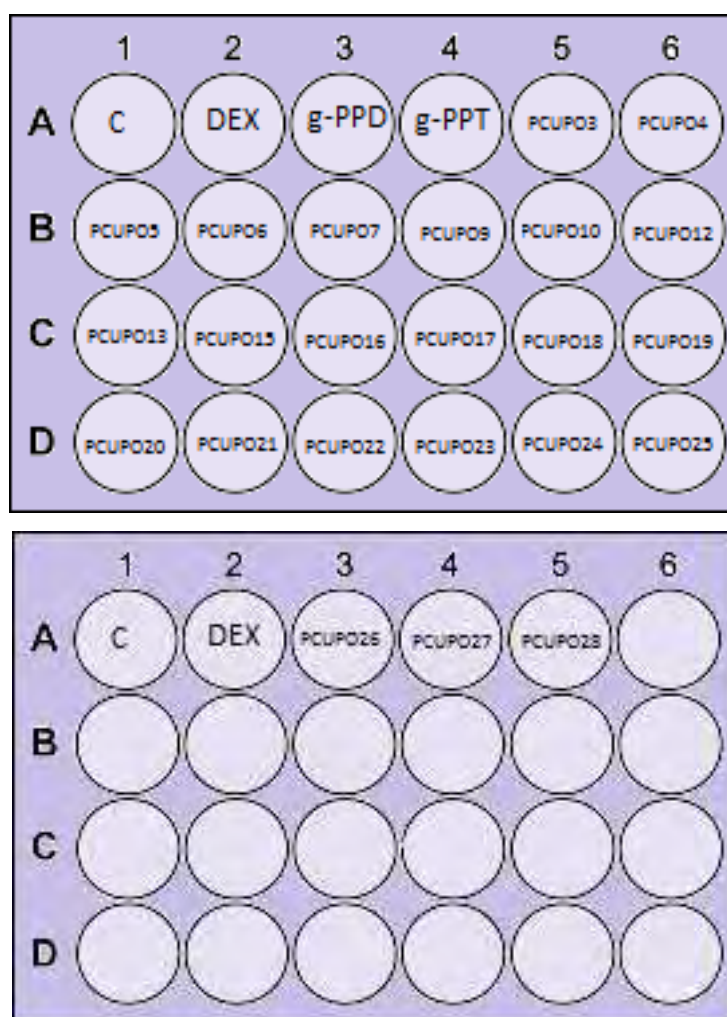
Mix: 3.5 ml DMEM cis + 0.7μl CMX 200nM (1:5.000)

Control: 300μl Mix + 0.3μl EtOH 100% + 0.3μl DMSO

Dex: 300μl Mix + 0.3μl DEX 10-3M + 0.3μl DMSO

Δείγματα με ουσίες: 300μl Mix + 0.3μl EtOH 100% + 0.3μl υπό εξέταση ουσία

Το θρεπτικό που υπάρχει μέσα στα wells απομακρύνεται και αντικαθίσταται από 300μl κάθε δείγματος. Ακολούθησε τοποθέτηση του plate στον επωαστήρα, κι επώαση των κυττάρων με τις ουσίες για 2h.



Εικόνα 25: Τα 24well-plates μετά την προσθήκη των δειγμάτων.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να δοθούν κάποιες διευκρινήσεις για τη σύσταση των δειγμάτων. Ξεκινώντας από το DEX, να αναφερθεί πως είναι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη, για την οποία και είναι γνωστό πως προσδένεται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και προκαλεί την μετατόπιση του στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τελικά την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων στόχων των γλυκοκορτικοειδών [Haridas V et al., 2011]. Πρακτικά, η DEX είναι διαλυμένη σε EtOH100% και αποθηκεύεται στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM. Στα πειράματα, χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1μM. Συνεχίζοντας, οι ουσίες που μελετήθηκαν είναι διαλυμένες σε DMSO και φυλάσσονται στους -20°C σε συγκέντρωση 10mM και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 10μM. Όσον αφορά το CMXROS (CMX) αποτελεί ζωτική χρωστική, η οποία ενσωματώνεται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Η χρήση της σε μικρότερη αραιώση ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από το ενδεδειγμένο (στην προκειμένη περίπτωση 2h) μπορεί να αποβεί καταστροφική για τα κύτταρα. Το CMX αποθηκεύεται στους -20°C σε συγκέντρωση 1mM και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 200nM. Μόλις πέρασε το διάστημα των 2h, το plate απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα (incubator). Πλέον, η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται στον πάγκο του εργαστηρίου, όπου και εφαρμόζεται το πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων.

Αρχικά, γίνεται αφαίρεση των ουσιών από τα πηγαδάκια. Ακολουθούν 2 πλύσεις με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1x (450ml ddH₂O + 50ml PBS 10x), προσθήκη μεθανόλης για 20min και ψύξη 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 1x. Η πλύση αυτή διαρκεί 1h και κατά τη διάρκεια της το plate τοποθετείται στους 4°C . Μετά το πέρας της 1h, γίνονται 2 επιπλέον πλύσεις με PBS 1x. Με άλλα λόγια, μετά την προσθήκη ακετόνης γίνονται 3 πλύσεις με PBS 1x. Τα βήματα αυτά αποσκοπούν στην 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. Μόλις γίνει η τελευταία πλύση με PBS 1x, γίνεται απομάκρυνση των καλυπτρίδων από τα πηγαδάκια και τοποθέτηση τους στο δικτυωτό. Στο σημείο αυτό, μπαίνει και το 1^ο αντίσωμα, 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 25-30μl αντισώματος. Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1h.

Μετά το πέρας της 1h, οι καλυπτρίδες επανατοποθετούνται στο plate και γίνονται 2 πλύσεις με PBS 1x, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Για τον ίδιο λόγο πριν την μεταφορά τους πίσω στα πηγαδάκια, γίνεται απομάκρυνση της περιόδου του αντισώματος πάνω σε χαρτί. Στο σημείο αυτό, γίνεται προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος το οποίο αποτελείται από:

1. 500μl PBST
2. 1μl χρωστικής Hoechst 33342 10 mg/ml, σε αραιώση 1/1000. Η χρωστική αυτή χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων.
3. 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 2ο αντίσωμα διήρκεσε 1h, σε RT απουσία φωτός. Μετά το πέρας της 1h, τα coverslips επανατοποθετούνται στο plate, δίνοντας πάντα την ανάλογη προσοχή, και γίνονται 2 πλύσεις με PBS 1x. Στη συνέχεια, τα coverslips τοποθετούνται σε ένα πλακάκι μικροσκοπίου στο οποίο και έχει τοποθετηθεί διάλυμα PVA, και μονιμοποιούνται. Ακολουθεί η τοποθέτησή τους σε ειδική κασετίνα, και φυλάσσονται στους 4°C απουσία φωτός.

Τέλος, αμέσως μόλις στεγνώσει το PVA, είναι δυνατή η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού και 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.

1.2 Western- Blot Analysis

1.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι οι μόνες ουσίες που παρουσίασαν ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη ήταν οι g-PPD και g-PPT, γι αυτό το λόγο συνεχίσαμε στην διεξαγωγή των πειραμάτων μόνο με αυτές τις δύο.

Day 0: Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και μέτρηση κυττάρων HeLa και HepG2. Έγινε στρώσιμο κυττάρων σε δύο 6wells-plates, όπου προστέθηκαν 150.000cells/well. Άρα, χρειάστηκαν $150.000 \times 12 = 1.800.000$ cells, τα οποία ήταν διαλυτοποιημένα σε DMEM cis (2ml/well). Τα κύτταρα αυτά θα αποτελέσουν πηγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για την ανοσοαποτύπωση Western.

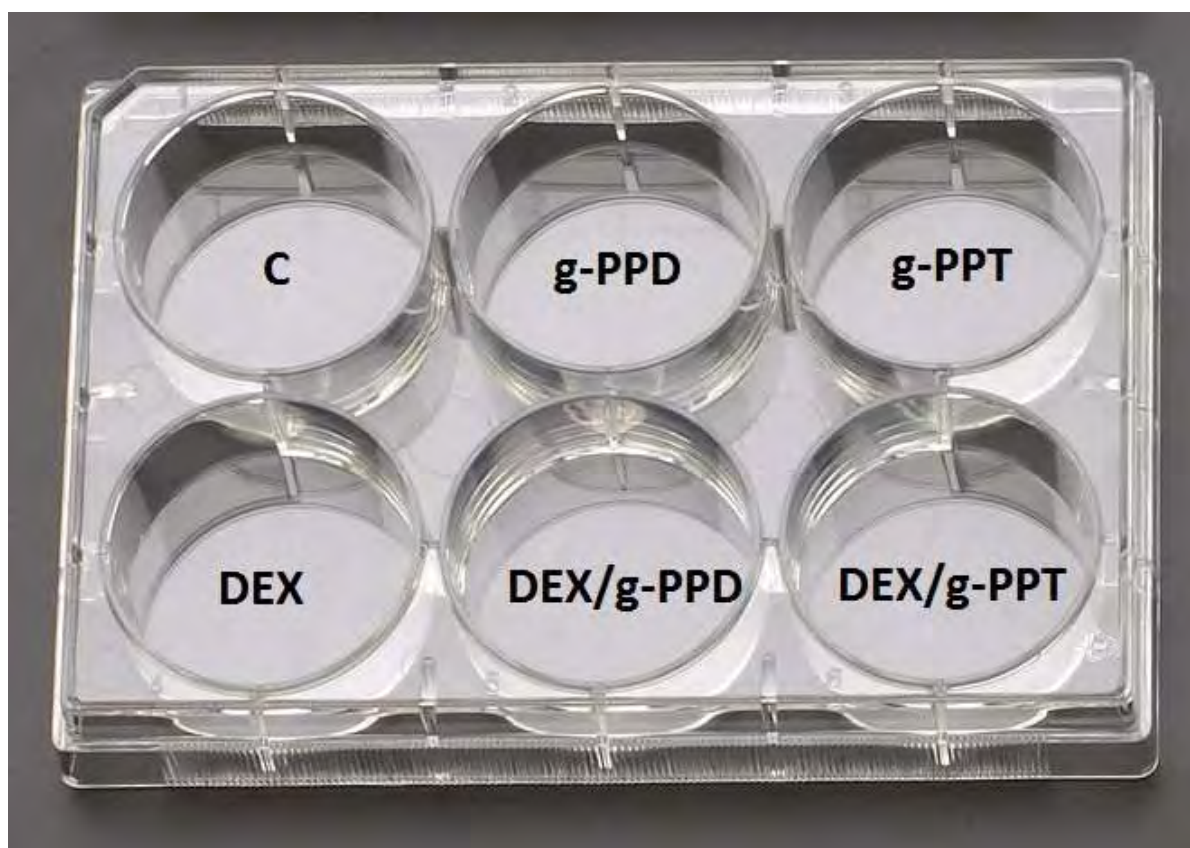
Day 3: Αφαίρεση DMEM cis και προσθήκη των υπό εξέταση ουσιών στα wells. Η σύσταση των ουσιών δίνεται παρακάτω, κι όπως ήταν αναμενόμενο κινείται σε παρόμοια πλαίσια με

αυτή των δειγμάτων της ανοσοϊστοχημείας. Μοναδική διαφορά, εκτός από τις ποσότητες, είναι η απουσία CMX.

Control: 1.9ml DMEM cis +1.9μl DMSO + 1.9μl EtOH 100%

DEX: 1.9ml DMEM cis +1.9μl DMSO + 1.9μl DEX 10⁻³ M

Δείγματα με ουσίες: 1.9ml DMEM cis +1.9μl υπό εξέταση BA + 1.9μl EtOH 100%



Εικόνα 26. Δύο 6 well-plate, το ένα περιέχει κύτταρα HeLa και το άλλο κύτταρα HepG2.

Τα δύο 6 wells-plates με τα κύτταρα και τις ουσίες πλέον, τοποθετούνται στον επωαστήρα στις προκαθορισμένες πάντα συνθήκες των 37°C και 5% CO₂ για 48-72h. 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

Αρχικά γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού από τα πηγαδάκια και μία πλύση με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1× (1ml/well). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το PBS 1× από τα wells και

προστίθεται η ίδια ποσότητα διαλύματος PBS 1x. Με τη χρήση ειδικού scraper (για 1x και 6xwells-plates) γίνεται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα και το εσωτερικό των wells, κι ακολουθεί η μεταφορά του κάθε δείγματος σε αριθμημένο erpendorf του 1.5ml. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα προστίθεται μία επιπλέον ποσότητα, περίπου 250μl PBS 1x, κι επαναλαμβάνεται ότι περιγράφηκε. Το βήμα αυτό, γίνεται προκειμένου να διασφαλιστεί η πλήρης αποκόλληση-συλλογή των κυττάρων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων στα 1.200 rpm για 6min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα που προέκυψε είτε μπορεί να αποθηκευτεί στους -80°C ή διαλυτοποιείται εκείνη τη στιγμή σε Lysis Buffer.

Λύση των κυττάρων

Όπως ήδη αναφέρθηκε 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 Buffer A, το οποίο φυλάσσεται στους 4°C. Στο 1ml του διαλύματος αυτού προστίθενται:

- ✓ 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 γίνεται εμπειρικά κι εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος. Συνήθως προστίθεται ποσότητα των 50-70μl. Τα κύτταρα επωάζονται με το LB για διάστημα 40-60min. Αποφεύγονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, λόγω της ύπαρξης του PMSF στο διάλυμα.

Ομογενοποίηση των κυττάρων

Το βήμα αυτό γίνεται μέσω υπερήχων. Τα κύτταρα υφίστανται 4-6 κύκλους sonication διάρκειας 1 sec στο 40% ATT, με ενδιάμεσα διαστήματα παύσεων διάρκειας 28-30sec.

Ποσοτικοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυτταρικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα παραπάνω στάδια έγινε με τη μέθοδο Bradford, μέσω της οποίας είναι δυνατός ποσοτικός προσδιορισμός δειγμάτων με συγκέντρωση 1-1.500mg/ml. Η μέθοδος αυτή είναι χρωματική και στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων Coomassie Brilliant BlueG-250. Σε όξινο περιβάλλον, η χρωστική αυτή αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, δίνοντας έτσι ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης. Στην κατάσταση αυτή η χρωστική αποκτά τη μπλε ανιονική μορφή της, ενώ το σύμπλοκο που προκύπτει εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα στα 595nm, από τα 365nm που την εμφάνιζε αρχικά. Αύξηση στη τιμή της απορρόφησης στα 595nm υποδεικνύει αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη. Γενικά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford είναι αρκετά αξιόπιστα και εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα, δύο χαρακτηριστικά την οποία την καθιστούν την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο στα περισσότερα εργαστήρια (BradfordMM., 1976).

Αρχικά, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη βάση της οποίας θα γίνει η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Σε όγκο 20μl του εκάστοτε πρότυπου δείγματος προστίθενται 980μl αντιδραστηρίου Bradford (Bio-Rad) τελικής συγκέντρωσης 1x. Ακολουθεί ανάδευση των διαλυμάτων και επώαση τους για 30min στο σκοτάδι σε RT. Μετά το πέρας των 30min, έγινε ανάδευση των δειγμάτων και φωτομέτρηση στα 595nm.

Οι τιμές που προέκυψαν, έδωσαν μία εξίσωση στο καρτεσιανό επίπεδο, όπου στον άξονα τον χ'χ αντιστοιχούν οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και στον γ'γ οι οπτικές απορροφήσεις στα 595nm. Με βάση την εξίσωση αυτή είναι δυνατή η εύρεση της συγκέντρωσης κάθε δείγματος εκφρασμένης σε μg/ml.

Για το κάθε δείγμα, έγινε η εξής διαδικασία: Αρχικά, προστέθηκε 1μl του υπό εξέταση δείγματος στον πάτο ενός αριθμημένου erpendorf και στη συνέχεια στο ίδιο erpendorf προστέθηκε 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1x. Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 20min, σε RT απουσία φωτός. Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 595nm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης και κατ' επέκταση της σύστασης του κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί.

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

2.4.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, οπτικοποίησης και απομόνωσης με εφαρμογές σε ποικίλα επιστημονικά πεδία. Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό του μεγέθους και της καθαρότητας ενός δείγματος, καθώς και για το διαχωρισμό μειγμάτων μορίων, τα οποία δεν είναι δυνατό να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Δείγμα μπορεί να αποτελέσει οποιοδήποτε μόριο το οποίο φέρει φορτίο. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων [Sambrook J, 2000].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται επειδή το υλικό της είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές, σταθερό σε μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών, ιονικής ισχύος και επειδή η παρασκευή της είναι απλή.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή τους.

Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν.

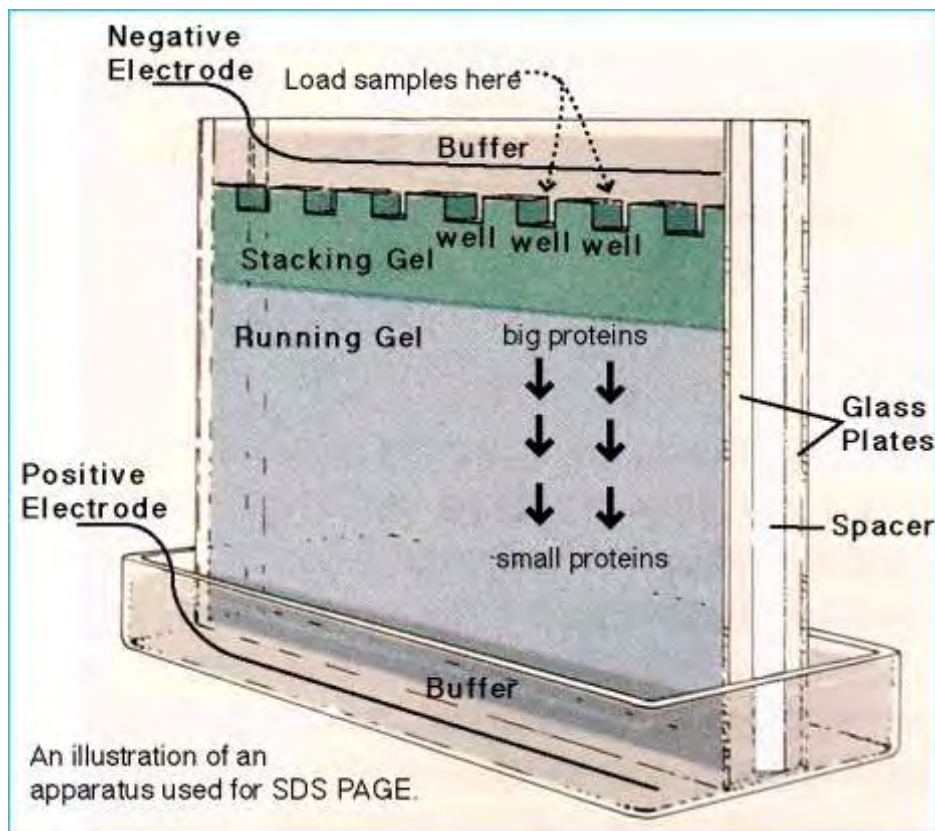
Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι το N,N,N',N'-

τετραμέθυαιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Επομένως, η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί απουσία O₂, αφού το τελευταίο μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (sodium dodecyl sulfate) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης- SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο και έτσι η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας.

Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη ή με θέρμανση στους 100 °C. Τα βήματα αυτά γίνονται έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι αυτή που αναπτύχθηκε από τον Laemmli. Πρόκειται για μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.



Εικόνα 27. Τεχνική SDS-PAGE. Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel).

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 μg πρωτεΐνης ανά ταινία. Εναλλακτικά, η χρώση μπορεί να γίνει με χρώση αργύρου, η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (ικανότητα ανίχνευσης ng πρωτεΐνης). Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, καθώς η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, συγκριτικά με την Coomassie Blue.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν έγινε χρώση της πηκτής αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, καθώς το ζητούμενο δεν ήταν η ταυτοποίηση κάποια πρωτεΐνης αλλά η ανοσοαποτύπωση Western. Όλα τα βήματα της ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western δίνονται αναλυτικά παρακάτω.

Πειραματική διαδικασία

Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκε πηκτή διαχωρισμού συγκέντρωσης 10%, καθώς στη συγκεκριμένη πυκνότητα γίνεται καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών με μοριακά βάρη 17-70kDa.

Πηκτή Διαχωρισμού (10%):

- ✓ ddH₂O 2.425ml
- ✓ Tris-HCl 1.5M pH 8.8 1.25ml
- ✓ SDS 10% 50μl
- ✓ Bis- Acrylamide 40% 1.25ml
- ✓ APS 10% 25μl
- ✓ TEMED 2.5μl

Πηκτή Επιστοίβαξης:

- ✓ ddH₂O 2.025ml
- ✓ Tris-HCl 1.5M pH 6.8 0.21ml
- ✓ SDS 10% 25μl
- ✓ Bis- Acrylamide 40% 0.25ml
- ✓ APS 10% 12.5μl
- ✓ TEMED 2.5μl

Πριν γίνει η φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή επιστοίβαξης, απαιτείται θέρμανσή τους στους 95°C για 5min, αν ηλεκτροφορούνται για πρώτη φορά. Σε περίπτωση που έχουν υποστεί ξανά θέρμανση και κατ' επέκταση ηλεκροφόρηση, θερμαίνονται για 2-3min. Μέσω της θέρμανσης επιτυγχάνεται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αμέσως μετά τη θέρμανση, υποβάλλονται σε μία φυγοκέντρηση (spin) διάρκειας δευτερολέπτων, στη μέγιστη ταχύτητα, έτσι ώστε τα δείγματα να έχουν ομοιογενή σύσταση πριν τη φόρτωση στην πηκτή. Στο σημείο αυτό, γίνεται φόρτωση των δειγμάτων. Η συνήθης ποσότητα είναι 15-20μl. Μαζί με τα δείγματα, φορτώνονται και 1-2μl μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (Marker). Η πηκτή τρέχει σταθερά στα 0.02A παρουσία Running Buffer 1x.

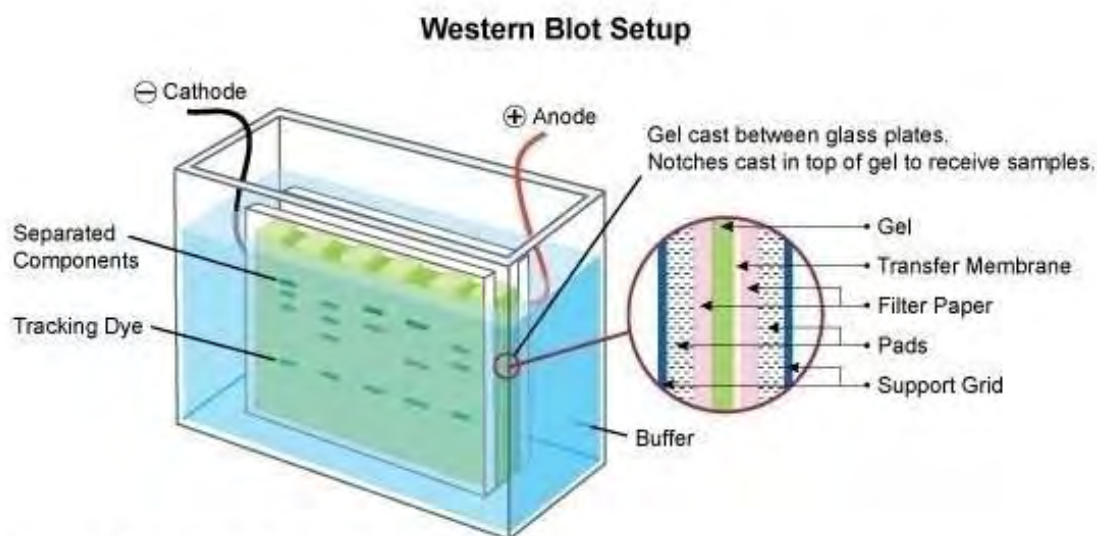
Σύσταση Running Buffer 1x:

1. 900ml dH₂O
2. 100ml Running Buffer 10x
3. 10ml SDS 10%

2.4.3 Ανοσοαποτύπωση Western

Αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από την ειδική συσκευή, απορρίπτεται η πηκτή επιστοίβαξης και το υπόλοιπο τμήμα της τοποθετείται για εξισορρόπηση σε παγωμένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κάποιες φορές (used). Ταυτόχρονα, εξισορροπείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τέσσερα χαρτιά νιτροκυτταρίνης (W.B. filter papers) και δύο υδροαπορροφητικά σφουγγάρια σε μη χρησιμοποιημένο Transfer Buffer (new). Να τονιστεί πως οι διαστάσεις όλων των παραπάνω είναι ίσες με το νέο μέγεθος της πηκτής. Η εξισορρόπηση διαρκεί 10-15min.

Αμέσως μόλις περάσει αυτό το χρονικό διάστημα, τοποθετούνται όλα τα παραπάνω στην ειδική κασέτα ηλεκτρομεταφοράς σε μία διάταξη τύπου sandwich. Η πηκτή και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βρίσκονται κεντρικά αυτής της διάταξης, έχοντας άμεση επαφή μεταξύ τους. Από τη στιγμή που θα τοποθετηθεί η μεμβράνη πάνω στην πηκτή δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην απομάκρυνση φυσαλίδων από το σύστημα, καθώς η ύπαρξη τους μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη. Η απομάκρυνση των φυσαλίδων γίνεται με εφαρμογή ελαφριάς πίεσης.



Εικόνα 28. Διαδικασία τοποθέτησης του gel, της μεμβράνης μεταφοράς, των ειδικών χαρτιών και των σφουγγαριών στην ανασοαποτύπωση Western.

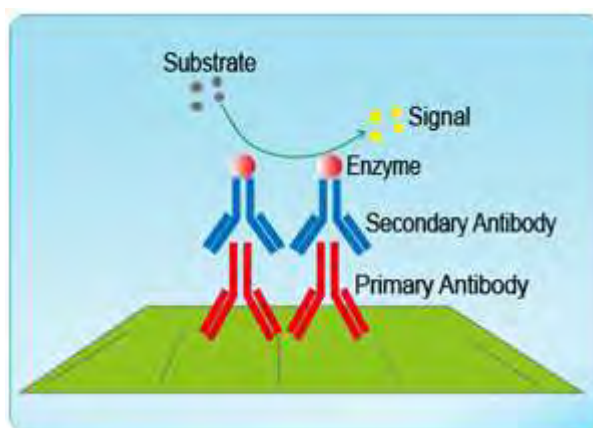
Η ειδική κασέτα τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με διάταξη τέτοια ώστε να ευνοείται η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη. Το όλο σύστημα τοποθετείται σε ένα κουτί από διογκωμένο πολυστυρένιο, μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί μεγάλη ποσότητα πάγου ή 5 περίπου παγοκύστες. Αυτό αποσκοπεί στην διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα όσο χρόνο διαρκέσει η ηλεκτρομεταφορά. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα παρουσία φρέσκου Transfer Buffer σε συνθήκες σταθερής έντασης ρεύματος, στα 0.35A, για 70min. Να υπογραμμιστεί πως η διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς μεταβάλλεται όταν χρησιμοποιείται Transfer Buffer διαφορετικής σύστασης ή πηκτή διαφορετικής συγκέντρωσης.

Μετά το πέρας των 70min, ακολουθεί μία έκπλυση της μεμβράνης με PBST 1x και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη σημείωση των ζωνών του marker. Το βήμα αυτό γίνεται με μολύβι και δίνεται πολύ μεγάλη προσοχή και στο να σημειωθούν σωστά οι μπάντες αλλά και στο να μην καταστραφεί η μεμβράνη από τη μύτη του μολυβιού. Μετά τη σύντομη αυτή πλύση, γίνεται

επώαση της μεμβράνης με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% σε PBST 1x για 1h, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση. Η επώαση αυτή προκειμένου να αποκλειστούν οι θέσεις μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος (blocking).

Μετά το πέρας της 1h, η μεμβράνη μπορεί είτε να αποθηκευτεί στους -20°C ή να επωαστεί εκείνη τη στιγμή με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Τα πρωτογενή, δευτερογενή αντισώματα και το γάλα διαλυτοποιούνται σε PBST X 1 διαλυτοποιημένο σε ddH₂O, ενώ στις εκπλύσεις σε PBST X 1 διαλυτοποιημένο σε dH₂O.

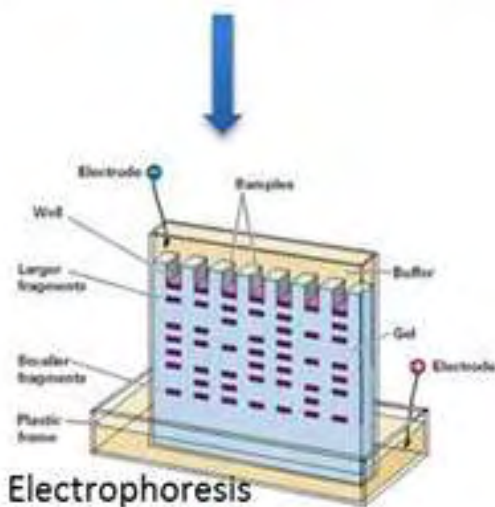
Σε κάθε περίπτωση, είτε δηλαδή ψυχθεί στους -20°C ή χρησιμοποιηθεί εκείνη τη στιγμή, πριν γίνει η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος πραγματοποιείται μία πλύση με PBST 1x. Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος και η μεμβράνη επωάζεται με αυτό O/N, στους 4°C και υπό ανάδευση. Την επόμενη ημέρα γίνεται η απομάκρυνση του πρωτογενούς αντισώματος κι ακολουθούν 5 πλύσεις με PBST 1x διάρκειας 5min. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει ειδικά συγκεκριμένους IgG σταθερούς επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος και ταυτόχρονα είναι χημικά σημασμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) ο οποίος επιτρέπει την ανίχνευση του. Τόσο τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή αντισώματα εμπεριέχονται σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 2% με PBST 1% (clear) και φυλάσσονται στους -20°C . Η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα για 2-3h, σε RT και υπό ανάδευση. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος γίνονται 3 πλύσεις με PBST 1x διάρκειας 5min (η τελευταία πλύση είθισται να διαρκεί 10min και γίνεται με PBST 1x με ddH₂O).



Εικόνα 29. Αρχικά προσδένεται το πρώτο αντίσωμα, έπειτα το δεύτερο αντίσωμα με το ειδικό ένζυμο. Επωάζουμε με το υπόστρωμα (ECL) για 3 λεπτά και τέλος γίνεται η εμφάνιση.

Workflow

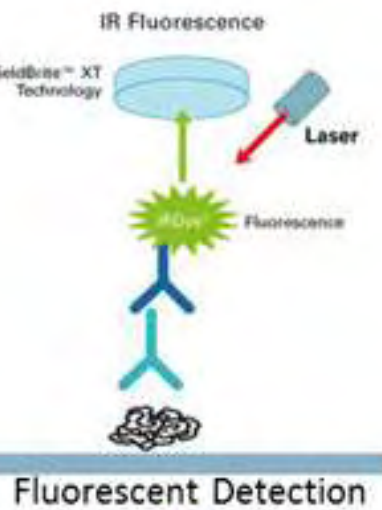
Sample Preparation



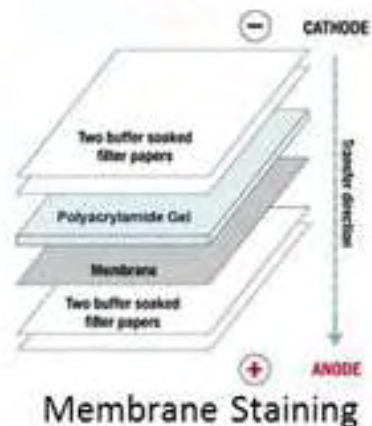
Electrophoresis



Transfer



Fluorescent Detection



Membrane Staining

Εικόνα 30. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο των επιπέδων target genes σε κύτταρα HeLa και HepG2, μετά την προσθήκη των ουσιών μας. Αρχικά, πάνω αριστερά, SDS-PAGE electrophoresis για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Έπειτα μεταφορά τους σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer). Η μεμβράνη επωαζόταν κάθε φορά με το αντίσωμα υπο εξέταση overnight (Bcl-2, Bax, Casp3, Casp9, b-actin, tubulin). Τέλος, μετά την προσθήκη του κατάλληλου δεύτερου αντισώματος, γίνεται η επώαση με το υπόστρωμα (ECL) και η εμφάνιση στο dark room.

Επόμενο στάδιο είναι η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ παρουσία κατάλληλου υποστρώματος για το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Για την αντίδραση εμφάνισης σήματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Pierce, όπου περιλαμβάνονται τα διαλύματα ECLA και ECLB. Γίνεται ανάμιξη ίσου όγκου των δύο διαλυμάτων και προσθήκη στην μεμβράνη. Η επώαση της μεμβράνης με τα ECLA και ECLB διαρκεί 3 min και γίνεται στο

σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Να σημειωθεί πως η ποσότητα που θα προστεθεί από τα δύο διαλύματα καθορίζεται από τον ερευνητή κι έχει να κάνει με το μέγεθος της μεμβράνης. Μόλις περάσει το διάστημα των 3min, η μεμβράνη τοποθετείται στο εσωτερικό μίας πλαστικής μεμβράνης στην ειδική κασετίνα εμφάνισης, έτσι ώστε να αποκλειστεί η διέλευση του φωτός καθώς τα ECL είναι φωτοευαίσθητα.

Η εμφάνιση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο με χρήση των εμπορικών αντιδραστηρίων του εμπορικού kit της Kodak. Ένα κομμάτι φιλμ κατάλληλων διαστάσεων έρχεται σε άμεση επαφή με την μεμβράνη για χρονικό διάστημα που ορίζει ο ερευνητής. Ακολουθεί εμφάνιση του σήματος με επώαση διάρκειας 1min σε διάλυμα Developer, ενδιάμεση πλύση με νερό για περίπου 10sec, επώαση του φιλμ διάρκειας 1min με διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) και σύντομη πλύση με νερό.

Μόλις τελειώσει η διαδικασία της εμφάνισης, η μεμβράνη εκπλένεται με PBST 1xγια περίπου 10-15 min έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ECL. Στο στάδιο αυτό μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για νέο κύκλο εμφανίσεων ή να αποθηκευτεί στους -20°C.

2.4.4 Western Blot για Caspase 3, Caspase 9 & β-actin

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, επιχειρήθηκε να διαλευκανθεί ο ρόλος των τερπενοειδών ουσιών, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη, στην GR σηματοδότηση. Με βάση, λοιπόν, το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν με τη βοήθεια της Western Blot analysis η επίδραση των τριτερπενοειδών αυτών σε ορισμένα ένζυμα κλειδιά της απόπτωσης, όπου αποδεδειγμένα εμπλέκονται τα γλυκοκορτικοειδή μέσω του υποδοχέα τους.

Δεδομένων των αντικαρκινικών ιδιοτήτων που έχουν αποδοθεί στα τερπενοειδή, κι ειδικότερα της επαγωγής της απόπτωσης, με τη βοήθεια της ανοσοαποτύπωσης μελετήθηκαν τα επίπεδα των κασπασών 3 και 9, παρουσία κι απουσία DEX και κάτω υπό την επίδραση των g-PPD και g-PPT. Υπενθυμίζεται, πως η κασπάση 3 αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο (Slee EA, 2001). Όσον αφορά την κασπάση 9, υπενθυμίζεται πως είναι εκείνη που πρωτεολύει κι επομένως προκαλεί την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 στο ενδογενές μονοπάτι. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Caspase 3 E27 της εταιρίας Abcam και η cleaved Caspase 9 (9505) της Cell Signalling. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν και στις δύο περιπτώσεις rHRP της εταιρίας Pierce με αραιώση 1/5.000.

Όσον αφορά την β-actin, να αναφερθεί πως αποτελεί μία από τις έξι διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης που έχει ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο. Οι ακτίνες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική κίνηση, δομή και ακεραιότητα [Gunning P, 1997]. Η β-actin χρησιμοποιείται στην ανοσοαποτύπωση Western ως μάρτυρας ισοφόρτωσης (loading control) των δειγμάτων. Βάση της β-ακτίνης, γίνεται η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή των συμπερασμάτων από την ανοσοαποτύπωση αυτή.

4. Αποτελέσματα

4.1 Οι ουσίες Πρωτοπαναξαδιόλη και Πρωτοπαναξατριόλη επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα

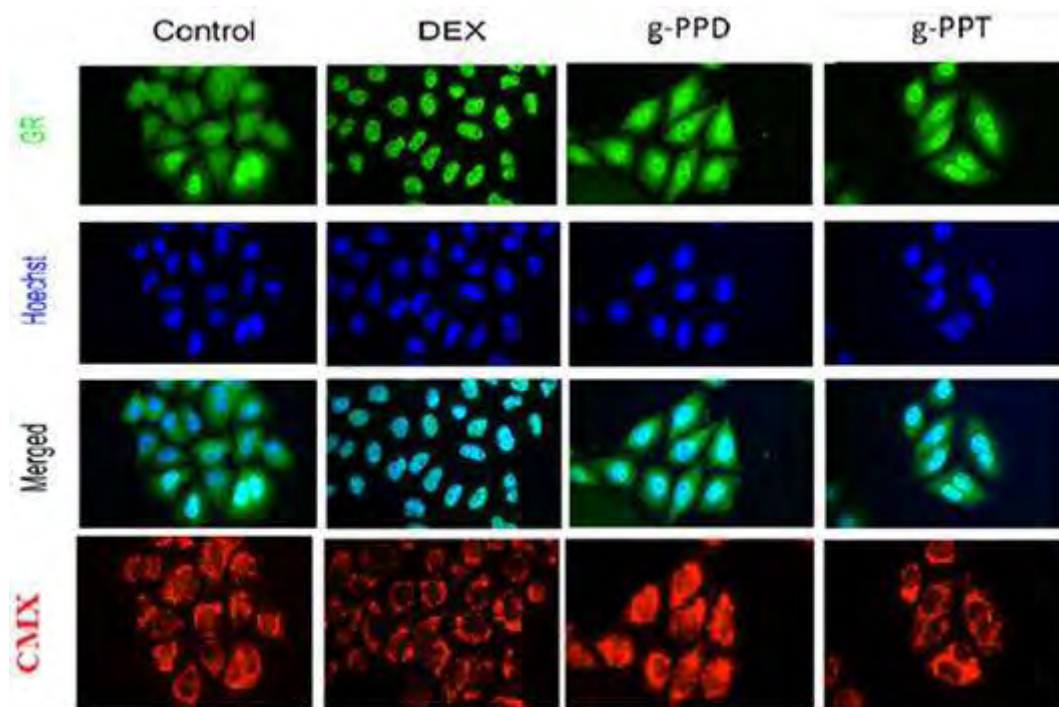
Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η πειραματική διαδικασία ξεκίνησε με πειράματα ανοσοϊστοχημείας που αποσκοπούσαν στην μελέτη της ικανότητας των υπό εξέταση ουσιών να προκαλέσουν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Έγινε ο έλεγχος πολλών ουσιών, ωστόσο μόνο η PPD και η PPT είχαν την δυνατότητα να επάγουν την πυρηνική μετατόπιση του GR, καθώς οι υπόλοιπες ουσίες παρουσίαζαν δράση όμοια με το control. Παρακάτω δίνεται ένας πίνακας με τις συντομογραφίες των ουσιών που μελετήθηκαν :

TFC039 (g-PPD)
TFC040 (g-PPT)
PCUPO3
PCUPO4
PCUPO5
PCUPO6
PCUPO7
PCUPO9
PCUPO10
PCUPO12
PCUPO13
PCUPO15
PCUPO16
PCUPO17
PCUPO18
PCUPO19
PCUPO20
PCUPO21
PCUPO22
PCUPO23
PCUPO24
PCUPO25
PCUPO26
PCUPO27
PCUPO28

Πίνακας 2. Ουσίες που μελετήθηκαν με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Τα πειράματα αυτά έγιναν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa, με βάση το πρωτόκολλο που έχει δοθεί. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε απεμπλουτισμένο από ορμόνες θρεπτικό μέσο, παρουσία ή απουσία 1μM αραιωμένης σε EtOH δεξαμεθαζόνης (DEX) ή 10μM των παραπάνω αραιωμένων σε DMSO ουσιών. Η επώαση έγινε στους 37°C και

σε 5% υγρασία για 2h. Επιπλέον, έγινε χρήση της χρωστικής CMX προκειμένου να γίνει σήμανση και χαρακτηρισμός της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων και της χρωστικής Hoechst 33342, μέσω της οποίας έγινε η χρώση των πυρήνων. Υπενθυμίζεται πως η ανάλυση έγινε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) βάση των οποίων βγήκαν και τα συμπεράσματα που αφορούσαν την ικανότητα επαγωγής μετατόπισης του GR στον πυρήνα από τις PPD και PPT. Τέλος, να αναφερθεί πως η λήψη των εικόνων φθορισμού έγινε με την κάμερα *Qimaging optiMOS*, η οποία και ήταν ευγενική χορηγία του Ιδρύματος Μποδοσάκη. Μόνο στις δύο αυτές ουσίες παρατηρείται πυρηνική μετατόπιση, όπως μπορούμε να διακρίνουμε και στην παρακάτω εικόνα.



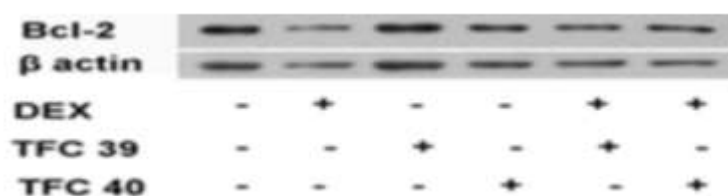
Εικόνα 31. Κύτταρα HeLa, που έχουν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών, επώαστηκαν απουσία ή παρουσία 1 μ M DEX (διαλυμένη σε EtOH) ή 10 μ M g-PPD και g-PPT (διαλυμένα σε DMSO) για 2 ώρες. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως control επώαστηκαν με EtOH (1/1000) και DMSO (1/1000). Τα κύτταρα κατεργάστηκαν με χρωστικές ανοσοϊστοχημείας. Ο GR απεικονίζεται με πράσινη χρωστική και ο πυρήνας με μπλε χρωστική. Τα κύτταρα επίσης επώαστηκαν με την μιτοχονδριακή χρωστική CMX για ανίχνευση και έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας. 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.

4.2 Οι ουσίες g-PPD και g-PPT, όπως και η DEX προκαλούν την μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση σε κύτταρα HeLa

Όπως προαναφέρθηκε στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης των g-PPD και g-PPT. Γι' αυτό το λόγο έγινε μελέτη των επιπέδων της έκφρασης μορίων (ενζύμων/πρωτεϊνών) κλειδιά για το σηματοδοτικό μονοπάτι της απόπτωσης.

4.2.1 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)

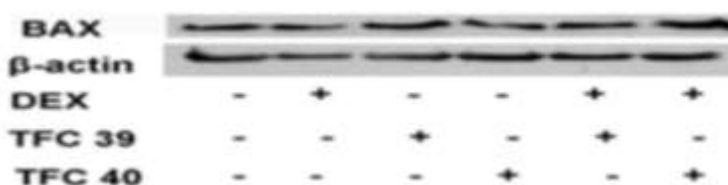
Πρόκειται για αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης.



Όπως βλέπουμε και στην εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 είναι σχεδόν ίδια με αυτά της ακτίνης (μόριο κανονικοποίησης). Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν διακρίνεται αποπτωτική δράση των τερπενοειδών ουσιών, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη.

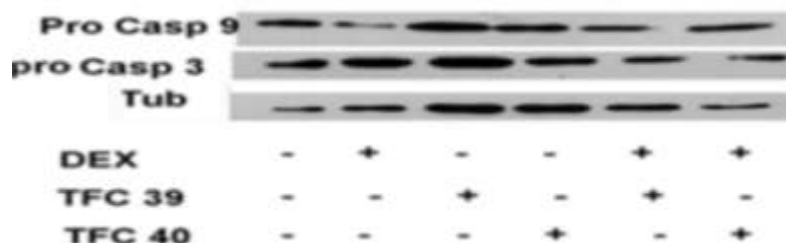
4.2.2 BAX, pro-Casp9, pro-Casp3

Η BAX είναι μια αποπτωτική πρωτεΐνη, η οποία ανήκει στην οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών. Συνδέεται με την Bcl-2 ως προς τον σχηματισμό ετεροδιμερούς, και αποτελεί έτσι ενεργοποιητή της απόπτωσης. Επιπλέον, έχει την ικανότητα να ανοίγει ένα κανάλι VDAC, το οποίο οδηγεί στην καταστροφή της μεμβράνης, στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και τέλος στην απόπτωση.

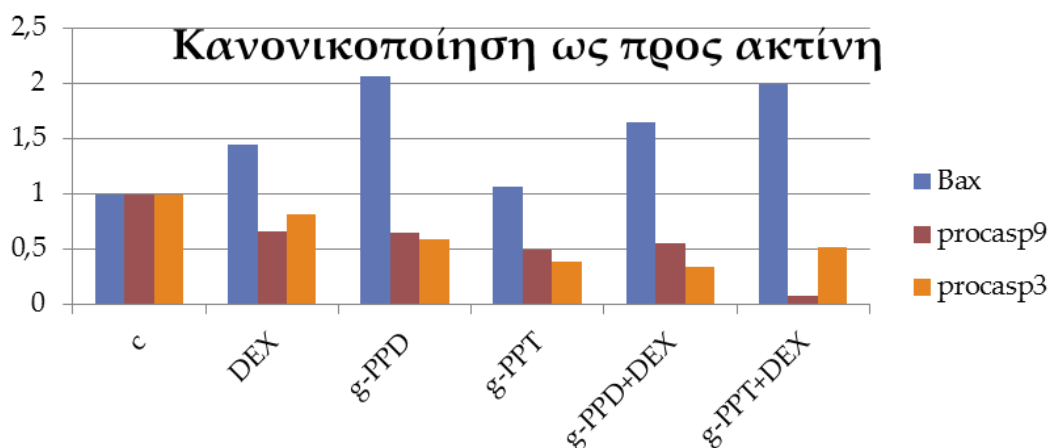


Στην εικόνα, μπορούμε να διακρίνουμε τα επίπεδα έκφρασης της αποπτωτικής πρωτεΐνης BAX. Παρουσία των ουσιών παρατηρήθηκαν, αυξημένα επίπεδα έκφρασης της BAX, όμοια με αυτά της DEX.

Η κασπάση 3 αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο (Slee EA, 2001). Η κασπάση 9 επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση. Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των ανενεργών ενζύμων, της προ-κασπάσης 3 και της προ-κασπάσης 9, υπό την παρουσία DEX και των ουσιών g-PPD και g-PPT.



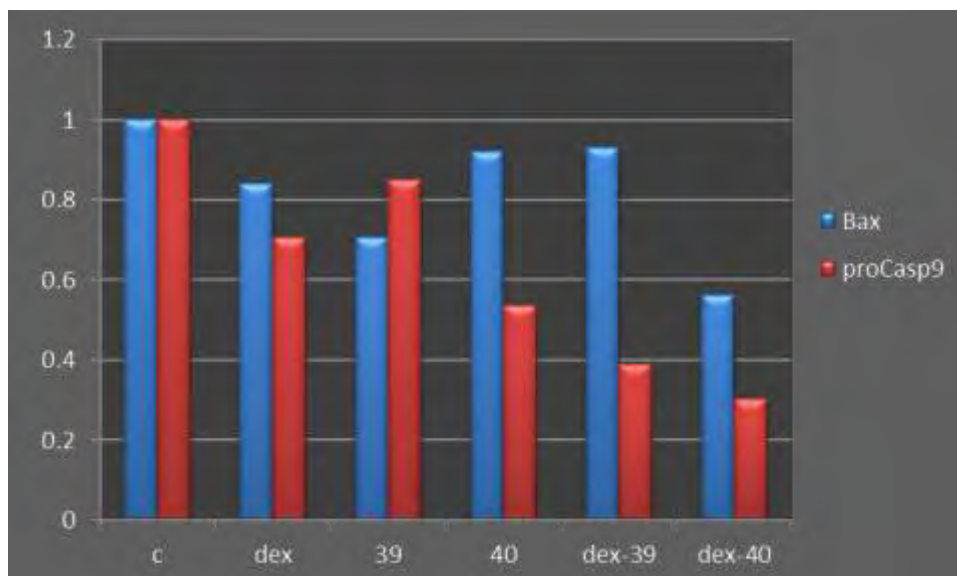
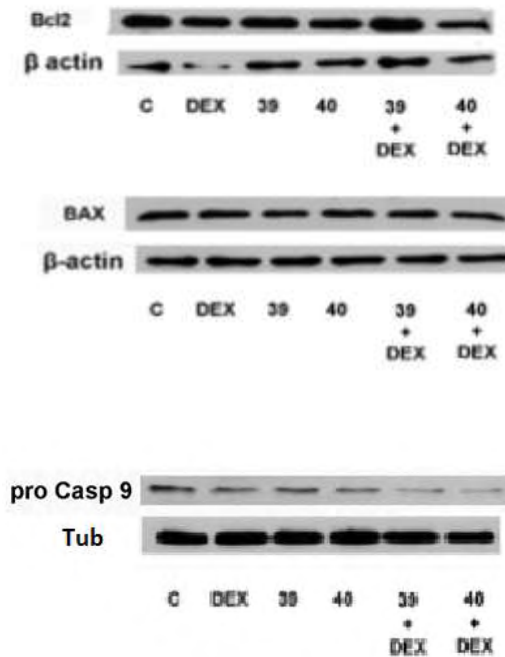
Όπως μπορούμε να διακρίνουμε και στην εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης των ανενεργών ενζύμων προ-κασπάση 3 και προ-κασπάση 9 μειώνονται παρουσία DEX και των ουσιών μας. Γίνεται αντιληπτό έτσι ότι οι ουσίες μας έχουν αποπτωτική δράση όμοια με την DEX σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa. Ακόμα, στην εικόνα βλέπουμε μία έντονη μείωση των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 υπό την δράση της DEX. Να τονίσουμε σε αυτό το σημείο ότι είναι γνωστό από την διεθνή βιβλιογραφία ότι η DEX ενεργοποιεί το μονοπάτι απόπτωσης των κασπασών 9 στα μιτοχόνδρια [Sionon, 2006].



Υπενθυμίζεται, πως οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot, συνοδεύονται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης της ενεργής κασπάσης 3, της κασπάσης 9 και της BAX μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της αντίστοιχης β-ακτίνης ή της τουμπουλίνης (μόρια κανονικοποίησης).

4.3. Επαγωγή μιτοχονδριακά εξαρτώμενης απόπτωσης σε κύτταρα HepG2 υπό την επίδραση των ουσιών g-PPD και g-PPT

Ομοίως στα κύτταρα HepG2 έγινε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης Western Blot για την μελέτη της επίδρασης των υπό μελέτη ουσιών στα επίπεδα έκφρασης μορίων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της απόπτωσης.



Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης των Bcl-2 δεν μεταβάλλονται, υπό την επίδραση των ουσιών, σε σχέση με αυτών στα κύτταρα μάρτυρες. Αντίθετα τα επίπεδα έκφρασης των BAX και προκασπάσης 9, μειώνονται παρουσία τόσο της

DEX, όσο και των ουσιών. Η παρατηρούμενη από την DEX μείωση της προ-κασπάσης 9 και BAX συμφωνεί με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που δείχνουν ότι η DEX την μιτοχονδριακά εξαρτώμενη-απόπτωση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η επώαση των κυττάρων με DEX και πρωτοπαναξατριόλη έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μείωση των επιπέδων έκφρασης της προκασπάσης 9, κάτι που υποδεικνύει πιθανή συνεργιστική ή αθροιστική τους δράση, της g-PPT και DEX, στην επαγωγή της απόπτωσης.

5.Συζήτηση

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στερεοειδείς ορμόνες, οι οποίες ασκούν την δράση τους μέσω της ενεργοποίησης, δηλαδή της πυρηνικής μετατόπισης, του αντίστοιχου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών GR. Λόγω της αντιφλεγμονώδους και της αντικαρκινικής τους δράσης χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για την θεραπεία αλλεργιών, αυτοάνοσων νοσημάτων καθώς και πολλών τύπων καρκίνου. Ωστόσο, η θετική τους δράση συνοδεύεται από την εμφάνιση παρενεργειών, όπως είναι ο διαβήτης, η οστεοπόρωση και πολλές φορές ο καρκίνος (π.χ. λευχαιμία). Όλα τα παραπάνω συνέβαλαν στην ανάγκη εύρεσης ειδικών εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs). Κατά διαστήματα έχουν γίνει πολλές μελέτες με διάφορες ουσίες (SEGRAs) που μιμούνται την βιολογική δράση των GCs αλλά δεν έχουν τις παρενέργειές τους.

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) δρα μέσω δύο οδών, της γενωμικής και της μη γενωμικής, με τη δεύτερη οδό να υπερτερεί σε ταχύτητα έναντι της πρώτης. Ο ακριβής μηχανισμός μη γενωμικών δράσεων δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η πρώτη οδός δράσης του GR, η γενωμική δράση.

Στην συγκεκριμένη μελέτη προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε την αποπτωτική δράση διαφόρων τερπενοειδών ουσιών. Οι τερπενοειδείς ουσίες είναι φυσικά φυτικά εκχυλίσματα που βρίσκονται άφθονα στην φύση. Δομικά μοιάζουν πολύ με τα γλυκοκορτικοειδή, και αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη τους, δεδομένου ότι η ομοιότητα στην δομή γεννά το ερώτημα ομοιοτήτων στο μηχανισμό δράσης τους.

Αρχικά, με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας διερευνήσαμε αν οι υπό εξέταση ουσίες προκαλούσαν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Σε αυτό βοήθησε η επώαση των κυττάρων HeLa με 1^ο αντίσωμα (anti-GR) και έπειτα με 2^ο αντίσωμα, το οποίο είναι φθορίζων. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι ουσίες PCUPO3, PCUPO4, PCUPO5, PCUPO6, PCUPO7, PCUPO9, PCUPO10, PCUPO12, PCUPO13, PCUPO15, PCUPO16, PCUPO17, PCUPO18, PCUPO19, PCUPO20, PCUPO21, PCUPO22, PCUPO23, PCUPO24, PCUPO25, PCUPO26, PCUPO27 και PCUPO28 δεν προκαλούσαν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Αντιθέτως, οι ουσίες πρωτοπαναξαδιόλη (g-PPD) και πρωτοπαναξατριόλη (g-PPT) προκαλούσαν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Στις εικόνες που παραθέτονται στα αποτελέσματα διακρίνεται ξεκάθαρα η μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα (κυτοσόλιο) στον πυρήνα. Χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Hoechst 33342 για την χρώση των πυρήνων. Η χρωστική CMX

χρησιμοποιήθηκε για την χρώση των μιτοχονδρίων. Παρατηρήθηκε μη φυσιολογική μορφολογία μιτοχονδρίων μετά από επώαση με τις g-PPD και g-PPT.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν παρόμοια δομή με τις τριτερπενοειδείς ουσίες. Είναι γνωστή σε όλους η αντικαρκινική δράση των γλυκοκορτικοειδών. Γι' αυτό το λόγο θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανή αποπτωτική δράση των ουσιών g-PPD και g-PPT. Με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης Western Blotting έγινε έλεγχος στα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων μορίων στόχων του GR που παίζουν κύριο ρόλο στο μονοπάτι της απόπτωσης. Αρχικά, κύτταρα HeLa/HepG2 επώαστηκαν με τις υπό εξέταση ουσίες για δύο (2) 24ωρα. Έπειτα τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μία διαδικασία προετοιμασίας (harvest, φυγοκέντρηση, λύση, sonication, bradford) και έλαβε μέρος η αποδιάταξη των πρωτεϊνών τους (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες από το gel μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, έτσι ώστε να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασής τους. Στα κύτταρα HeLa, τα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 παρέμειναν σταθερά στις ουσίες, όμοια με αυτά του control. Αντιθέτως, τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών μορίων BAX, pro-Casp9 και pro-Casp3 μειώθηκαν εμφανώς. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι υπο εξέταση ουσίες, πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη, επάγουν την απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα HeLa. Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι οι ουσίες μας δεν είχαν την ίδια αποπτωτική επίδραση σε ηπατικά κύτταρα HepG2, καθώς τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μορίων παρέμεναν σταθερά σε όλα τα δείγματα. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι παρουσία των ουσιών ενισχύεται η παρατηρούμενη αποπτωτική δράση της DEX. Λαμβάνοντας αυτά τα αποτελέσματα υπόψη και τις αναφορές που έχουν γίνει διεθνή βιβλιογραφία, παρατηρούμε ότι όμοια με τα γλυκοκορτικοειδή η επαγόμενη από τις ουσίες αποπτωτική δράση παρουσιάζει ιστοειδικότητα. Μάλιστα σε περιπτώσεις όπως αυτήν των HepG2 η συνδυαστική χρήση των ουσιών με τα GCs οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης, επιθυμητή σε περιπτώσεις καρκίνου περιορίζοντας τις ανεπιθύμητες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών π.χ. επαγωγή γλυκονεογένεσης που έχει παρατηρηθεί στα πλαίσια αυτής της μελέτης. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν μία πιθανή αξιοποίηση των ουσιών αυτών μόνον τους ή σε συνδυασμό με τα γλυκοκορτικοειδή ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα. Απαιτείται περαιτέρω μελέτη για την εξακρίβωση της ιστοειδικότητας της επαγόμενης από τις ουσίες απόπτωσης και του ακριβή μηχανισμού δράσης τους σε συνομιλία ή μη με τα γλυκοκορτικοειδή.

Η πρωτοπαναξαδιόλη έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες ως μία ουσία που ενισχύει την δράση αντικαρκινικών φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ενισχύει την δράση του 5-

FU (ισχυρό αντι-καρκινικό φάρμακο) σε καρκινικά κύτταρα HTC-116 (καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από κόλον) [Chong-Zhi Wang et al., 2015]. Ακόμα, έχει αναφερθεί ως ένα μόριο που φέρει αποπτωτικές ιδιότητες.

Στο μέλλον, προτείνεται περαιτέρω έρευνα των ουσιών πρωτοπιναξαδιόλη και πρωτοπιναξαδιόλη και της αντικαρκινικής τους δράσης. Πρόκειται για δύο μόρια με αφθονία βιολογικών δράσεων και ίσως αποτελέσουν ιδανικούς αντικαταστάτες των γλυκοκορτικοειδών, με πιο ισχυρή δράση και απουσία των παρενεργειών που συνοδεύονται από τα GCs.

Συντμήσεις

aa: aminoacids | | αμινοξέα

amp: ampicillin | | αμπικιλίνη

AF1: activation function 1 | | λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 1

AF2: activation function 2 | | λειτουργία (μεταγραφικής) ενεργοποίησης 2

APS: ammonium persulfate | | υπερθειικό αμμώνιο

BA(s): Boswellic Acid(s)

BSA: bovine serum albumin | | αλβουμίνη βόειου ορού

CDK: cell cycle-dependent kinase | | κυκλινοεξαρτώμενη κινάση

cis: charcoal inactivated serum | | ορός απενεργοποιημένος σε ενεργό άνθρακα

DEX: dexamethazone | | δεξαμεθαζόνη

DMEM: Dulbecco's modified medium | | θρεπτικό μέσο DME

DTT: dithiothreitol | | 1.4 διθριοθειτόλη

DMSO: dimethylsulfoxide | | διμεθυλοσουλφοξείδιο

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid | | αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EtOH: ethanol | | αιθανόλη

FBS: fetal bovine serum | | εμβρυικός βόειος ορός

GCs: glucocorticoids | | γλυκοκορτικοειδή

GR: glucocorticoid receptor | | υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

GRE: glucocorticoid response element | | στοιχείο αποκρινόμενο στα γλυκοκορτικοειδή

H-G: high glucose | | υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4.5mg/ml)

HPA: hypothalamic-anteriorpituitary-adrenalaxis | | άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων

HRP: horseradish peroxidase | | υπεροξειδάση του χρένου

IgG: immunoglobulin G | | ανοσοσφαιρίνη G

kDa: kilo Dalton

L-B: L-Broth medium | | θρεπτικό υλικό L-Broth

L.B.: Lysis Buffer | | διάλυμα λύσης

L-Glut: L-glutamine | | L-γλουταμίνη

MAPK: mitogen-activated protein kinase || πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

MBA: N,N'-methylene bis acrylamide || N, N'-μεθύλενο-δισ-ακρυλαμίδιου

NR: nuclear receptor || πυρηνικός υποδοχέας

O/N: overnight || για όλη τη νύχτα

ONPG: 2-nitrophenyl b-D-galactopyranoside || 2-νιτροφαίνυλοβ-D-γαλακτοπυρανοσίδιο

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis || ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου

PBS: phosphate-buffered saline || ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PBS-T: phosphate-buffered saline/ Tween-20 || ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween-20

PMSF: phenyl methyl sulfonyl fluoride || φαίνυλο-μέθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο

PVA: polyvinyl alcohol || πολυβινυλική αλκοόλη

P/S: pen/strept ή penicillin/streptomycin || πενικιλίνη/ στρεπταμυκίνη

R.T.: room temperature || θερμοκρασία δωματίου ($\approx 23^{\circ}\text{C}$)

rpm: revolution per minute || στροφές ανά λεπτό

SDS sodium dodecyl sulfate || δωδεκακυλοθειικό νάτριο

TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine || τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane || 2-άμινο-2-(υδροξυμέθυλο)-προπανοδιόλη 1,3

Βιβλιογραφία

- Amanda L. Gruver-Yates and John A. *Cidlowski Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword* Cells. 2013 Jun; 2(2): 202–223
- Andric SA, Kojic Z, Bjelic MM, Mihajlovic AI, Baburski AZ, Sokanovic SJ, Janjic MM, Stojkov NJ, Stojilkovic SS, Kostic TS *The opposite roles of glucocorticoid and α 1-adrenergic receptors in stress triggered apoptosis of rat Leydig cells.* Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013 Jan 1; 304(1):E51-9
- Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F. *Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance.* Int J Obes Relat Metab Disord. 2004 Dec;28 Suppl 4:S45-52.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS *Glucocorticoids in T cell development and function**. Annu Rev Immunol. 2000; 18():309-45.
- Bandyopadhyay U, Biswas K, Bandyopadhyay D, Ganguly CK, Banerjee RK *Dexamethasone makes the gastric mucosa susceptible to ulceration by inhibiting prostaglandin synthetase and peroxidase--two important gastroprotective enzymes.* Mol Cell Biochem. 1999 Dec; 202(1-2):31-6
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. *Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis.* FASEB J. 2004 18(1):70-80.
- Bhatti HN, Khera RA. *Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review.* J Asian Nat Prod Res. 2014 16(1):70-104.
- Binnert C1, Ruchat S, Nicod N, Tappy L. *Dexamethasone-induced insulin resistance shows no gender difference in healthy humans.* Diabetes Metab. 2004 Sep;30(4):321-6.
- Bledsoe R.K., Montana V.G., Stanley T.B., Delves C.J., Apolito C.J., McKee D.D., Conslor T.G., Parks D.J., Stewart E.L., Willson T.M. *Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition.* Cell (2002) 110: 93–105.
- Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. (1976) 72:248-54.
- Brummelte S, Galea LA *Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats.* Neuroscience. 2010 Jul 14; 168(3):680-90.
- Brunetti M, Martelli N, Colasante A, Piantelli M, Musiani P, Aiello FB *Spontaneous and glucocorticoid-induced apoptosis in human mature T lymphocytes.* Blood. 1995 Dec 1; 86(11):4199-205.
- Bourcier T, Forgez P, Borderie V, Scheer S, Rostène W, Laroche L *Regulation of human corneal epithelial cell proliferation and apoptosis by dexamethasone.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Dec; 41(13):4133-41
- C. M. Feek, D. J. Marante, C. R. Edwards *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis* 1983 Clin Endocrinol Metab 123597618

- Callaway Ewen ***HeLa publication brews bioethical storm: Genome of controversial cell line no longer public, but another sequence is in the works.*** *Nature* 2013 12689.
- Callaway Ewen ***Most popular human cell in science gets sequenced: The HeLa cell genome is riddled with errors, raising questions about its continued use.*** *Nature* 2013b 12609.
- Cao Y, Bender IK, Konstantinidis AK, Shin SC, Jewell CM, Cidlowski JA, Schleimer RP, Lu NZ ***Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans.*** *Blood*. 2013 Feb 28; 121(9):1553-62.
- Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. ***Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines.*** *Int J Cancer*. 2010 127(1):1-8.
- Caron-Leslie LM, Schwartzman RA, Gaido ML, Compton MM, Cidlowski JA ***Identification and characterization of glucocorticoid-regulated nuclease(s) in lymphoid cells undergoing apoptosis.*** *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991; 40(4-6):661-71
- Carson SD, Pirruccello SJ. ***HeLa cell heterogeneity and coxsackie virus B3 cytopathic effect: implications for inter-laboratory reproducibility of results.*** *J Med Virol*. 2013 85(4):677-83.
- Chen WL, Lin CT, Yao CC, Huang YH, Chou YB, Yin HS, Hu FR ***In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells.*** *Ocul Immunol Inflamm*. 2006 Aug; 14(4):215-23.
- Chong-Zhi Wang, Zhiyu Zhang, Jin-Yi Wan, Chun-Feng Zhang, Samantha Anderson,1 Xin He, Chunhao Yu, Tong-Chuan He, Lian-Wen Qi, and Chun-Su Yuan ***Protopanaxadiol, an Active Ginseng Metabolite, Significantly Enhances the Effects of Fluorouracil on Colon Cancer*** *Nutrients*. 2015 Feb; 7(2): 799–814
- Chrysis D, Zaman F, Chagin AS, Takigawa M, Sävendahl L. ***Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway.*** *Endocrinology*. 2005 Mar; 146(3):1391-7.
- Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. ***Gene expression signature of human HepG2 cell line.*** *Gene* 2013 518(2):335-45.
- Czerski L, Nunez G. ***Apoptosome formation and Caspase activation: is it different in the heart?*** *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Sep;37(3):643-52.
- De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. ***Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B dependent transcription involves direct interference with transactivation.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 94(25):13504-9.
- Debons AF, Zurek LD, Tse CS, Abrahamsen S. ***Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids.*** *Endocrinology*. 1986 Apr;118(4):1678-81.
- Di Dalmazi G, Pagotto U, Pasquali R, Vicennati V ***Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology.*** *J Nutr Metab*. 2012; 2012():525093

- Ding MJ, Wang LX, Dai YR **Changes of airway smooth muscle cell apoptosis in asthmatic airway remodeling and the effect of dexamethasone in rats.** Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 2008 Aug; 31(8):607-10.
- Dirks-Naylor AJ, Griffiths CL **Glucocorticoid-induced apoptosis and cellular mechanisms of myopathy.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2009 Oct; 117(1-3):1-7
- Dorscheid DR, Wojcik KR, Sun S, Marroquin B, White SR **Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids.** Am J Respir Crit Care Med. 2001 Nov 15; 164(10 Pt 1):1939-47
- Evans R.M. **The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.** Science 1988 240 (4854): 889–95.
- Frankfurt O, Rosen ST **Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates.** Curr Opin Oncol. 2004 Nov; 16(6):553-63.
- Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. **Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models.** Steroids. 1999 64: 107– 119.
- Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS, Hardy MP **Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis.** Mol Cell Endocrinol. 2003 Jan 31; 199(1-2):153-63
- Grad I. and Picard D. **The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones.** Mol. Cell. Endocrinol. 2007 275, 2–12.
- Grünfeld JP and Eloy L. **Role of glucocorticoids in the regulation of blood pressure** 1987a [Article in French]. Presse Med. 16 (28): 1365-7.
- Grünfeld JP, Eloy L. **Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat.** (1987b) Journal Hypertension. 10(6):608-18.
- Grünfeld JP **Glucocorticoids in blood pressure regulation.** 1990 Horm Res. 34 (3-4): 111-3.
- Gunning P, Weinberger R, Jeffrey P. **Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis.** Anat Embryol (Berl) 1997 195(4):311-5.
- Haridas V, Xu ZX, Kitchen D, Jiang A, Michels P, Gutterman JU. **The Anticancer Plant Triterpenoid, Avicin D, Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling: Implications for Cellular Metabolism.** PLoS ONE 2011 6(11):e28037.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF **Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone.** Exp Neurol. 1996 Jul; 140(1):43-52
- Heike Schäcke, Arndt Schottelius, Wolf-Dietrich Döcke, Peter Strehlke, Stefan Jaroch, Norbert Schmees, Hartmut Rehwinkel, Hartwig Hennekes, and Khusru Asadullah **Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects** 2003 Dec 23; Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 6; 101(1): 227–232.
- Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. **Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification.** Trends Endocrinol Metab 2002. 13(2):55-60.
- Herr I, Gassler N, Friess H, Büchler MW **Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids.** Apoptosis. 2007 Feb; 12(2):271-91

- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. **The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression.** Nat Struct Mol Biol. 2013 20(1):53-8.
- Ian M Adcock, Yasuyuki Nasuhara, David A Stevens, and Peter J Barnes **Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targetting of NF-κB and lack of I-κB involvement** Br J Pharmacol. 1999 Jun; 127(4): 1003–1011.
- Irma B Mitre-Aguilar, Alberto J Cabrera-Quintero, Alejandro Zentella-Dehesa **Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer** Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(1): 1–10.
- Ismaili N, Garabedian MJ **Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation.** Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun;1024:86-101.
- Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y, Saito H. **Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein.** Biochem Biophys Res Commun 1997 235:295–299.
- JIAN-LI GAO, GUI-YUAN LV, BAI-CHENG HE, BING-QIANG ZHANG, HONGYU ZHANG, NING WANG, CHONG-ZHI WANG, WEI DU, CHUN-SU YUAN, and TONG-CHUAN HE **Ginseng saponin metabolite 20(S)-protopanaxadiol inhibits tumor growth by targeting multiple cancer signaling pathways** Oncol Rep. 2013 Jul; 30(1): 292–298.
- Kang KA, Kim YW, Kim SU, Chae S, Koh YS, Kim HS, Choo MK, Kim DH, Hyun JW **G1 phase arrest of the cell cycle by a ginseng metabolite, compound K, in U937 human monocytic leukemia cells.** Arch Pharm Res. 2005 Jun; 28(6):685-90
- Katychev A, Wang X, Duffy A, Dore-Duffy P. **Glucocorticoid-induced apoptosis in CNS microvascular pericytes.** Dev Neurosci. 2003 Nov-Dec; 25(6):436-46.
- Lee MC, Wee GR, Kim JH **Apoptosis of skeletal muscle on steroid-induced myopathy in rats.** J Nutr. 2005 Jul; 135(7):1806S-1808S.
- Li H, Qian W, Weng X, Wu Z, Li H, Zhuang Q, Feng B, Bian Y **Glucocorticoid receptor and sequential P53 activation by dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of osteoblastic MC3T3-E1 cells.** PLoS One. 2012; 7(6):e37030.
- Lian-Wen Qi, Chong-Zhi Wang, and Chun-Su Yuan **Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges** Nat Prod Rep. 2011 Mar 1; 28(3): 467–495.
- Liby KT, Yore MM, Sporn MB **Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer.** Nat Rev Cancer. 2007 May; 7(5):357-69
- Lill-Elghanian D, Schwartz K, King L, Fraker P **Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow.** Exp Biol Med (Maywood). 2002 Oct; 227(9):763-70.
- Löwenberg M, Stahn C, Hommes DW, Buttgerit F. **Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands** Steroids. 2008 Oct;73(9-10):1025-9. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.002. Epub 2007 Dec 14.
- Lu NZ, Cidlowski JA **The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms.** Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun; 1024():102-23.
- Lu NZ, Collins JB, Grissom SF, Cidlowski JA **Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor.** Mol. Cell Biol. 2007;27:7143–7160.

- Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, Kushner PJ, Coetzee GA, Stallcup MR. ***Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins.*** Mol Cell Biol 1999 19(9):6164-73.
- Madigan T. Michael, Martinko M. John, Parker Jack. ***Brock Βιολογία των μικροοργανισμών. 2007 (Τόμ. Ι).*** Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Manish S. Lavhale, Santosh Kumar, Shri Hari Mishra, and Sandhya L. Sitasawad, ***A Novel Triterpenoid Isolated from the Root Bark of Ailanthus excelsa Roxb (Tree of Heaven), AECHL-1 as a Potential Anti-Cancer Agent*** PLoS ONE. 2009; 4(4): e5365.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. ***The RXR heterodimers and orphan receptors.*** Cell 1995 83(6):841-50.
- Mann CL, Cidlowski JA ***Glucocorticoids regulate plasma membrane potential during rat thymocyte apoptosis in vivo and in vitro.*** Endocrinology. 2001 Jan; 142(1):421-9
- Maranzano E1, Feyer PCh, Molassiotis A, Rossi R, Clark-Snow RA, Olver I, Warr D, Schiavone C, Roila F. ***Evidence-based recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy*** Radiother Oncol. 2005 Sep;76(3):227-33 ***Mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits hyperosmolar-induced cytokine release and MAPK pathways in human corneal epithelial cells*** Mol Vis. 2010; 16: 1791–1800.
- McKay I.L and Cidlowski A.J. ***"Chapter 62: Corticosteroids"*** in Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003
- Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C ***Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes.*** J Immunol. 1996 Jun 1; 156(11):4422-8
- Megan E. Cavet, Karen L. Harrington, Keith W. Ward, and Jin-Zhong Zhang
- Migliorati G, Pagliacci C, Moraca R, Crocicchio F, Nicoletti I, Riccardi C ***Glucocorticoid-induced apoptosis of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes.*** Pharmacol Res. 1992 Sep; 26 Suppl 2():26-7
- Ming YL, Song G, Chen LH, Zheng ZZ, Chen ZY, Ouyang GL, Tong QX ***Anti-proliferation and apoptosis induced by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin in human hepatocellular carcinoma cells.*** Cell Biol Int. 2007 Oct; 31(10):1265-73
- Mitre-Aguilar IB, Cabrera-Quintero AJ, Zentella-Dehesa A. ***Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer.*** Int J Clin Exp Pathol 2015 8(1):1-10.
- Moutsatsou P, Kassi E, Papavassiliou AG ***Glucocorticoid receptor signaling in bone cells.*** Trends Mol Med. 2012 Jun; 18(6):348-59.
- Netherton C1, Goodyer I, Tamplin A, Herbert J. ***Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone in relation to puberty and gender*** Psychoneuroendocrinology. 2004 Feb;29(2):125-40.
- O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS ***Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength.*** Endocrinology. 2004 Apr; 145(4):1835-41

- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA ***The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function.*** J. Biol. Chem. 1996;271:9550–9559
- Olefsky JM. ***Nuclear receptor minireview series.*** J. Biol. Chem. 2001 276 (40): 36863–4.
- Orazizadeh M, Khorsandi LS, Hashemitabar M ***Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells.*** Andrologia. 2010 Aug; 42(4):247-53.
- Ortsäter Henrik, Sjöholm Åke and Rafacho Alex. ***Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess*** 2012 InTeck .
- Orzechowski A, Jank M, Gajkowska B, Sadkowski T, Godlewski MM, Ostaszewski P ***Delineation of signalling pathway leading to antioxidant-dependent inhibition of dexamethasone-mediated muscle cell death.*** J Muscle Res Cell Motil. 2003; 24(1):33-53
- P K Panegyres, M Squier, K R Mills, and J Newsom-Davis ***Acute myopathy associated with large parenteral dose of corticosteroid in myasthenia gravis*** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1993 Jun; 56(6): 702–704.
- Peter J Barnes ***How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005*** Br J Pharmacol. 2006 Jun; 148(3): 245–254
- Petronelli A, Pannitteri G, Testa U ***Triterpenoids as new promising anticancer drugs.*** Anticancer Drugs. 2009 Nov; 20(10):880-92..
- Poulain M, Frydman N, Duquenne C, N'Tumba-Byn T, Benachi A, Habert R, Rouiller-Fabre V, Livera G ***Dexamethasone induces germ cell apoptosis in the human fetal ovary.*** J Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct; 97(10):E1890-7.
- Psarra AM, Sekeris CE.. ***Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor.*** Elsevier B.V. 2011 1813(10):1814-21.
- Purnell, J.Q., Brandon, D.D., Isabelle, L.M., Loriaux, D.L. and Samuels, M.H., ***Association of 24-hour cortisol production rates, cortisol-binding globulin, and plasma-free cortisol levels with body composition, leptin levels, and aging in adult men and women*** J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89, 281-287.
- R Turner and E Elson ***Sleep disorders. Steroids cause sleep disturbance*** BMJ. 1993 May 29; 306(6890): 1477–1478
- Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Bosqueiro JR. ***Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance.*** Pancreas. 2008 Apr;36(3):284-93. doi: 10.1097/MPA.0b013e31815ba826.
- Ranta F, Avram D, Berchtold S, Düfer M, Drews G, Lang F, Ullrich S ***Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4.*** Diabetes. 2006 May; 55(5):1380-90.
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G. ***DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival*** 1998 Cell 93(4):531-41.
- Reichardt M.H., Tuckermann P.J., Bauer A., Schütz G. ***Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo.*** Zeitschrift für Rheumatologie. Volume 59, Issue 2 Supplement, 2000 pp S1-S5.

- Rockall AG1, Sohaib SA, Evans D, Kaltsas G, Isidori AM, Monson JP, Besser GM, Grossman AB, Reznick RH. **Hepatic steatosis in Cushing's syndrome: a radiological assessment using computed tomography.** Eur J Endocrinol. 2003 Dec;149(6):543-8.
- S. E. P. Miller and J. McE. Neilson **Clinical Features of the Diabetic Syndrome Appearing after Steroid Therapy** Postgrad Med J. 1964 Nov; 40(469): 660–669
- Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES **Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation.** J Biol Chem. 1999 Jun 18; 274(25):17941-5.
- Sambrook J, Green R. Michael, MacCallum Pete. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press r (2000).
- Siamak Moghadam-Kia and Victoria P. Werth **Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects** Int J Dermatol. 2010 Mar; 49(3): 239–248.
- Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. **Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index.** Mol Cell Endocrinol. 2007 275(1-2):109-17.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. **Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids** Pharmacol Ther. 2002 Oct;96(1):23-43 Nat Clin Pract Rheumatol. 2008 Oct;4(10):525-33. doi: 10.1038/ncprheum0898. Epub 2008 Sep 2.
- Schlossmacher G, Stevens A, White A. **Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells.** J Endocrinol. 2011 Oct;211(1):17-25.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ.. **Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.** J Biol Chem. 2001 276(10):7320-6.
- Smith LK, Shah RR, Cidlowski JA **Glucocorticoids modulate microRNA expression and processing during lymphocyte apoptosis.** J Biol Chem. 2010 Nov 19; 285(47):36698-708
- Stahn C, Buttgereit F. **Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids**
- Stojanovska L1, Rosella G, Proietto J. **Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats** Am J Physiol. 1990 May;258(5 Pt 1):E748-56.
- Sultana N, Ata A **Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds.** J Enzyme Inhib Med Chem. 2008 Dec 23(6):739-56
- Vegiopoulos A. & Herzig S. **Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases** 2007 Mol Cell Endocrinol. 2007 Sep 15;275(1-2):43-61. Epub 2007 Jun 2.
- Vogt CJ, Schmid-Schönbein GW **Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat.** Microcirculation. 2001 Apr; 8(2):129-39.
- Waddell BJ, Hiseh S, Dharmarajan AM, Burton PJ **Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids.** Biol Reprod. 2000 Dec; 63(6):1913-7.
- Wajchenberg BL, Prestes Cesar F, Okada H, Torres de Toledo e Souza I, Lerário AC, Borghi VC, Malerbi DA, Giurna Filho A, Liberman B, Gianella D. **Glucocorticoids, glucose metabolism and hypothalamic-pituitary-adrenal axis** Adv Exp Med Biol. 1984;171:25-44
- Woodward MJ, de Boer J, Heidorn S, Hubank M, Kioussis D, Williams O, Brady HJ **Tnfrsf8 is an essential gene for the regulation of glucocorticoid-mediated apoptosis of thymocytes.** Cell Death Differ. 2010 Feb; 17(2):316-23.
- Wordinger RJ, Clark AF **Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma.** Prog Retin Eye Res. 1999 Sep; 18(5):629-67.

- Yan XJ, Gong LH, Zheng FY, Cheng KJ, Chen ZS, Shi Z. **Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment.** Drug Discov Today 2014 19(4):482-8.
- Zaman F, Chrysis D, Huntjens K, Fadeel B, Sävendahl L. **Ablation of the pro-apoptotic protein Bax protects mice from glucocorticoid-induced bone growth impairment.** PLoS One. 2012; 7(3):e33168.
- Zhenfeng Duan, Rachel Ames, Meagan Ryan, Francis J. Hornicek, Henry Mankin, and Michael V. Seiden **CDDO-Me, a synthetic triterpenoid, inhibits expression of IL-6 and Stat3 phosphorylation in multi-drug resistant ovarian cancer cells.** Cancer Chemother Pharmacol. 2009 Mar; 63(4): 681–689.
- Zhou JY, Zhong HJ, Yang C, Yan J, Wang HY, Jiang JX **Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress.** Br J Surg. 2010 Feb; 97(2):281-93.
- Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκάνη- Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α. **Φυσιολογία Φυτών Από το μόριο στο περιβάλλον.** 2009 .Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Σμοκοβίτης Αθανάσιος **Φυσιολογία** 2007 Θεσσαλονίκη: Αδερφών Κυριακίδη α.ε.