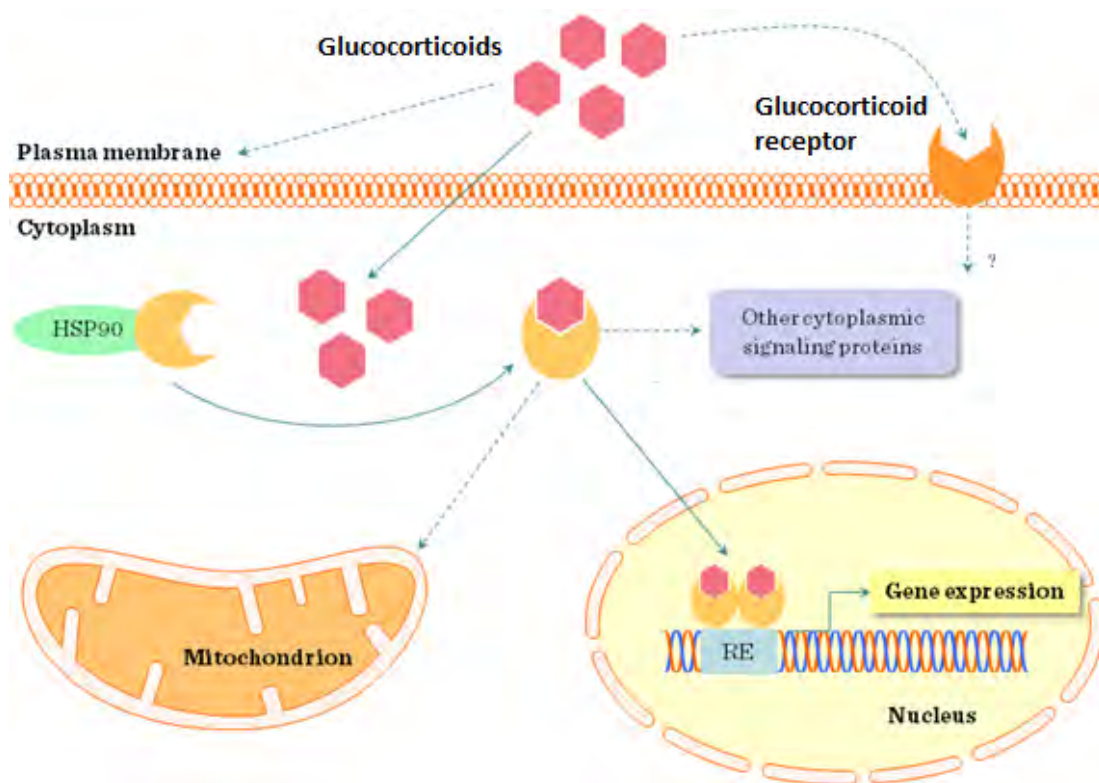




Διπλωματική εργασία

Διερεύνηση του ρόλου του μιτοχondριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών
Evaluation of the role of the mitochondrial glucocorticoid receptor



Όνοματεπώνυμο: Γιαννάκου Μαρίνα

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δρ. Άννα- Μαρία Ψαρρά

Λάρισα 2018

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

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

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

Τριμελής Επιτροπή:

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

Δήμας Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Π.Θ.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού, ΤΒΒ, Π.Θ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς, NRs (Nuclear Receptors).....	8
1.1.1 Γενικά.....	8
1.1.2 Ταξινόμηση των πυρηνικών υποδοχέων.....	8
1.1.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων.....	8
1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών.....	9
1.3 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών, GR (Glucocorticoid Receptor).....	10
1.3.1 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	10
1.3.2 Εναλλακτικά μετάγραφα και ισομορφές του GR.....	11
1.3.3 Ο ρόλος της σηματοδότησης του GR στις ασθένειες και στην υγεία.....	12
1.3.4 Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα.....	12
1.4 Ο Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor).....	14
1.4.1 Μιτοχόνδρια.....	14
1.4.2 Δράσεις του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα ηπατοκύτταρα.....	14
1.5 Απόπτωση.....	16
1.5.1 Γενικά.....	16
1.5.2 Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης (extrinsic pathway).....	16
1.5.3 Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης (intrinsic pathway).....	16
1.5.4 Ιστοειδική αποπτωτική δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	18
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	19
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	20
3.1 Οργανολογία.....	20
3.2 Υλικά.....	20
3.2.1 Χημικά.....	20
3.2.2 Διαλύματα.....	21
3.2.3 Αντισώματα.....	23
3.2.4 Αναλώσιμα.....	24
3.2.5 Κυτταρικές σειρές.....	24
3.2.6 Ιστοί.....	25
3.3 Τεχνικές.....	25
3.3.1 Λύση με χρήση υπερήχων (Sonication).....	25
3.3.2 Μέτρηση συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (Μέθοδος Bradford).....	25
3.3.3 Παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδιου.....	26
3.3.4 Ηλεκτροφόρηση, εξισορρόπηση και ηλεκτρομεταφορά.....	27
3.3.5 Blocking με γάλα και επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα.....	27
3.3.6 Εμφάνιση σήματος (Western Blotting).....	27
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4.1 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αφυδρογονάσης μηλικού -2 (MDH-2) σε εκχυλίσματα ιστού.....	28

4.2 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κιτρικής συνθάσης (citrate synthase) σε εκχυλίσματα ιστού.....	30
4.3 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 (procaspase-3) σε εκχυλίσματα ιστού.....	32
4.4 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-XL/S σε εκχυλίσματα ιστού.....	34
5. ΣΥΖΥΤΗΣΗ.....	36
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας μου κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της, καθώς και για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για την έμπρακτη υποστήριξη της. Κυρίως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για τη ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στο εργαστήριο της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και στην ερευνητική της ομάδα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, την κ. Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ Καρρά Αικατερίνη για την πολύτιμη βοήθεια και την υπομονή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η καθοδήγηση της συνέβαλε στη σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία μας.

Τέλος, φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη τους και την υπομονή τους για όλο το ταξίδι της φοίτησης μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και για την υποστήριξη τους κατά την εκπόνηση της ερευνητικής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχών περιλαμβάνει υποδοχείς στους οποίους συνδέονται στεροειδείς ορμόνες όπως τα γλυκοκορτικοειδή. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή συνδέονται στον υποδοχέα τους, στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, αυτός μετατοπίζεται στον πυρήνα ή στο μιτοχόνδριο και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Μπορεί όμως να δράσει και μη γονιδιωματικά. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί επίσης να μεταβάλλει την ισορροπία των προ- και αντι- αποπτωτικών πρωτεϊνών και αυτό εξαρτάται από τον τύπο του ιστού και του κυττάρου. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να εξετασθεί ο ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η απόπτωση. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών, κιτρικής συνθάσης και αφυδρογονάσης του μηλικού -2 που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και των πρωτεϊνών, προκασπάσης -3 και Bcl-xL που συμμετέχουν στον αποπτωτικό μηχανισμό, μέσω western blotting. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα ποντικών που εμβολιάστηκε με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR, που υπερεκφράζει την χιμαιρική GFPGR πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση, και άλλη μία ομάδα που εμβολιάστηκε με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFP, που υπερεκφράζει την GFP πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση και χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρική σειρά μάρτυρας. Από τους όγκους που δημιουργήθηκαν μελετήθηκαν πέντε από τη μία ομάδα και πέντε από την άλλη. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών, κιτρικής συνθάσης και αφυδρογονάσης του μηλικού -2 ήταν αυξημένα στους όγκους που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-xL και μία τάση μείωσης των επιπέδων έκφρασης της προκασπάσης -3, που δεν είναι στατιστικά σημαντική σε κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων της κυτταρικής σειράς HEPG2mtGFPGR σε σχέση με αυτούς της κυτταρικής σειράς HEPG2mtGFPC2. Λαμβάνοντας υπ όψιν την συμμετοχή του μιτοχονδριακού υποδοχέα στην ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν την θεωρία συντονισμού πυρηνικής και μιτοχονδριακής μεταγραφής για τη σύνθεση μιτοχονδριακών ενζύμων όπως τα ένζυμα του κύκλου Krebs, ώστε να επιτευχθεί η εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία. Επίσης, η ενεργοποίηση του κύκλου του Krebs έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω της παραγωγής μεταβολικών ενδιάμεσων, δηλαδή των δομικών λιθών, που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία νέων κυττάρων. Επιπρόσθετα, καταλήγουμε ότι λόγω της δημιουργίας μεγαλύτερου σε διάμετρο όγκου στα ποντίκια που εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR, η προκαλούμενη από τα γλυκοκορτικοειδή απόπτωση δεν συμμετέχει στη δημιουργία μικρότερου σε διάμετρο όγκου όπως θα ήταν το αναμενόμενο. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από την πιθανή επαγωγή οξειδωτικού στρες λόγω υπερλειτουργίας των μιτοχονδρίων, που αυτό ευνοεί τη ανάπτυξη όγκων και τον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τέλος, πιθανόν το κύτταρο προσπαθεί να ισορροπήσει τους μηχανισμούς της απόπτωσης και της κυτταρικής επιβίωσης μέσω των επιπέδων των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Λέξεις- κλειδιά

Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, γλυκοκορτικοειδή, μιτοχόνδριο, κύκλος του κιτρικού οξέος, απόπτωση

ABSTRACT

The superfamily of nuclear receptors includes receptors to whom steroid hormones such as glucocorticoids are linked. When glucocorticoids bind to their receptor, a glucocorticoid receptor, the receptor translocates to the nucleus or mitochondria and acts as a transcription factor. He may also act non-genomically. The glucocorticoid receptor may also alter the balance of pre- and anti-apoptotic proteins, depending on the type of tissue and cell. The aim of this study is to investigate the role of the mitochondrial glucocorticoid receptor in cellular processes such as the citric acid cycle and apoptosis. So, a study was carried out, to measure the expression level of the proteins, citrate synthase and malate dehydrogenase-2 which are involved in the cycle of citric acid and Procaspase-3 and Bcl-xL proteins which are involved in the apoptotic mechanism, via western blotting. For this purpose, a group of mice was vaccinated with the HEPG2mtGFPGR cell line, which overexpresses the chimeric GFPGR protein with mitochondrial targeting and another group was vaccinated with the HEPG2mtGFP cell line, which overexpresses the GFP protein with mitochondrial targeting used as a reference cell line. From the tumors that were generated, five from one group and five from the other group were studied. The results of this study demonstrated that the protein expression levels of citrate synthase and malate-2 dehydrogenase were increased in tumors resulting from vaccination with the HEPG2mtGFPGR cell line compared to the reference tumors. In addition, in the HEPG2mtGFPGR cell line there was observed a decrease in the expression levels of the protein Bcl-xL, while also there was a, not so statistically significant, tendency of decrease in the expression levels of the protein Procaspase-3, in comparison to the cell line HEPG2mtGFPC2. Taking into account the involvement of the mitochondrial receptor in the regulation of mitochondrial transcription, our results confirm the theory of coordination of nuclear and mitochondrial transcription for the synthesis of mitochondrial enzymes such as the enzymes of the Krebs's cycle in order to achieve proper mitochondrial function. Also, activation of the Krebs's cycle contributes to the proliferation of cancer cells through the production of metabolic intermediates, which are essential for the creation of new cancer cells. Additionally, we conclude that due to the creation of a larger tumor in the mice inoculated with the HEPG2mtGFPGR cell line, glucocorticoid pretreated apoptosis does not participate in the generation of a smaller tumor than would be expected. This can be explained by the potential induction of oxidative stress due to increased mitochondria over-operation, which favors tumor growth and excessive cellular proliferation. Finally, it is likely that the cell attempts to balance the mechanisms of apoptosis and cell survival through the levels of pre-apoptotic and anti-apoptotic proteins.

Key words

Glucocorticoid receptor, Glucocorticoids, mitochondrion, cycle of citric acid, apoptosis

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς, NRs (Nuclear Receptors)

1.1.1 Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μία από τις πλέον άφθονες κατηγορίες μεταγραφικών ρυθμιστών στα ζώα. Ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες, όπως την ομοίωση, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Οι πυρηνικοί υποδοχείς λειτουργούν ως προσδετο-εξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες και γι' αυτό συνδέονται με μόρια σηματοδότησης που ελέγχουν τις εκάστοτε διεργασίες και μεταγραφικές αποκρίσεις (Rechavi M.R. et al. 2003). Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων περιλαμβάνει υποδοχείς στους οποίους συνδέονται υδρόφοβα μόρια όπως στεροειδείς ορμόνες (π.χ. οιστρογόνα, γλυκοκορτικοειδή, προγεστερόνη, μεταλλοκορτικοειδή, ανδρογόνα, βιταμίνη D3, εκδυσόνη, οξυστερόλες και χολικά οξέα), ρητινοϊκά οξέα, θυρεοειδής ορμόνες, λιπαρά οξέα, λευκοτριένια και προσταγλανδίνες (Laudet V., et al. 2002). Ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών υποδοχέων ταυτοποιήθηκαν μέσω ομοιότητας της αλληλουχίας τους με γνωστούς υποδοχείς, αλλά δεν έχουν αναγνωρισμένο φυσικό προσδέτη και αναφέρονται ως «πυρηνικοί ορφανοί υποδοχείς». Οι πυρηνικοί υποδοχείς δεσμεύουν μικρά μόρια που μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν για τον σχεδιασμό φαρμάκων και έτσι να γίνεται έλεγχος διαφόρων ασθενειών (π.χ. καρκίνο, οστεοπόρωση και διαβήτη) (Rechavi M.R., et al. 2003).

1.1.2 Ταξινόμηση των πυρηνικών υποδοχέων

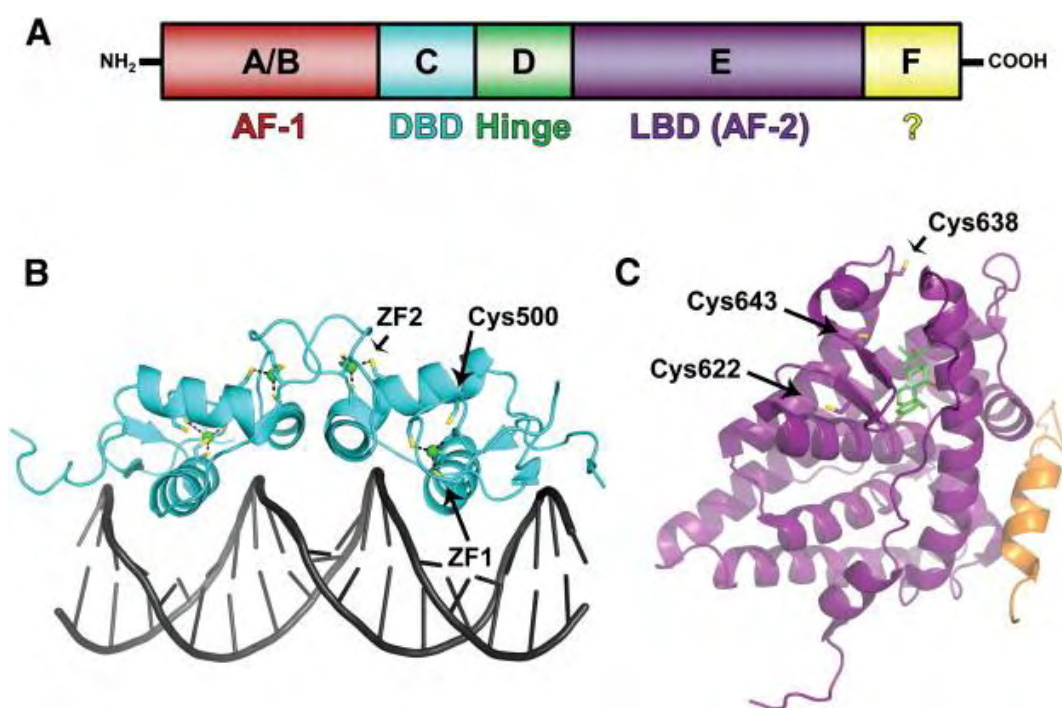
Οι υποδοχείς μπορούν να υπάρχουν ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και να αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA που ορίζονται ως στοιχεία απόκρισης ορμόνης (hormone response elements, HREs) (Sever R. and Glass C.K., 2013). Συγκεκριμένα, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- ❖ Οι υποδοχείς τύπου I, όπως ο υποδοχέας ανδρογόνων, οιστρογόνων, προγεστερόνης και γλυκοκορτικοειδών (Echeverria P.C. and Picard D., 2010). Η δέσμευση του προσδέτη επιτρέπει τον ομοδιμερισμό τους (Jepsen K. et al., 2000, Bulynko Y.A. and O'Malley B.W., 2011).
- ❖ Οι υποδοχείς Τύπου II, όπως ο υποδοχέας θυρεοειδούς ορμόνης και ο υποδοχέας ρητινοϊκού οξέος (RXR), οι οποίοι βρίσκονται στον πυρήνα και συνδέονται με τα ειδικά στοιχεία απόκρισης DNA ακόμη και εν απουσία του προσδέτη. Συνήθως, σχηματίζουν ετεροδιμερή συμπλέγματα (Sever R. and Glass C.K., 2013).
- ❖ Οι υποδοχείς τύπου III λειτουργούν παρόμοια με τους υποδοχείς τύπου I εκτός από το ότι η οργάνωση του HRE διαφέρει (Mangelsdorf D.J. et al., 1995).
- ❖ Οι υποδοχείς τύπου IV δρουν ως μονομερή (Mangelsdorf D.J. et al., 1995).

1.1.3 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν μία χαρακτηριστική δομή που αποτελείται από πέντε έως έξι ομόλογες επικράτειες (ονομαζόμενες A-F, από το αμινοτελικό στο καρβοξυτελικό άκρο) με βάση τις επικράτειες συντηρημένης αλληλουχίας και λειτουργίας (Εικόνα 1). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD, επικράτεια C) είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή και κωδικοποιεί δύο μονάδες δακτύλου ψευδαργύρου (Germain P. and Bourguet W., 2013). Σύμφωνα με την τρισδιάστατη δομή της περιοχής

δέσμευσης στο DNA, στις δύο μονάδες ψευδαργύρου περιέχονται 4 κυστεΐνες που δεσμεύουν από ένα ιόν ψευδαργύρου, Zn^{2+} (C-X2-C-X13-C-X2-C και C-X5-C-X9-C-X2-C). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA περιέχει κυρίως το P-box, μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που έχει το μοτίβο AGGTCA και είναι υπεύθυνη για την εξειδικευμένη πρόσδεση στο DNA και για τον διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων. Αυτός ο διμερισμός περιλαμβάνει ομο-διμερή καθώς και ετερο-διμερή. Η περιοχή δέσμευσης προσδέτη (LBD, επικράτεια E), ονομαζόμενη AF-2, είναι λιγότερο συντηρημένη και μετά την δέσμευση του προσδέτη προκαλεί διμερισμό και trans-ενεργοποίηση των υποδοχέων που εξαρτάται από τους προσδέτες. Επιπλέον, η επικράτεια E είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα μέσω μιας αλληλουχίας NLS (nuclear localization signal). Η δευτεροταγής δομή της είναι περισσότερο συντηρημένη από την πρωτοταγή και περιλαμβάνει 12 α -έλικες (Rechavi M.R et al., 2003). Όσον αφορά την αμινοτελική περιοχή A-B, αυτή προκαλεί trans-ενεργοποίηση ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και τον προαγωγέα και ονομάζεται AF-1. Η επικράτεια D θεωρείται ως περιοχή άρθρωσης (hinge region). Τέλος, η επικράτεια F δεν υπάρχει σε όλους τους υποδοχείς και η λειτουργία της είναι ελάχιστα κατανοητή (Germain P. and Bourguet W., 2013).



Εικόνα 1. Δομική οργάνωση πυρηνικών υποδοχέων.

A) Σχηματική αλληλουχία αμινοξέων πρωτοταγής δομής (1D) ενός πυρηνικού υποδοχέα.

B) Τριτοταγής δομές (3D) της DBD (δεσμευμένης στο DNA) και C) της LBD (δεσμευμένης σε ορμόνη) περιοχές του πυρηνικού υποδοχέα. Οι δομές που παρουσιάζονται είναι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. (Carter E. L., 2014)

1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων, στις γονάδες και στον πλακούντα. Το κοινό πρόδρομο μόριο όλων των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη. Επειδή όλες οι στεροειδείς ορμόνες προέρχονται από τη χοληστερόλη, δεν είναι διαλυτές στο πλάσμα και σε άλλα σωματικά υγρά. Ως αποτέλεσμα, τα στεροειδή δεσμεύονται σε πρωτεΐνες- μεταφοράς (Holst J. P. et al., 2013). Τέτοιες πρωτεΐνες-μεταφοράς μπορεί να είναι η τρανσκορτίνη και η αλβουμίνη. Η αδρανοποίησή τους πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ, στους νεφρούς και σε άλλους ιστούς-στόχους. Υπάρχουν τέσσερις

κύριοι τύποι στεροειδών: προγεστερόνες, ανδρογόνα, οιστρογόνα και κορτικοειδή (Zubeldia-Brenner L., 2016). Η προγεστερόνη, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα εκκρίνονται από τις γονάδες, ενώ τα κορτικοειδή που διαχωρίζονται σε γλυκοκορτικοειδή και μεταλλοκορτικοειδή εκκρίνονται από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων. Επίσης, στις στεροειδείς ορμόνες συγκαταλέγεται και η βιταμίνη D. Τέλος, οι στεροειδείς ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, την αύξηση, την ανάπτυξη και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Psarra A.M and Sekeris C.E., 2008).

Όσον αφορά τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών αυτοί περιλαμβάνουν, τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ), γλυκοκορτικοειδών (GR), μεταλλοκορτικοειδών, προγεστερόνης (PR) και ανδρογόνων (AR) (Zheng Y. and Murphy L.C., 2016). Οι υποδοχείς αυτοί έχουν συγκεκριμένες κυτταρικές κατανομές. Οι PR και ER βρίσκονται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων-στόχων, ενώ η πλειονότητα των GR και AR βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων (Ward R.D. and Weigel N.L., 2009). Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, ενεργοποιούνται μετά από την δέσμευση των στεροειδών ορμονών, οι οποίες κινούνται παθητικά από τον κυκλοφοριακό και διάμεσο χώρο μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών. (Zubeldia-Brenner L.et al., 2016). Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών διαμεσολαβούν σε πολυάριθμες κρίσιμες βιολογικές διεργασίες και λειτουργούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές στον πυρήνα. Στην ανενεργή τους κατάσταση σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperons), όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90, (heat shock protein 90, Hsp90) (Beato M. and Klug J. et al. 2000).

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο σηματοδότησης του υποδοχέα στεροειδών, τα στεροειδή εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της πλασματικής μεμβράνης και δεσμεύονται στους υποδοχείς τους που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με στεροειδή μεταφέρονται στον πυρήνα (στην περίπτωση υποδοχέων που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα) και δεσμεύονται σε ειδικές αλληλουχίες DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HREs) για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων. Αυτό οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση mRNA, οι οποίες συνήθως αλλάζουν την πρωτεϊνική έκφραση και τελικά επηρεάζουν την κυτταρική βιολογία. Εναλλακτικά, οι υποδοχείς στεροειδών μπορούν να ρυθμίζουν τη μεταγραφή μέσω ενός έμμεσου μηχανισμού, μέσω του οποίου οι υποδοχείς δεν δεσμεύονται άμεσα με το DNA αλλά αντ' αυτού αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που είναι συνδεδεμένοι με DNA ή συν-ρυθμιστές (Levin E.R. and Hammes S.R., 2016).

1.3 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών, GR (Glucocorticoid Receptor)

1.3.1 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Ο GR είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει μια αμινοτελική περιοχή trans-ενεργοποίηση (NTD), μία κεντρική περιοχή δέσμευσης DNA (DBD), μία καρβοξυ-τελική περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD) και μια εύκαμπτη "περιοχή άρθρωσης" που διαχωρίζει την DBD από την LBD (Εικόνα 2). Η NTD έχει ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF1), η οποία επιτρέπει την στρατολόγηση συν-ρυθμιστών. Μεταξύ των 48 μελών της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, η DBD είναι η πλέον συντηρημένη περιοχή. Τα δύο μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου που υπάρχουν στη DBD αναγνωρίζουν και δεσμεύουν ειδικές αλληλουχίες DNA στα γονίδια-στόχους που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs). Μετά τη δέσμευση του προσδέτη, η LBD η οποία περιέχει λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF2), αλληλεπιδρά με τους συν-ρυθμιστές. Η καθεμία περιοχή DBD, περιοχή άρθρωσης και

η LBD, περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού που επιτρέπει την μετατόπιση στον πυρήνα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από importins (Kadmiel M. and Cidlowski J., 2013).

1.3.2 Εναλλακτικά μετάγραφα και ισομορφές του GR

Ο GR είναι ένας υποδοχέας στεροειδούς ορμόνης που μετά την σύνδεση του προσδέτη μετατοπίζεται στον πυρήνα και επιδρά σε γονιδιωματικό και μη γονιδιωματικό επίπεδο. Το ανθρώπινο γονίδιο NR3C1 περιέχει 9 εξόνια με την περιοχή που κωδικοποιεί για πρωτεΐνη να σχηματίζεται από τα εξόνια 2-9 (Kadmiel M. and Cidlowski J., 2013). Το εξόνιο 1 σχηματίζει την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο GR (hGR) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 στους τόπους 31 - 32 (5q31 ± 32) (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A., 2013). Έχουν χαρακτηριστεί δύο ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών λόγω εναλλακτικού ματίσματος: ο GRα και ο GRβ, που είναι προϊόντα του ίδιου γονιδίου, αποτελούμενο από οκτώ κοινά και το ένατο εξόνιο που είναι διαφορετικό (9α και 9β) (Psarra A.M et al., 2005). Οι GRγ, GR-A και GR-P είναι άλλες ισομορφές που είναι λιγότερο χαρακτηρισμένες και δεν έχουν ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Η ισομορφή GRα επίσης έχει εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης στο εξόνιο 2, δημιουργώντας οκτώ επιπρόσθετες ισομορφές GR με διαφορετικά αμινοτελικά άκρα (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D2 και GRα-D3). Η GRβ μπορεί επίσης να παράγει οκτώ ισομορφές β παρόμοιες με την hGRα (Kadmiel M. and Cidlowski J., 2013).

Η ισομορφή, η οποία εκφράζεται περισσότερο είναι η hGRα και είναι υπεύθυνη για την κλασική σηματοδότηση και τη διαμόρφωση των γονιδιακών μεταγραφών, ενώ ο ρόλος της ισομορφής hGRβ είναι λιγότερο καθορισμένος και μπορεί να λειτουργήσει ως κυρίαρχος αρνητικός αναστολέας της σηματοδότησης hGRα (Psarra A.M et al., 2005). Η ισομορφή hGRα συνδέεται με γλυκοκορτικοειδή, μετατοπίζεται στον πυρήνα και στρατολογεί συν-ρυθμιστές για την άσκηση μεταγραφικών αποκρίσεων. Εντούτοις, η ισομορφή hGRβ παραμένει σταθερά στον πυρήνα. Η ισομορφή hGRβ μπορεί να ρυθμίζει άμεσα γονίδια που δεν ρυθμίζονται από την ισομορφή hGRα. Αν και δεν έχει αναφερθεί ότι ο hGRβ δεσμεύεται με αγωνιστές γλυκοκορτικοειδών, ένας ανταγωνιστής RU486 (μιφεπριστόνη) έχει δείξει ότι δεσμεύεται σε αυτόν και ρυθμίζει την μεταγραφική του δράση (Kadmiel M. and Cidlowski J., 2013). Ο GRβ δεν ενεργοποιείται με τη σύνδεση προσδέματος και οι βιολογικές του επιδράσεις πιθανόν οφείλονται στο μη ενεργό σχηματισμό διμερών με τον GRα, ή σε ανταγωνισμό με τον GRα για θέσεις σύνδεσης στο DNA ή για μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται με τον GRα (Psarra A.M et al., 2005).

Glucocorticoid Receptor Gene



Glucocorticoid Receptor Alpha



Glucocorticoid Receptor Beta



Alternative Translation Initiation Sites



Εικόνα 2. Ο GR περιέχει 9 εξώνια: τα εξώνια 2-9 αποτελούν την κωδικεύουσα περιοχή που θα δώσει την πρωτεΐνη και το εξώνιο 1 σχηματίζει την 5'-αμετάφραση περιοχή. Ο GR υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα και δίνει γένεση στις hGRα και hGRβ ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στο C-τελικό άκρο. Ο GR περιέχει μία NH₂-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης, DBD, LBD και μία hinge region που διαχωρίζει την DBD και LBD. Η ισόμορφη GRα επίσης έχει εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης στο εξόνιο 2, δημιουργώντας οκτώ επιπρόσθετες ισομορφές GR με διαφορετικά αμινοτελικά άκρα (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D2 και GRα-D3). Η GRβ μπορεί επίσης να παράγει οκτώ ισομορφές β παρόμοιες με την hGRα (Kadmiel M. and Cidlowski J., 2013).

1.3.3 Ο ρόλος της σηματοδότησης του GR στις ασθένειες και στην υγεία

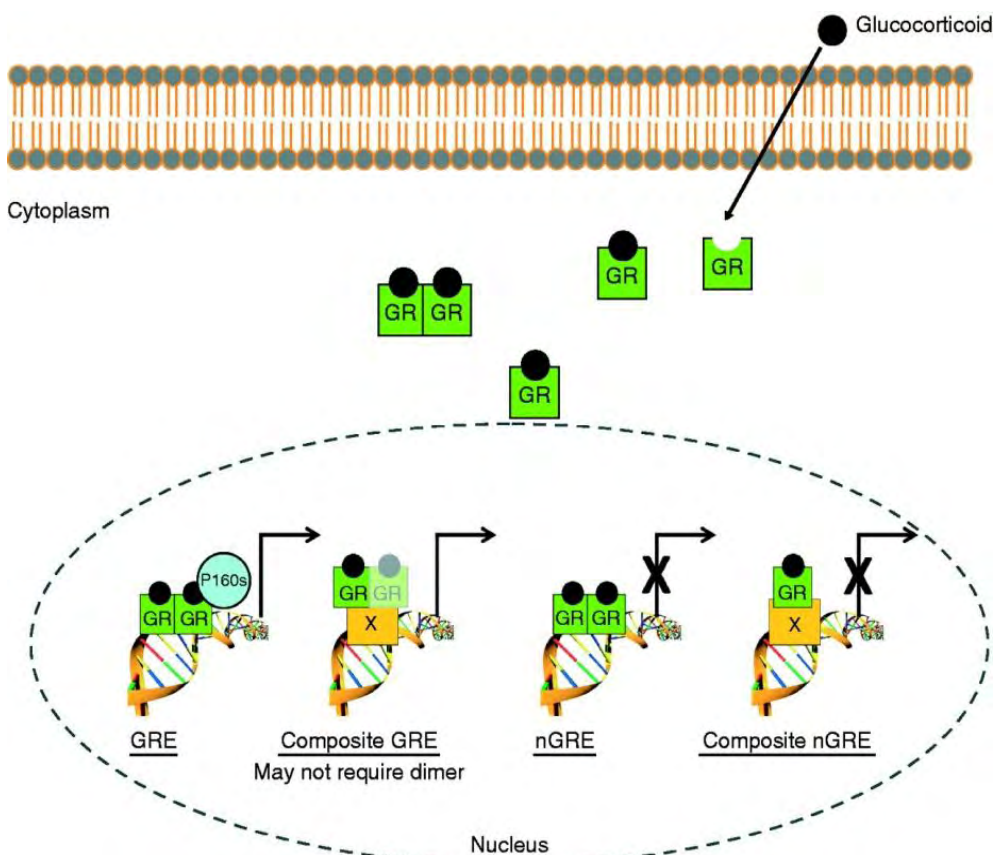
Οι ισομορφές GR εκφράζονται σε σχεδόν όλους τους τύπους ιστών και η σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών είναι σχεδόν παντού διαδεδομένη στα διάφορα συστήματα οργάνων. Αρχικά, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν αύξηση της απελευθέρωσης γλυκόζης στο αίμα, λόγω της επαγωγής της γλυκονεογένεσης στα ηπατοκύτταρα και καθιστά αποτελεσματικότερη τη δράση άλλων υπεργλυκαιμικών ορμονών όπως η γλυκαγόνη. Έτσι, με την υπέρμετρη αύξηση της γλυκόζης στο αίμα μπορεί να προκληθεί διαβήτης, ενώ με τη μείωση της μπορεί να προκληθεί υπογλυκαιμία. Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αντιφλεγμονώδη, αντι-πολλαπλασιαστική, προ-αποπτωτική και αντι-αγγειογενετική δράση και γι' αυτό το λόγο είναι αποτελεσματικά σε θεραπείες διαφόρων ασθενειών και έχουν βρεθεί στην πρώτη γραμμή της βασικής επιστήμης και φαρμακευτικής έρευνας τις τελευταίες δεκαετίες (Kadmiel M. and Cidlowski J.A., 2013).

1.3.4 Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα

Τα γλυκοκορτικοειδή συνδέονται στο GR, ο οποίος στη συνέχεια λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και έχει επιδράσεις στο γονιδίωμα, ωστόσο έχει επιδράσεις και μη γονιδωματικά με τη μεσολάβηση διαμεμβρανικών υποδοχέων και τον καταρράκτη σηματοδότησης τους. Οι γονιδιωματικές δράσεις των

GCs διαμεσολαβούνται από την πυρηνική μετατόπιση του GR (Εικόνα 3). Απουσία των GCs, ο κυτταροπλασματικός GR σχηματίζει ένα ετεροσύμπλεγμα με πρωτεΐνες-chaperones που διατηρεί τον GR σε αδρανή κατάσταση (Schlossmacher G. et al., 2011). Το ανενεργό σύμπλοκο αποτελείται από τον υποδοχέα, την Hsp90, Hsp70, p60, p23 και FKBP51 (Dittmar K. et al., 1998). Μετά τη δέσμευση των GCs, ο GR διαχωρίζεται από τις πρωτεΐνες-chaperones, ομοδιμερίζεται μέσω των περιοχών δέσμευσης του προσδέτη (LBD) στο καρβοξυ-τελικό άκρο και μετατοπίζεται στον πυρήνα. Όταν βρίσκεται στον πυρήνα, ο GR μπορεί στη συνέχεια να δρα είτε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας ανάλογα με το γονίδιο και το κυτταρικό περιβάλλον (Schlossmacher G. et al., 2011).

Τα διμερή του GR δεσμεύονται με τα στοιχεία απόκρισης σε GCs (GREs) που υπάρχουν στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων-στόχων. Μόλις συνδεθεί στα GREs, ο GR στρατολογεί συν-ενεργοποιητές που ανοίγουν τη δομή της χρωματίνης όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης. Αυτοί περιλαμβάνουν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών r160 (SRC1, PGC1, AIB1, κλπ.). Η ενεργοποίηση της μεταγραφής μπορεί συνήθως να παρατηρηθεί λίγες ώρες μετά τη σύνδεση των GCs (Dean D.M. and Sanders M.M., 1996). Ο GR μπορεί επίσης να ενεργοποιεί τη γονιδιακή μεταγραφή χρησιμοποιώντας μηχανισμούς διαφορετικούς από τα κλασικά GREs. Στα σύνθετα ρυθμιστικά στοιχεία (composite GREs), ο GR αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στο DNA όπως ο c-Myb (Schlossmacher G. et al., 2011). Ο GR που είναι συνδεδεμένος με GCs μπορεί επίσης να καταστείλει τα γονίδια-στόχους μέσω παρόμοιων μηχανισμών με εκείνους που χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, δηλ. την άμεση δέσμευση στο DNA μέσω "negative" GREs (nGREs). Αυτό οδηγεί στη στρατολόγηση συν-κατασταλτικών πρωτεϊνών όπως οι απακετυλάσες ιστονών, για παράδειγμα NCoR και SMRT και έτσι η χρωματίνη σχηματίζει μια δομή που δεν ευνοεί τη μεταγραφή. Ο GR είναι επίσης ικανός να καταστείλει τη μεταγραφή, αλληλεπιδρώντας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες σε σύνθετα ρυθμιστικά στοιχεία (negative composite GREs).



Εικόνα 3. Σηματοδότηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μετατοπίζεται στον πυρήνα μετά τη δέσμευση του προσδέτη όπου θα δρα ως ένα ομο- ή ετερο-διμερές με ή χωρίς άλλους συν-παράγοντες για να καταστείλει ή να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (Schlossmacher G. et al., 2011).

1.4 Ο Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor, mtGR)

1.4.1 Μιτοχόνδριο

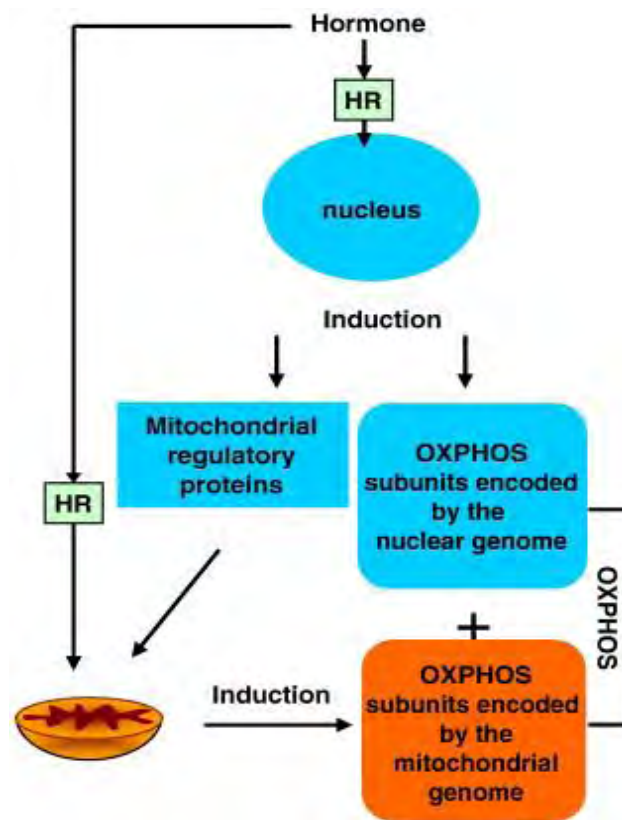
Τα μιτοχόνδρια είναι οι αποθήκες ενέργειας του κυττάρου, που παράγουν πάνω από το 90% των ενεργειακών τους απαιτήσεων μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Στα μιτοχόνδρια πραγματοποιούνται αρκετές άλλες σημαντικές μεταβολικές διεργασίες, π.χ. ο κύκλος του Krebs, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και η βιοσύνθεση της αίμης, παίζοντας έτσι κεντρικό ρόλο στις κυτταρικές διαδικασίες. Επιπλέον, εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS), στην ανοσοαπόκριση και στη γήρανση. Επομένως, αυτά τα μοναδικά οργανίδια καθίστανται σημαντικά για την δράση διαφόρων ρυθμιστικών σημάτων, ρυθμίζοντας τις μεταβολικές, αναπτυξιακές και αποπτωτικές διαδικασίες (Psarra A.-M. G. and Sekeris C. E., 2009).

Η περισσότερη ποσότητα ATP που παράγεται στον μεταβολισμό προκύπτει από τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης. Αυτή η διεργασία αρχίζει με την πλήρη οξείδωση των παραγώγων της γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα. Η συγκεκριμένη οξείδωση λαμβάνει χώρα στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι το κομβικό μεταβολικό σημείο του κυττάρου. Είναι η πύλη στον αερόβιο μεταβολισμό οποιουδήποτε μορίου μπορεί να μετασχηματιστεί σε μια ακετυλική ομάδα ή σε ένα συστατικό του κύκλου του κιτρικού οξέος. Ο κύκλος είναι πηγή πρόδρομων ενώσεων για δομικές μονάδες πολλών άλλων μορίων, όπως είναι τα αμινοξέα, οι νουκλεοτιδικές βάσεις, η χοληστερόλη και η πορφυρίνη (το οργανικό συστατικό της αίμης). Επίσης, το συστατικό του κύκλου του κιτρικού οξέος, το οξαλοξικό, είναι μία σημαντική πρόδρομη ένωση της γλυκόζης. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος, σε σύνδεση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, προμηθεύει το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας που χρησιμοποιείται από τα αερόβια κύτταρα. Είναι πολύ αποδοτικός διότι η οξείδωση ενός περιορισμένου αριθμού μορίων του κύκλου του κιτρικού οξέος μπορεί να παράγει μεγάλες ποσότητες NADH και FADH₂. (Stryer L.,2014).

1.4.2 Δράσεις του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα ηπατοκύτταρα

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες προκαλούν την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για ηπατικά ένζυμα μέσω της σύνδεσης τους σε προσδετο-εξαρτώμενους υποδοχείς. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σύνθεση του μιτοχονδριακού RNA ενεργοποιείται επίσης από ορμόνες. Αυτή η έντονη διέγερση των νουκλεϊνικών οξέων απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας, την οποία το κύτταρο πρέπει τελικά να αναπληρώσει. Η εμπλοκή της σύνθεσης μιτοχονδριακού RNA στην ορμονική απόκριση μπορεί να συσχετιστεί με τη διαδικασία αναγέννησης ενέργειας, καθώς ο μοναδικός λειτουργικός ρόλος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι η κωδικοποίηση υπομονάδων ενζύμων οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) και των RNA που συμμετέχουν στον μηχανισμό πρωτεϊνικής σύνθεσης του μιτοχονδρίου. Λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες από τις υπομονάδες OXPHOS κωδικοποιούνται πυρηνικά και απαιτούνται για το σχηματισμό ενεργών συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, απαιτείται ορμονικός συντονισμός της πυρηνικής και μιτοχονδριακής

μεταγραφής. Αυτός ο συντονισμός πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση πυρηνικά κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων η μετέπειτα αυξημένη παρουσία στα μιτοχόνδρια μπορεί να διεγείρει τον μηχανισμό μεταγραφής των οργανιδίων. Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν άμεσα στην μιτοχονδριακή μεταγραφή (Εικόνα 4). Αυτό βασίστηκε σε μελέτες κατανομής των ορμονών στα ηπατικά κύτταρα, επιδεικνύοντας μια πολύ γρήγορη πρόσληψη της 3H-κορτιζόλης στα μιτοχόνδρια, με παρόμοια κινητική με αυτή της πρόσληψης της ορμόνης στους πυρήνες. Επιπλέον, το ήπαρ δεν είναι μόνο μια θέση δράσης των γλυκοκορτικοειδών αλλά και μια θέση στην οποία πραγματοποιείται ο μεταβολικός μετασχηματισμός τους. Έτσι, το μιτοχόνδριο, παρομοίως με τον πυρήνα, θα μπορούσε να είναι μια άμεση θέση δράσης των γλυκοκορτικοειδών μέσω του προσδετο-εξαρτώμενου υποδοχέα (Psarra A.-M. G. and Sekeris C. E., 2009).



Εικόνα 4. Πυρηνική και μιτοχονδριακή δράση στεροειδών ορμονών στη βιοσύνθεση OXPHOS μέσω των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα επάγει τα γονίδια OXPHOS και γονίδια μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων. Οι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες, στη συνέχεια, ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή γονιδιακή μεταγραφή. Επιπλέον, η ορμόνη μπορεί να επηρεάσει άμεσα τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS μέσω μιτοχονδριακών υποδοχέων και την αλληλεπίδρασή τους με αντίστοιχες θέσεις δέσμευσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Psarra A.-M. G. and Sekeris C. E., 2009).

1.5 Απόπτωση

1.5.1 Γενικά

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, γνωστός ως απόπτωση, διεξάγεται από μια οικογένεια πρωτεϊνών γνωστών ως κασπάσες. Οι κασπάσες περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες: τις "initiator" κασπάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις κασπάσες -2, -8, -9 και -10 και τις ενεργές "effector" κασπάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις κασπάσες -3, -6 και -7. Όλες οι κασπάσες παράγονται σε κύτταρα ως καταλυτικά ανενεργά ζυμογόνα και ενεργοποιούνται με πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Η ενεργοποίηση των "effector" κασπασών διεξάγεται από τις "initiator" κασπάσες. Όταν ενεργοποιηθούν οι "effector" κασπάσες είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική διάσπαση ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών στόχων, που τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (Riedl S.J and Shi Y., 2004). Οι "effector" κασπάσες είναι ο τελικός στόχος στο μονοπάτι σηματοδότησης που αναφέρεται ως «caspase cascade» (Schlossmacher G. et al.,2011).

1.5.2 Εξωγενές μονοπάτι απόπτωσης (extrinsic pathway)

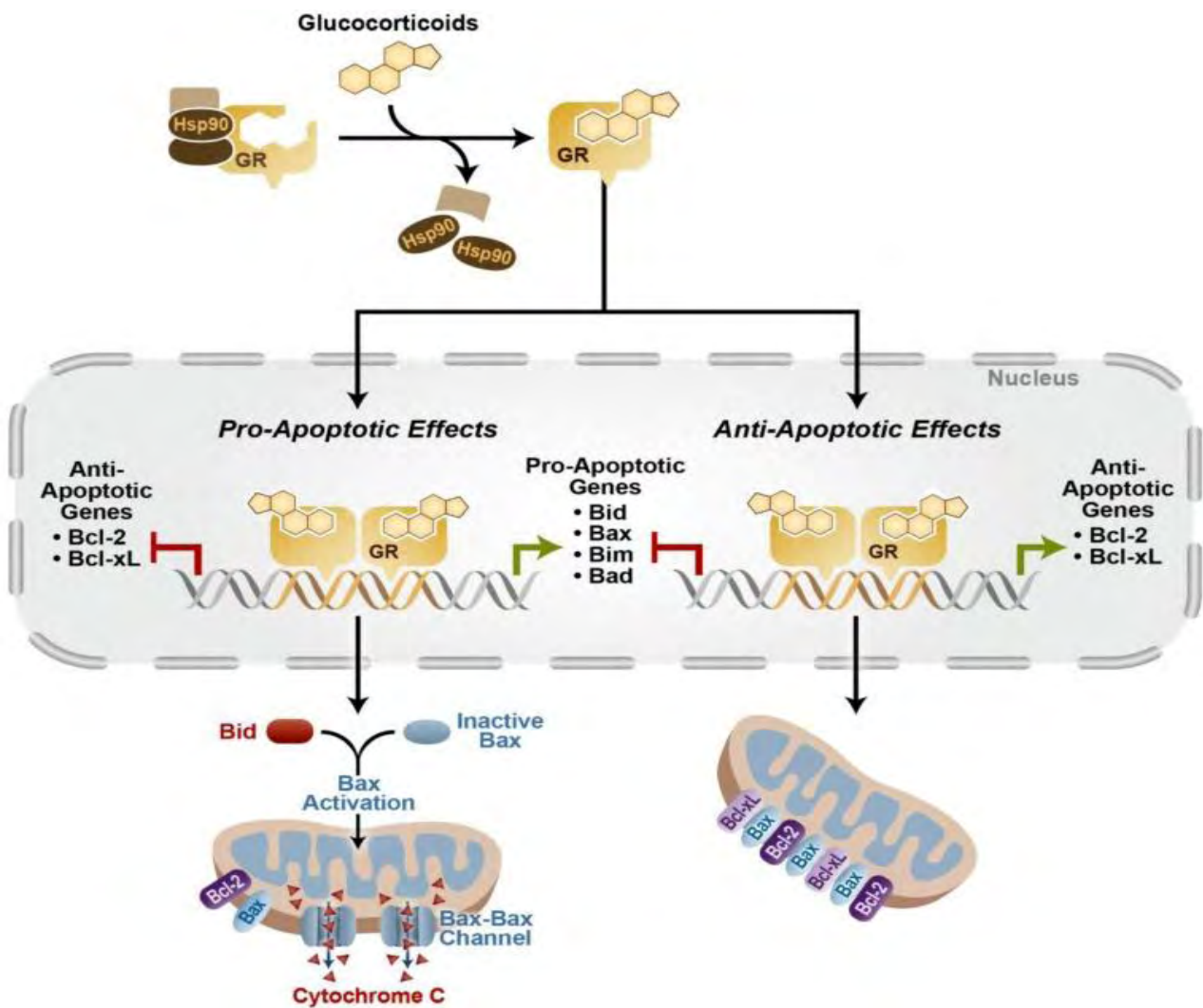
Υπάρχουν δύο μονοπάτια που πυροδοτούν την απόπτωση: το εξωγενές (extrinsic pathway) και το ενδογενές (intrinsic pathway) μονοπάτι. Το εξωγενές μονοπάτι χαρακτηρίζεται από τα εξωγενή σήματα (π.χ. FasL, TRAIL) που ενεργοποιούν τους υποδοχείς θανάτου (death receptors) της υπεροικογένειας του υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), σχηματίζοντας το σύμπλεγμα σηματοδότησης επαγωγής θανάτου, DISC (Death Inducing Signaling Complex) που θα ενεργοποιήσει την κασπάση-8 για την έναρξη της απόπτωσης μέσω μιτοχονδριακού εξαρτώμενου ή μη εξαρτώμενου μηχανισμού (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A.,2013).

1.5.3 Ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης (intrinsic pathway)

Είναι ενδιαφέρον ότι οι διαφορετικές μεταφραστικές ισομορφές του GRα έχουν δειχθεί ότι προκαλούν απόπτωση με διαφορετικούς ρυθμούς. Η ισομορφή GRα-C ταυτοποιήθηκε ως ο ισχυρότερος επαγωγέας της απόπτωσης, ενώ η ισομορφή GRα-D ήταν ο λιγότερος ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν επίσης ότι η σχετική αναλογία ειδικών ισομορφών GR σε ιστούς και κύτταρα μπορεί να επηρεάσει την απόκριση τους στην απόπτωση που προκαλείται από τα GC (Gruver-Yates A.L. και Cidlowski J.A., 2013).

Η ενδογενής αποπτωτική οδός συμβαίνει στα μιτοχόνδρια και λαμβάνει χώρα ως απόκριση σε διάφορα ενδογενή ερεθίσματα (π.χ. γλυκοκορτικοειδή, έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία UV και συνθήκες πείνας). Η σηματοδότηση μέσω γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την έκφραση του προ-αποπτωτικού Bim, μέλους της οικογένειας Bcl-2, το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax / Bak, οι οποίες αλληλεπιδρούν και προκαλούν το άνοιγμα του καναλιού ανιόντος που εξαρτάται από τη τάση, VDAC (Voltage-dependent anion channels). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του δυναμικού της

μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών. Το κυτόχρωμα c δεσμεύεται και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη APAF1 στο κυτταρόπλασμα και την επιτρέπει να δεσμεύεται με ATP / dATP και να σχηματίζει το αποπτώσωμα, το οποίο μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Ακολουθείται μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 η ενεργοποίηση της "effector" κασπάσης-3, η οποία θα οδηγήσει σε απόπτωση. Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ενδογενή οδό κατά τη διάρκεια της απόπτωσης που προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή περιλαμβάνουν την αύξηση της έκφρασης άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως Bad και Bim ή την μείωση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως Bcl-2 ή Bcl-xL (Εικόνα 5). Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω του μιτοχondριακού πόρου και επίσης αναστέλλουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπάσεων από το κυτόχρωμα c. Αυτή η ισορροπία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μπορεί να μεταβληθεί από τα γλυκοκορτικοειδή και εάν θα προκληθεί ή όχι απόπτωση εξαρτάται από τον τύπο του ιστού και τον κυτταρικό τύπο (Gruver-Yates A.L and Cidlowski J.A.,2013).



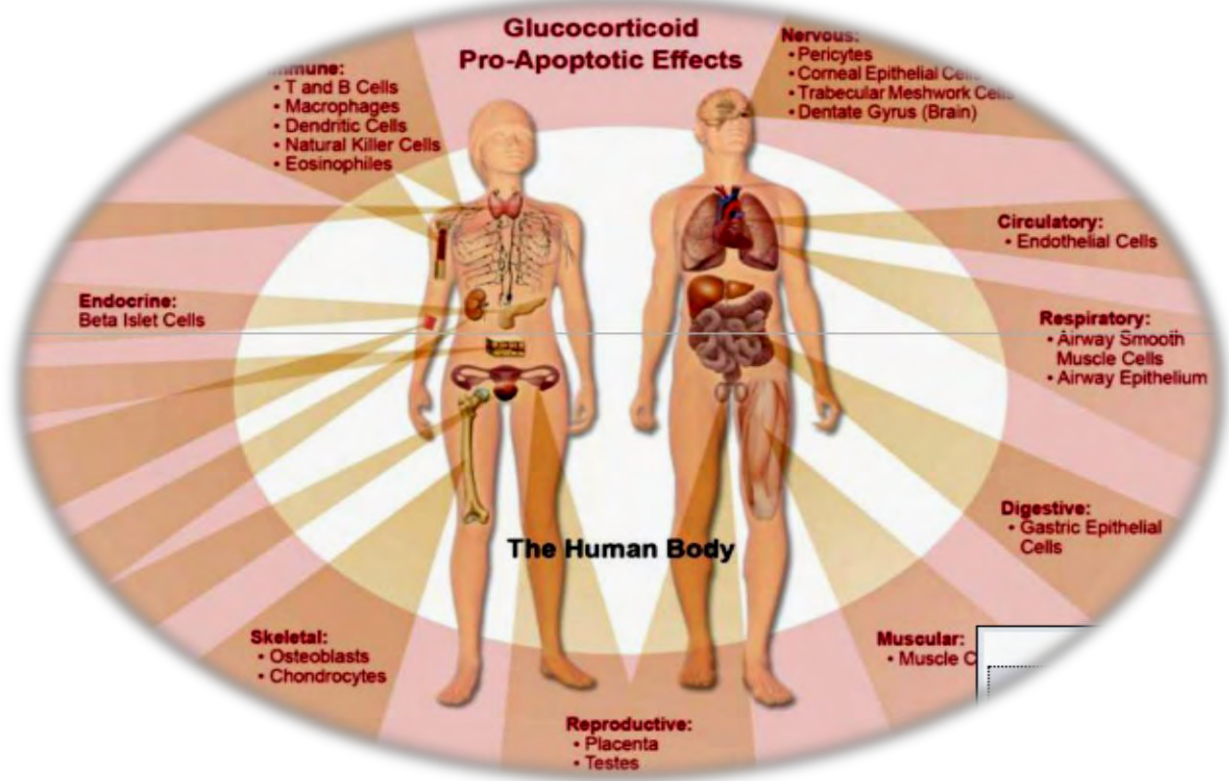
Εικόνα 5. Η γλυκοκορτικοειδής σηματοδότηση μέσω GR μπορεί να μεταβάλλει τη μεταγραφή τόσο των προ- και αντι-αποπτωτικών γονιδίων που μπορούν είτε να οδηγήσουν σε απόπτωση είτε στην κυτταρική επιβίωση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή τον ιστό (Gruver-Yates A.L and Cidlowski J.A.,2013).

Υπάρχουν βέβαια και άλλοι μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να επιτευχθεί η εξαρτώμενη από το μιτοχόνδριο απόπτωση. Η πρωτεΐνη Smac (small mitochondria-derived activator of caspases) προάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης στην οδό κυτοχρώμα c / Araf-1 / caspase-9. Η Smac προάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 με τη δέσμευση της στον αναστολέα πρωτεϊνών απόπτωσης, IAP (inhibitor of apoptosis proteins) και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ανασταλτικής δραστηριότητας τους. Η Smac είναι μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αλλά απελευθερώνεται στο κυτταρόσολιο όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε απόπτωση. Η Smac είναι η δεύτερη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, μαζί με το κυτόχρωμα c, που προάγει την απόπτωση ενεργοποιώντας τις κασπάσες (Du C. et al.,2000).

1.5.4 Ιστοειδική αποπτωτική δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Η μιτοχονδριακή μετατόπιση του GR παρατηρήθηκε μόνο σε κύτταρα που αποκρίνονται στην επαγόμενη από GCs απόπτωση, και όχι σε κυτταρικούς τύπους που είναι ανθεκτικοί σε GCs. Έτσι, αυτό εξηγεί τη διαφορετική απόκριση που παρατηρείται σε μερικά καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή (Schlossmacher G. et al.,2011). Η προ- ή αντι-αποπτωτική έκβαση της γλυκοκορτικοειδούς σηματοδότησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο που λαμβάνει το σήμα. Η απόπτωση που προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζει το σκελετικό σύστημα, το μυϊκό σύστημα, το κυκλοφορικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το ενδοκρινικό σύστημα, το αναπαραγωγικό σύστημα και το ανοσοποιητικό σύστημα (Εικόνα 6). Ωστόσο, υπάρχουν πολλοί τύποι κυττάρων που είναι ανθεκτικοί ή ανταποκρίνονται κατά αντι-αποπτωτικό τρόπο στα γλυκοκορτικοειδή όπως τα καρδιομυοκύτταρα, ινοβλάστες, κύτταρα μαστού, ηπατοκύτταρα.

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι μια ευρέως διαδεδομένη κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των φλεγμονών και των ασθενειών και συχνά περιλαμβάνονται σε πολλούς τύπους θεραπευτικών αγωγών για τον καρκίνο. Δυστυχώς, φαίνεται ότι πολλά καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να ανταποκρίνονται στη σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών με τρόπο που προάγει την κυτταρική επιβίωση αντί να προκαλεί απόπτωση. Λόγω των ιστοειδικών και κύτταρο-ειδικών επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών στην ισορροπία των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών αποκρίσεων, θα πρέπει να δίνεται προσοχή στις θεραπευτικές αγωγές που εφαρμόζονται (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A.,2013).



Εικόνα 6. Ιστο-ειδική προ-αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A.,2013).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι να εξετασθεί ο ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικές διεργασίες όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος και η απόπτωση σε συνθήκες καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό, ενδεικτικά διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της αφυδρογονάσης του μηλικού -2 και της κιτρικής συνθάσης που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και των πρωτεϊνών Bcl-xL και προκασπάσης-3 που συμμετέχουν στον μηχανισμό της απόπτωσης.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Οργανολογία

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYSTEM
- Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
- Heat blocker: KISKER
- Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- Vortex: Bio Vortex V1
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05
- Teflon Potter-Elvehjem

3.2 Υλικά

3.2.1 Χημικά

- Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
- APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Bromophenol blue (fluka)
- Developer (Carestream)
- DTT (SERVA)
- EDTA (SERVA)
- ECL
- Glycine (SERVA)
- Fixer (Carestream)
- HCl (Merck)
- KCl (EMSURE)
- KH_2PO_4 (Merck)
- Na_2HPO_4 (EMSURE)
- NaCl (Scharlan)
- NaF
- PMSF (SERVA)
- SDS (SIGMA)
- Sodium pyrophosphate

- TEMED (Applichem)
- Tris (SERVA)
- Triton X-100 (Applichem)
- Tween 20 (BioChemica)
- Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Γλυκερόλη (Applichem)
- Ισοπροπανόλη (SIGMA)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler TM Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Μείγμα αναστολέων πρωτεασών (SIGMA)

3.2.2 Διαλύματα

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer)

Περιέχει 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Για 10 δείγματα παρασκευάστηκε 500ml lysis buffer στο οποίο αναλυτικά προστέθηκε 0.25ml PMSF 20mM (-20°C), 1μl DTT 1M (-20°C) και 491,5ml RIPA. Η DTT(διθειοθειτρόλη) χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας και διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, καταργώντας την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Επιπλέον, προστίθεται 5μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε 50μl lysis buffer.

Διάλυμα Bradford Stock 1x

Είναι έτοιμο το διάλυμα Bradford 1x, έτσι όπως αγοράστηκε. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

Sample Buffer 4x (διάλυμα επιστοιβαξης δείγματος)

Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανό της βρωμοφαινόλης. Αποθηκεύεται στους -20°C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη χρησιμοποιείται ως αναγωγικός παράγοντας και διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς καταργώντας την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

Tris 20mM pH 7.5

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

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

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

TEMED

Χρησιμοποιείται έτσι ακριβώς όπως παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 %

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

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x

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

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x

Για την παρασκευή του Running Buffer 1x αραιώνονται 100ml Running Buffer 10x σε 900ml dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1%, δηλαδή 10ml. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1x

Για την παρασκευή 1L από το διάλυμα γίνεται προσθήκη 100ml Running Buffer 10x, 200ml MeOH και 5ml SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη 695ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και δεύτερη φορά.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x

Ζυγίζονται 2gr KCl, 2,4gr KH₂PO₄, 17,8gr Na₂HPO₄-2H₂O και 80gr NaCl, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1L, άρα γίνεται προσθήκη 900ml dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x

Αποτελείται από 50ml stock buffer PBS 10x, 0,3-0,4ml Tween-20 και 450ml dH₂O, για την παρασκευή 0,5L διαλύματος. Για την παρασκευή 1L διαλύματος γίνεται προσθήκη 0,5-1ml Tween-20. Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα που δεν περιέχει φωσφορικά για πλύσεις (TBS) 10x

Για την παρασκευή 1L του διαλύματος γίνεται προσθήκη 24gr Tris-base (Molecular Weight:121,1), 88gr NaCl (Molecular Weight:58,4) και το pH του διαλύματος θα πρέπει να είναι 7,4-7,6, ύστερα από την προσθήκη HCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1x

Αποτελείται από 50ml stock buffer TBS 10x, 0,3-0,4ml Tween-20 και 450ml dH₂O, για την παρασκευή 0,5L διαλύματος. Για την παρασκευή 1L διαλύματος γίνεται προσθήκη 0,5-1ml Tween-20. Αποθηκεύεται σε R.T.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με προσθήκη 45ml από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε 127,5ml dH₂O.

3.2.3 Αντισώματα

- ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ

- Αντίσωμα έναντι Bcl-2 (100) sc-509 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bcl-2 (C-2) sc-7382 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bcl-2 (10C4) sc-23960 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bax (6A7) sc-23959 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bax (B-9) sc-7480 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bax (2D2) sc-20067 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bcl-xL (H-5) sc-8392 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bcl-xL (7B2.5) sc-56021 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bcl-xL/S (D-3) sc-271121 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Bad (C-7) sc-8044 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι p-Bcl₂ (C-2) sc-377576 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι p-Bcl₂ (367.Ser 70) sc-293128 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι p-Bcl₂ (A-11) sc-377554 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι p-Bad (C-10) sc-166932 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι pro-caspase 3 (31A1067) sc-56053 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι pro-caspase 8 (1.1.40) sc-81656 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι IRP-1 (E-12) sc-166022 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι Cytochrome c (7H8) sc-13560 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι VDAC-1 (B-6) sc-390996 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι MDH-2 (1G12) sc-293474 με αραίωση 1:250 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι citrate synthase (G-3) sc-390693 με αραίωση 1:1000 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι GAPDH (G-9) sc-365062 με αραίωση 1:1000 αγορασμένο από τη Santa Cruz
- Αντίσωμα έναντι β-actin (1:4000) αγορασμένο από τη SIGMA

- ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Pierce Antibodies) με αραίωση 1:50.000.

3.2.4 Αναλώσιμα

- ❖ Μembrάνη νιτροκυτταρίνης 0,2μm: Amersham™ Protran™
- ❖ Χαρτιά Whatman
- ❖ Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία western blot (FUJI MEDICAL)
- ❖ Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 ml, 50 ml) (Sarstedt)
- ❖ Πλαστικά σωληνάκια τύπου eppendorfs (1.5 ml, 2.0 ml) (Sarstedt)
- ❖ Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 ml) (Sarstedt)

3.2.5 Κυτταρικές σειρές

Στα πλαίσια προηγούμενης εργαστηριακής έρευνας δημιουργήθηκαν HEPG2mtGFPC2 και HEPG2mtGFPGR14 κυτταρικές σειρές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη του συγκεκριμένου πειράματος. Στην πορεία αναφέρονται τα βήματα δημιουργίας τους. Τα ανθρώπινα κύτταρα HepG2 διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 2 mM γλουταμίνη και πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37 ° C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Για τη δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών (stable cell lines), την πρώτη ημέρα πριν από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα HepG2 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας των 60 mm έτσι ώστε να φθάνουν 50-70% αύξηση τους κατά τη στιγμή της διαμόλυνσης. Για να επιτευχθεί η σταθερή έκφραση του ανθρώπινου μιτοχondριακού GR, δημιουργήθηκε μία κασσέτα, όπου η ακόλουθη αλληλουχία: atggctcagcgacttcttctgaggaggttctggcctctgtcatctccaggaagccctctcagggtcagtgccaccctcacttccagagccctgcagacc ccacaatgcagtcctggcctgactgtaacacccaaccagcccggacaatatacaccacgaggatctccttgaca, η οποία κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο-οδηγό για το μιτοχόνδριο εισήχθη στη κασσέτα με το γονίδιο που κωδικοποιεί την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP) μεταξύ των θέσεων NheI και AgeI του φορέα pEGFPC2 (Clontech) για να παραχθεί η κατασκευή pmtEGFPC2. Στη συνέχεια, το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδούς (αριθμός εισαγωγής X03225) εισήχθη στο κατασκεύασμα pmtEGFPC2 στη θέση BamHI (pmtEGFPC2-GR). Το παραγόμενο κατασκεύασμα επιμολύνθηκε στα κύτταρα HepG2 χρησιμοποιώντας Lipofectamine 2000, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα ελέγχου (κύτταρα HepG2-mtGFP) παρασκευάστηκαν με διαμόλυνση του κατασκευάσματος pmtEGFPC2. Μετά από 24 ώρες επώασης στους 37 ° C, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και πέρασαν σε αραιώση 1:5 σε εκλεκτικό μέσο ανάπτυξης [DMEM εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS, που περιείχε 1,5 mg/ml Geneticin (G418)]. Την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό μέσο σε όλες τις πλάκες αντικαταστάθηκε με νέο εκλεκτικό μέσο ανάπτυξης και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 2 εβδομάδες. Οι ανθεκτικές σε G418 αποικίες επεκτάθηκαν και κλωνοποιήθηκαν ανεξάρτητα και αναλύθηκαν με ανοσοφθορισμό, ανάλυση Western blot και ανοσοκαθίζηση για να επιβεβαιωθεί η έκφραση των πρωτεϊνών, μιτοχondριακών GFP (mtGFP) και GFP-GR (mtGFPGR) (Psarra, A.M.G. and Sekeris C.E., 2011).

3.2.6 Ιστοί

Στα πλαίσια της διδακτορικής εργασίας της κυρίας Αικατερίνης Καρρά χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια για τη *in vivo* δημιουργία όγκων με την χρήση των παραπάνω κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 16 ποντίκια, οχτώ ποντίκια τα οποία εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2 και οχτώ ποντίκια τα οποία εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν όγκοι και στις δύο ομάδες ζώων, και ακολούθησε καταγραφή του αριθμού, των διαστάσεων και του ρυθμού ανάπτυξης αυτών. Μετά τον εμβολιασμό έγινε αφαίρεση και φύλαξη των όγκων, καθώς και ευθανασία των ζώων. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στην συνέχεια, πέντε όγκοι από κάθε ομάδα ζώων ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση μηχανικού ομογενοποιητή τύπου teflon Potter-Elvehjem. Κατά την ομογενοποίηση των όγκων έγινε και λύση με lysis buffer, το οποίο περιείχε protein inhibitors, DTT και PMSF.

3.3 Τεχνικές

3.3.1 Λύση με χρήση υπερήχων (Sonication)

Η διαδικασία του sonication πραγματοποιείται για την αποτελεσματικότερη λύση των δειγμάτων. Το sonication πραγματοποιείται σε 10 δείγματα τα οποία είναι ιστοί ποντικών στους οποίους εμβολιάστηκαν καρκινικά κύτταρα και οι όγκοι που δημιουργήθηκαν ομογενοποιήθηκαν σε lysis buffer. Κατά την διαδικασία αυτήν πραγματοποιούνται 5 επαναλήψεις του ενός κύκλου, με διάρκεια λιγότερο του 1sec και με διαλείμματα μεταξύ τους των 35sec.

3.3.2 Μέτρηση συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (Μέθοδος Bradford)

Η μέθοδος Bradford είναι μία χρωματική μέθοδος που βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της χρωστικής coomassie brilliant blue G-250 από κόκκινο – καφέ σε μπλέ κατά τη σύνδεσή της σε πρωτεΐνες, υπό όξινες συνθήκες. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Πρακτικά, ετοιμάζονται τόσο δοκιμαστικοί σωλήνες όσα και τα δείγματα, στη συγκεκριμένη περίπτωση ετοιμάστηκαν 10 και ένας επιπλέον, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό, για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Στη συνέχεια, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1μl από το κάθε δείγμα και σχεδόν ταυτόχρονα 1ml αντιδραστηρίου Bradford σε όλα. Το απόθεμα του αντιδραστηρίου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι το επιθυμητό 1X. Μετά από vortex, τα δείγματα τοποθετούνται στο σκοτάδι και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm, αφού έχει προηγηθεί μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό δείγμα. Τέλος, η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο $y=0,0345x+0,010$, όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο. Τα δεδομένα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την

ηλεκτροφόρηση. Η προετοιμασία των δειγμάτων που ακολουθείται γίνεται με ανάλογα με τα mg πρωτεΐνης ανά δείγμα (που βρέθηκε από τη μέθοδο Bradford) και έτσι προσθέτουμε:

Xmg δείγματος + Y μl tris-HCl + 15μl Sample Buffer x4 → 60μl τελικός όγκος, όπου pH=7,5

3.3.3 Παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης

Κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού τα συστατικά μπαίνουν με τη σειρά που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Τα συστατικά Bis Acrylamide, TEMED και APS πρέπει να εισαχθούν γρήγορα, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση πολυμερισμού. Επιπλέον, είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που επιθυμείται να διαχωριστούν. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση ακρυλαμιδίου τόσο μικρότεροι είναι οι πόροι που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό και άρα τόσο αποτελεσματικότερη είναι η διαχωριστικότητα των μορίων. Στη παρούσα έρευνα, χρησιμοποιήθηκαν gel με 10% και 12% περιεκτικότητα, επειδή τα αποπτωτικά και όχι μόνο μόρια που επιθυμείται ο διαχωρισμός τους είναι μικρού μοριακού βάρους. Η σύσταση του gel διαχωρισμού (separating gel) είναι η εξής:

Συστατικά	10% περιεκτικότητα	12% περιεκτικότητα
ddH ₂ O	2,425ml	2,175ml
Tris- HCl (pH=8,8) 1,5M (4%)	1,25ml	1,25ml
SDS 10% (R.T.)	50μl	50μl
Bis Acrylamide 40% (4°C)	1,25ml	1,5ml
TEMED	2,5μl	2,5μl
APS 10 % (- 20°C)	25μl	25μl

Όταν το gel είναι έτοιμο, αναμένεται να πήξει σε διάστημα περίπου 25 λεπτών. Τοποθετείται ισοπροπανόλη ή dH₂O, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η δημιουργία του gel επιστοίβαξης (stacking gel), η σύσταση της οποίας αποτελείται από τα εξής:

Συστατικά	Ποσότητα
ddH ₂ O	2,025 ml
Tris- HCl (pH=6,8)	0,21ml
SDS 10% (R.T.)	25μl
Bis Acrylamide 40% (4°C)	0,25ml
TEMED	2,5μl
APS 10 % (- 20°C)	12,5μl

Η συγκέντρωση του stacking gel είναι πάντα σταθερή. Κατά την δημιουργία του gel αυτού, πριν εισαχθούν τα τρία τελευταία συστατικά, που είναι σημαντικό να μπουν γρήγορα, αφαιρείται η ισοπροπανόλη ή το dH₂O από το πάνω μέρος του διαχωριστικού gel. Αμέσως εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης. Τα χτενάκια που χρησιμοποιούνται στη παρούσα έρευνα είναι 15άρια, γιατί τα δείγματα που θα φορτωθούν είναι 10 και ένα ακόμα που είναι ο Protein Marker. Ο χρόνος πήξεως είναι περίπου 30 λεπτά.

3.3.4 Ηλεκτροφόρηση, εξισορρόπηση και ηλεκρομεταφορά

Αρχικά, θα πρέπει να γίνει ενεργοποίηση της συσκευής Heat Blocker, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 95°C για 2,5min. Αυτό γίνεται για να επιτευχθεί αποδιάταξη των δειγμάτων. Αμέσως μετά, τα δείγματα υπόκεινται σε ελαφρό spin. Τέλος, τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια. Τα μl δείγματος που φορτώνονται για ηλεκτροφόρηση εξαρτώνται από τα μg της πρωτεΐνης. Στη παρούσα έρευνα, ο όγκος φόρτωσης για τα δείγματα είναι 8μl και 20μg πρωτεΐνης γιατί χρησιμοποιούνται τα 15άρια χτενάκια και παράλληλα, σε παρακείμενο πηγαδάκι, φορτώνονται 1μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους. Γίνεται ενεργοποίηση της συσκευής και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό ρεύματος στα 0,02mA. Εφόσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει το επόμενο στάδιο, στο οποίο γίνεται η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και του gel, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 15 λεπτά. Στη συσκευή ηλεκτομεταφοράς τοποθετείται η κασετίνα και η διαδικασία αυτή απαιτεί τάση ίση με 0.35A και χρόνο πραγματοποίησης 70min.

3.3.5 Blocking με γάλα και επώαση με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα

Μόλις τελειώσει λοιπόν ο χρόνος ηλεκτρομεταφοράς γίνεται blocking, με επώαση της μεμβράνης σε γάλα 10% διαλυμένο σε PBST 1x ή TBST 1x ,για μία ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθείται προσθήκη του πρώτου αντισώματος, το οποίο εισάγεται στον ψυχρό θάλαμο (cold room) (4°C) , όπου θα παραμείνει εκεί υπό ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Την επόμενη μέρα, πραγματοποιείται προσθήκη του δεύτερου αντισώματος (αντίσωμα έναντι των αντισωμάτων ορού ζώου από το οποίο έχει προκύψει το πρώτο αντίσωμα). Πραγματοποιούνται εκπλύσεις, έτσι ώστε να φύγει η περίσσεια του αντισώματος και επομένως να μείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επιτόπους, για τους οποίους φτιάχτηκε και προστέθηκε το αντίσωμα. Επιπλέον, είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη horseradish peroxidase (HRP), υπεροξειδάση από χρένο, που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Ο χρόνος επώασης για το δεύτερο αντίσωμα είναι περίπου 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και η αραιώσή του είναι 1:50.000. Στη συνέχεια, ο όγκος ECL που τοποθετείται στην μεμβράνη είναι ανάλογος του μεγέθους της μεμβράνης και επωάζεται για 3min υπό συνθήκες σκοταδιού και θερμοκρασίας δωματίου.

3.3.6 Εμφάνιση σήματος (Western Blotting)

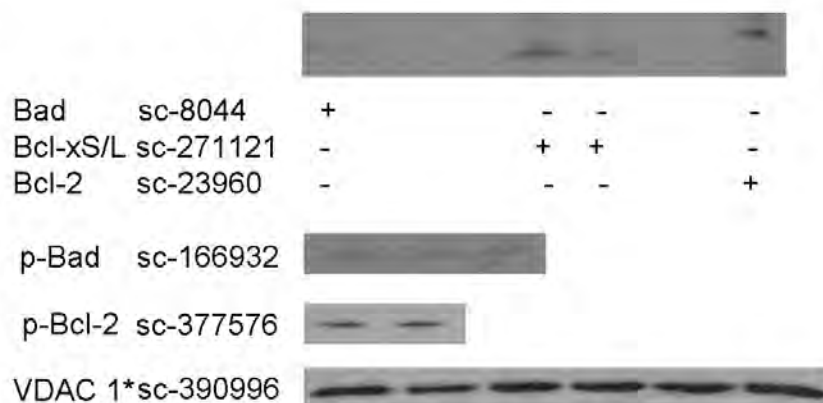
Όλα τα βήματα για την εμφάνιση σήματος γίνονται σε απόλυτο σκοτάδι στο dark room. Συγκεκριμένα κόβεται ένα φιλμ σε μέγεθος κατάλληλο που να καλύπτει την μεμβράνη και τοποθετείται πάνω στη μεμβράνη μέσα στη θήκη. Ο χρόνος που απαιτείται για την κάθε εμφάνιση διαφέρει. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται για 1min υπό ανάδευση στο διάλυμα εμφάνισης σήματος (Developer), ακολουθείται έκπλυση στο H₂O για λίγο και στη συνέχεια τοποθετείται στο διάλυμα σταθεροποίησης σήματος (Fixer) για 1min υπό ανάδευση. Τέλος, γίνεται έκπλυση ελαφρώς στο H₂O και εξετάζεται το αποτέλεσμα αφού φαίνεται με ειδική κόκκινη λάμπα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά, δοκιμάστηκαν μέσω western blotting πρωτογενή αντισώματα έναντι πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακές λειτουργίες. Τα αντισώματα προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Santa Cruz. Τα αντισώματα είναι τα εξής:

- Bcl-2 (100) sc-509
- Bcl-2 (C-2) sc-7382
- Bcl-2 (10C4) sc-23960
- Bax (6A7) sc-23959
- Bax (B-9) sc-7480
- Bax (2D2) sc-20067
- Bcl-xL (H-5) sc-8392
- Bcl-xL (7B2.5) sc-56021
- Bcl-xL/S (D-3) sc-271121
- Bad (C-7) sc-8044
- p-Bcl₂ (C-2) sc-377576
- p-Bcl₂ (367.Ser 70) sc-293128
- p-Bcl₂ (A-11) sc-377554
- p-Bad (C-10) sc-166932
- pro-caspase 8 (1.1.40) sc-81656
- IRP-1 (E-12) sc-166022
- Cytochrome c (7H8) sc-13560
- VDAC-1 (B-6) sc-390996

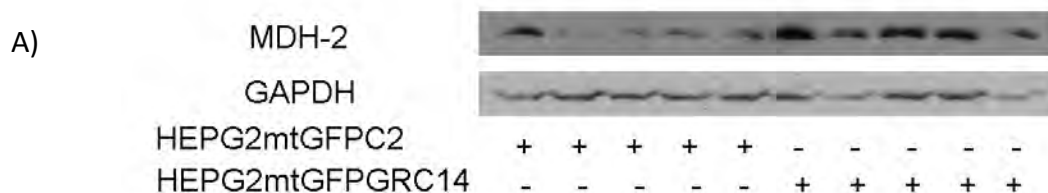
Διαπιστώθηκε λοιπόν, ότι τα πρωτογενή αντισώματα έναντι των Bad (C-7) sc-8044, Bcl-xL/S (D-3) sc-271121, Bcl-2 (10C4) sc-23960, p-Bad (C-10) sc-166932, p-Bcl₂ (C-2) sc-377576 και VDAC-1 (B-6) sc-390996 ήταν λειτουργικά (Σχήμα 1).



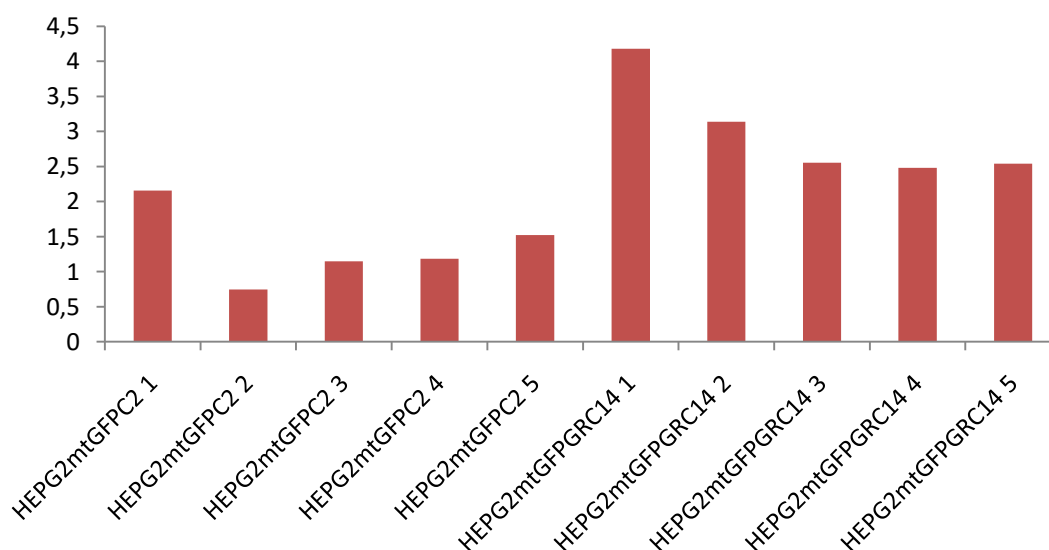
Σχήμα 1: Δοκιμάστηκαν πρωτογενή αντισώματα έναντι των Bad (C-7) sc-8044, Bcl-xL/S (D-3) sc-271121, Bcl-2 (10C4) sc-23960, p-Bad (C-10) sc-166932, p-Bcl₂ (C-2) sc-377576 και VDAC-1 (B-6) sc-390996 μέσω western blotting και διαπιστώθηκε ότι ήταν λειτουργικά.

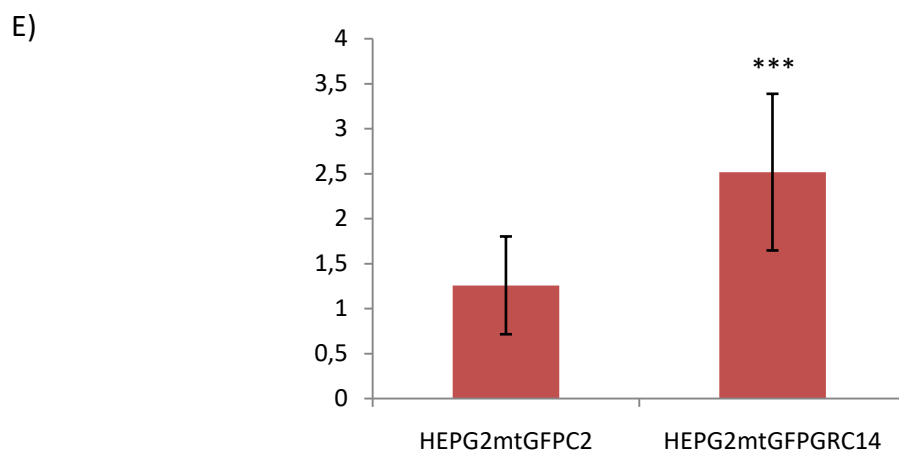
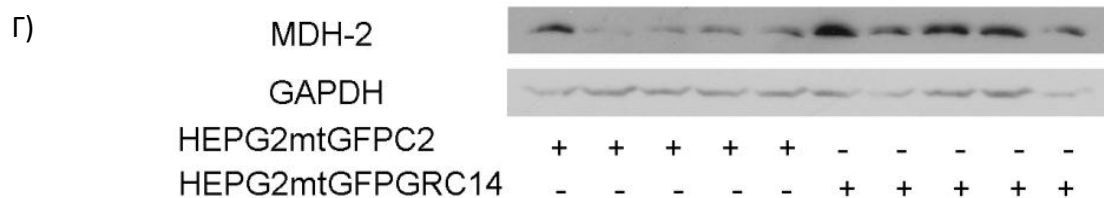
4.1 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της αφυδρογονάσης μηλικού -2 (MDH-2) σε εκχυλίσματα ιστού

Η αφυδρογονάση μηλικού -2 (MDH-2) συμμετέχει στο κύκλο του κιτρικού οξέος και οξειδώνει το μηλικό για να σχηματιστεί οξαλοξικό, ενώ το NAD^+ είναι ο δέκτης του υδρογόνου (Stryer L.,2014). Έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο western blotting, με τη χρήση ειδικού πρώτου αντισώματος έναντι της αφυδρογονάσης του μηλικού -2 σε πέντε ομογενοποιημένους όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό πειραματοζώων με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως όγκοι αναφοράς και σε άλλους πέντε που προέκυψαν από εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Επίσης, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3- φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της αφυδρογονάσης μηλικού -2 στους όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με του όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά για τον έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας western blotting, το διάγραμμα κανονικοποίησης και το διάγραμμα, όπου φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εικονίζονται στο Σχήμα 2.



B) **Σχετικά επίπεδα αφυδρογονάσης μηλικού -2 κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα GAPDH**

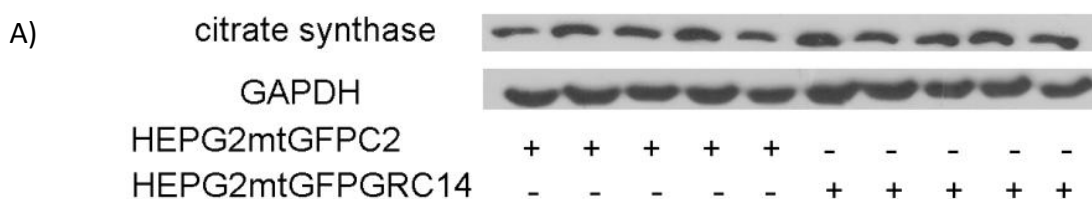




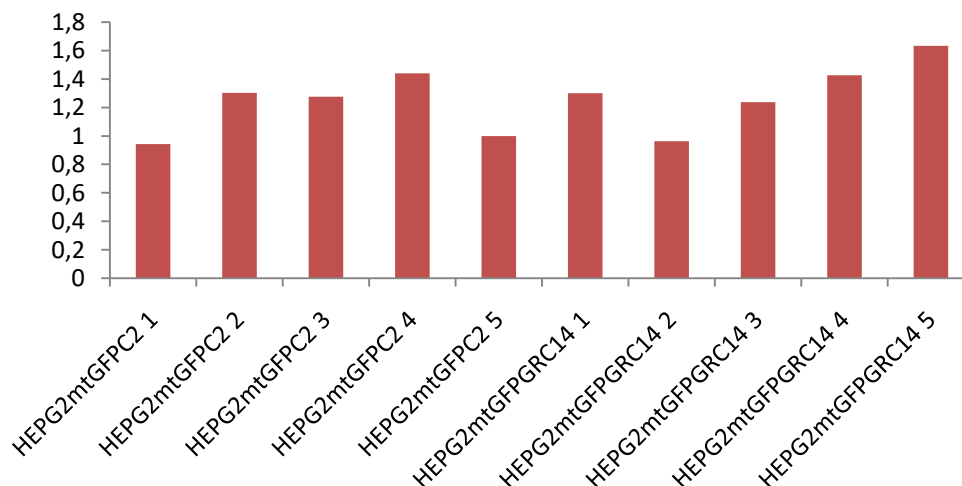
Σχήμα 2. Α,Γ) Δέκα εκχυλίσματα ιστού ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,2μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία τους σε αφυδρογονάση μηλικού -2 και GAPDH. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της αφυδρογονάσης μηλικού -2 (σε TBST 1x, milk 2%, 1:250, Santa Cruz) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της GAPDH (σε TBST 1x, milk 2%, 1:1000, Santa Cruz). Παρατηρούμε τις ζώνες της αφυδρογονάσης μηλικού -2 (36 kDa) και της GAPDH (37 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά την διαδικασία του western blotting Β,Δ) Παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της αφυδρογονάσης μηλικού -2, μετά την κανονικοποίηση της με τα επίπεδα GAPDH. Ε) Απεικονίζεται το διάγραμμα μέσου όρου των τιμών συνολικά και των δύο διαγραμμάτων κανονικοποίησης όπου αναγράφεται και ότι είναι στατιστικά σημαντικό, εφαρμόζοντας ttest με $p_{value}=0,0011$.

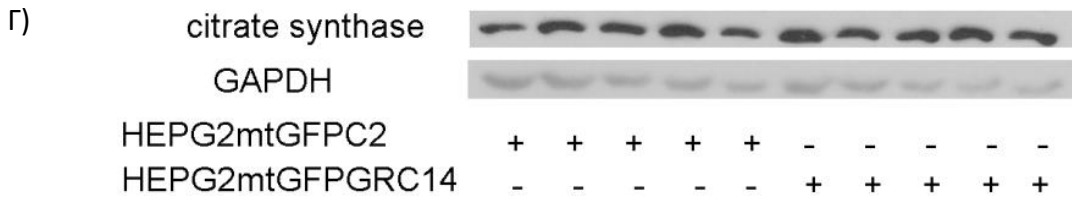
4.2 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κιτρικής συνθάσης (citrate synthase) σε εκχυλίσματα ιστού

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος αρχίζει με τη συμπύκνωση μιας μονάδας δύο ατόμων άνθρακα, του οξαλοξικού, και μιας μονάδας δύο ατόμων άνθρακα, της ακετυλικής ομάδας του ακέτυλο-CoA. Το οξαλοξικό αντιδρά με το ακέτυλο-CoA και το H₂O για να παραχθεί το κιτρικό και το CoA. Αυτή η αντίδραση, η οποία είναι μία αλδολική συμπύκνωση που ακολουθείται από μία υδρόλυση, καταλύεται από την κιτρική συνθάση (Stryer L.,2014). Διεξήχθηκε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο western blotting, με τη χρήση ειδικού πρώτου αντισώματος έναντι της κιτρικής συνθάσης σε πέντε ομογενοποιημένους όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό πειραματοζώων με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως όγκοι αναφοράς και σε άλλους πέντε που προέκυψαν από εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Επίσης, ελέχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3- φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα της κιτρικής συνθάσης σε όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με του όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά για τον έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας western blotting, το διάγραμμα κανονικοποίησης και το διάγραμμα, όπου φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εικονίζονται στο Σχήμα 3.

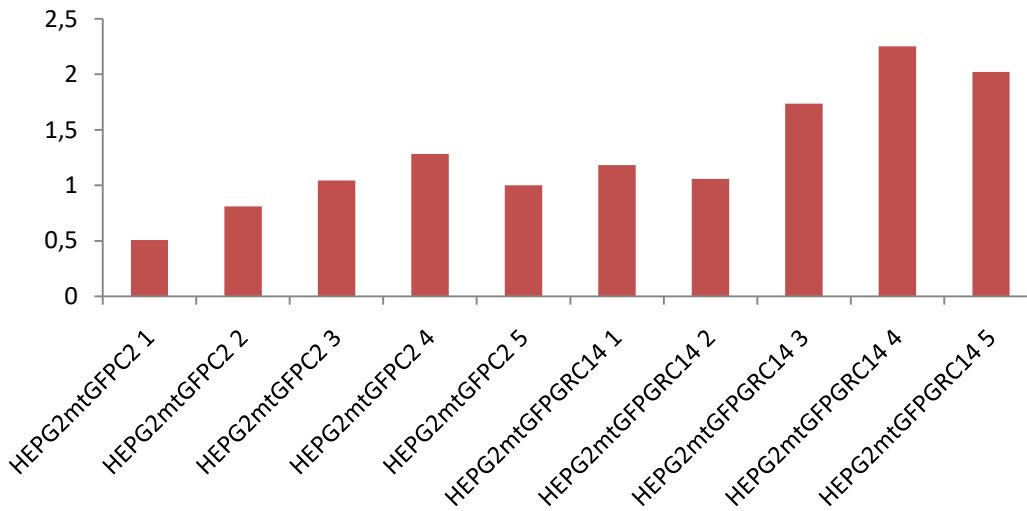


B) **Σχετικά επίπεδα κιτρικής συνθάσης κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα GAPDH**

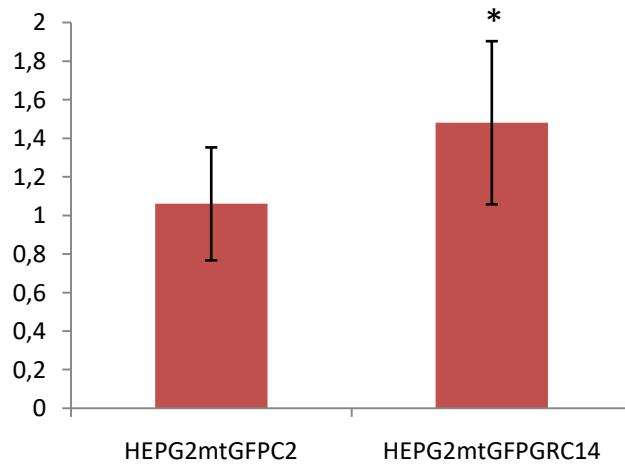




Δ) **Σχετικά επίπεδα κίτρινης συνθάσης κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα GAPDH**



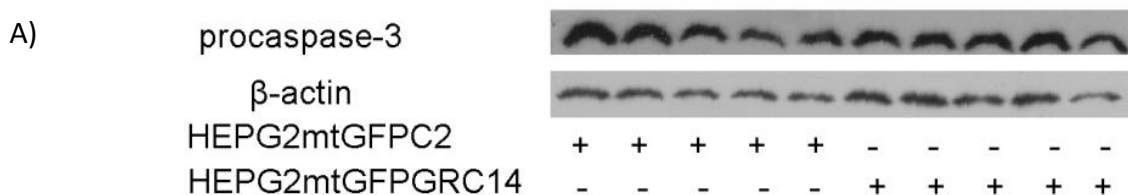
Ε)



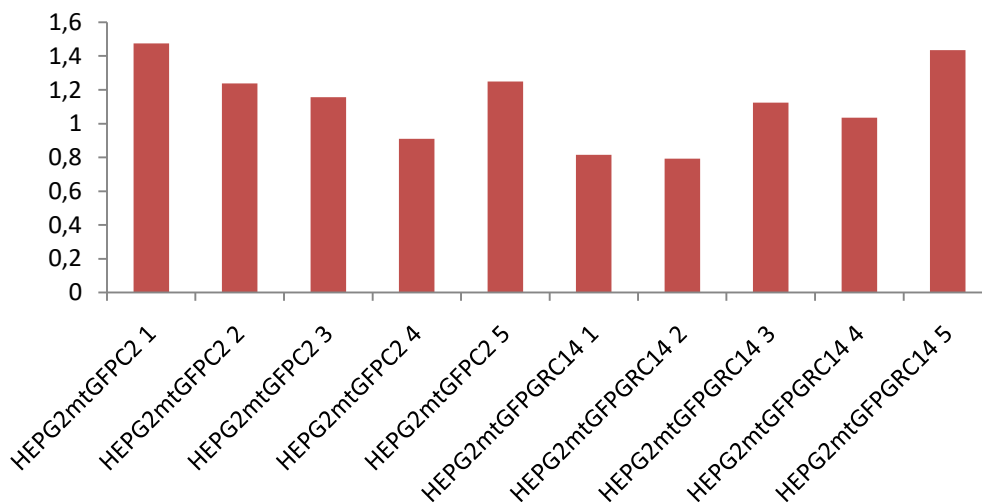
Σχήμα 3. Α,Γ) Δέκα εκχυλίσματα ιστού ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,2μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία τους σε κίτρινη συνθάση και GAPDH. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της κίτρινης συνθάσης (σε TBST 1x, milk 2%, 1:1000, Santa Cruz) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της GAPDH (σε TBST 1x, milk 2%, 1:1000, Santa Cruz). Παρατηρούμε τις ζώνες της κίτρινης συνθάσης (52 kDa) και της GAPDH (37 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά την διαδικασία του western blotting. Β,Δ) Παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της κίτρινης συνθάσης μετά την κανονικοποίηση της με τα επίπεδα GAPDH. Ε) Απεικονίζεται το διάγραμμα μέσου όρου των τιμών συνολικά και των δύο διαγραμμάτων κανονικοποίησης όπου αναγράφεται και ότι είναι στατιστικά σημαντικό, εφαρμόζοντας ttest με $p_{value}=0,017$.

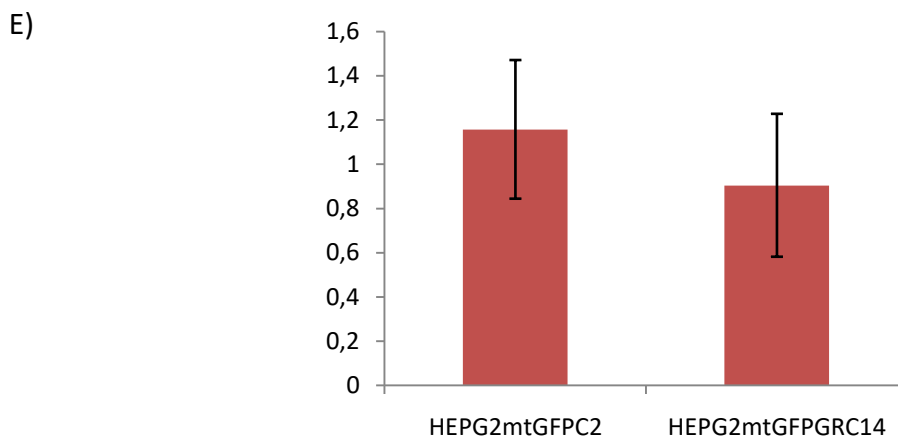
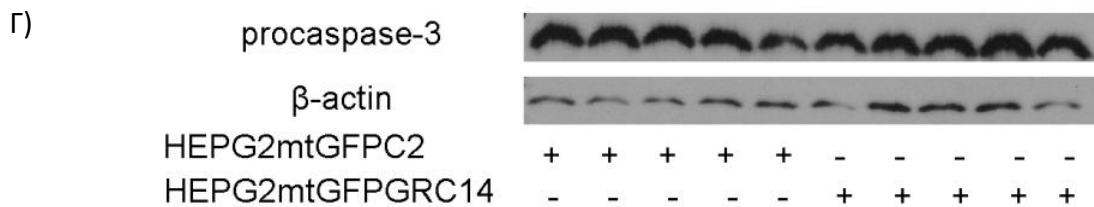
4.3 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης-3 (procaspase-3) σε εκχυλίσματα ιστού

Η κασπάση-3 αποτελεί μία από τις ενεργές "effector" κασπάσες, η οποία παράγεται σε κύτταρα ως καταλυτικά ανενεργό ζυμογόνο, προκασπάση-3 και ενεργοποιείται με πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της απόπτωσης σε κασπάση-3. Όταν λοιπόν θα ενεργοποιηθεί είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική διάσπαση ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών στόχων, που τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (Riedl S.J and Shi Y., 2004). Πραγματοποιήθηκε λοιπόν έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο western blotting, με τη χρήση ειδικού πρώτου αντισώματος έναντι της προκασπάσης -3 σε πέντε ομογενοποιημένους όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό πειραματοζώων με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως όγκοι αναφοράς και σε άλλους πέντε που προέκυψαν από εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Επίσης, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4 παρατηρήθηκε μία τάση για μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης -3 σε όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με του όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά για τον έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας western blotting, το διάγραμμα κανονικοποίησης και το διάγραμμα όπου φαίνεται ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικά τα αποτελέσματα των δύο επαναλήψεων του πειράματος εικονίζονται στο Σχήμα 4.



B) **Σχετικά επίπεδα προκασπάσης -3 κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα β-ακτίνης**

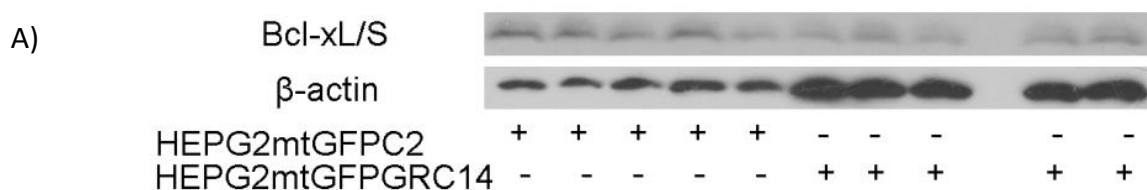




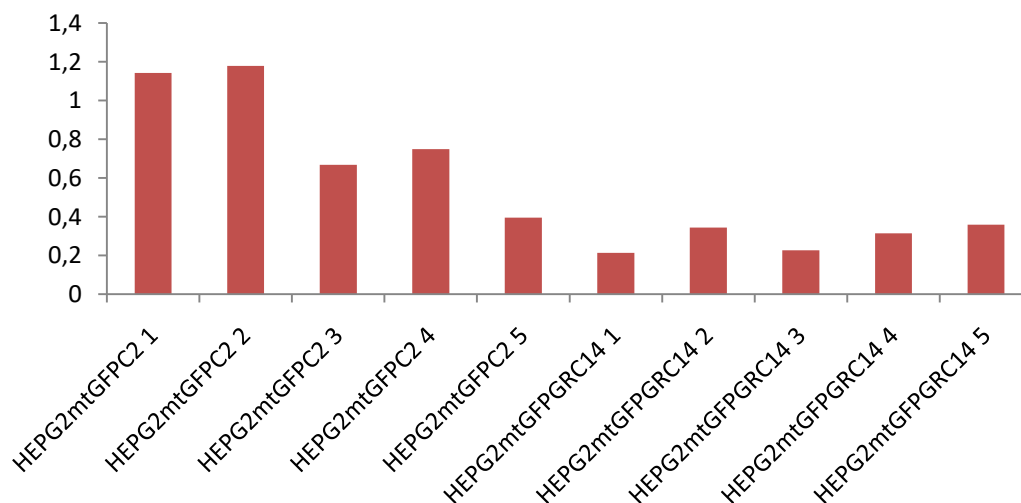
Σχήμα 4. Α,Γ) Δέκα εκχυλίσματα ιστού ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,2μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία τους σε προκασπάση -3 και β-ακτίνη. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι της προκασπάσης -3 (σε TBST 1x, milk 2%, 1:250, Santa Cruz) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της β-ακτίνης (σε TBST 1x, milk 2%, 1:4000). Παρατηρούμε τις ζώνες της προκασπάσης -3 (32 kDa) και της β-ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά την διαδικασία του western blotting. Β,Δ) Παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της προκασπάσης-3 μετά την κανονικοποίηση της με τα επίπεδα β-ακτίνης. Ε) Απεικονίζεται το διάγραμμα μέσου όρου των τιμών συνολικά και των δύο διαγραμμάτων κανονικοποίησης όπου αναγράφεται και ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό, εφαρμόζοντας ttest με $p_{value}=0,09$.

4.4 Ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-xL σε εκχυλίσματα ιστού

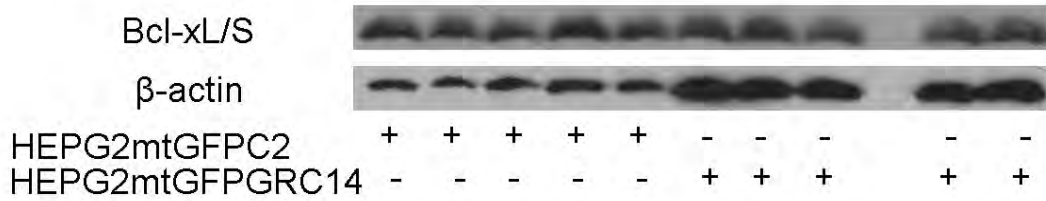
Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL αναστέλλει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω του μιτοχondριακού πόρου και επίσης αναστέλλει την ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπάσων από το κυτόχρωμα c (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A.,2013). Η Bcl-xL είναι μία πρωτεΐνη με 233 αμινοξέα με 43% ομοιότητα με την Bcl-2, η οποία καταστέλλει τον κυτταρικό θάνατο και η Bcl-xS είναι μία μικρότερη παραλλαγή που είναι 178 αμινοξέα σε μήκος και έχει έλλειψη μίας περιοχής 63 αμινοξέων, η οποία βρίσκεται και στην Bcl-xL και είναι αναστολέας της Bcl-2. Το αντίσωμα της Santa Cruz συστήνεται για την ανίχνευση της Bcl-xL και της Bcl-xS ταυτόχρονα. Ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο western blotting, με τη χρήση ειδικού πρώτου αντισώματος έναντι της Bcl-xL/S σε πέντε ομογενοποιημένους όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό πειραματοζώων με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως όγκοι αναφοράς και σε άλλους πέντε που προέκυψαν από εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Επίσης, ελέχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα της Bcl-xL σε όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με του όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Η διαδικασία επαναλήφθηκε και δεύτερη φορά για τον έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας western blotting, το διάγραμμα κανονικοποίησης και το διάγραμμα, όπου φαίνεται η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εικονίζονται στο Σχήμα 5.



B) **Σχετικά επίπεδα Bcl-xL κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα β-ακτίνης**

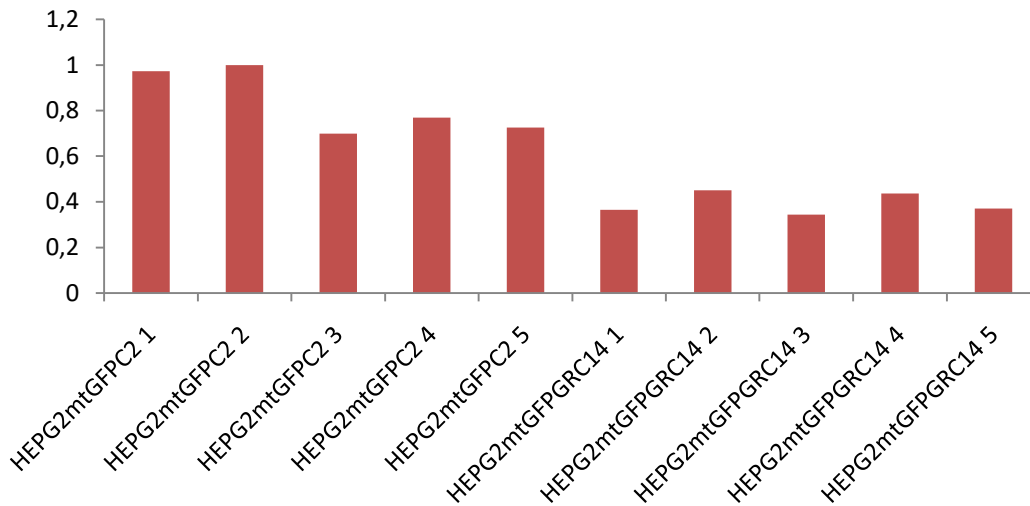


Γ)

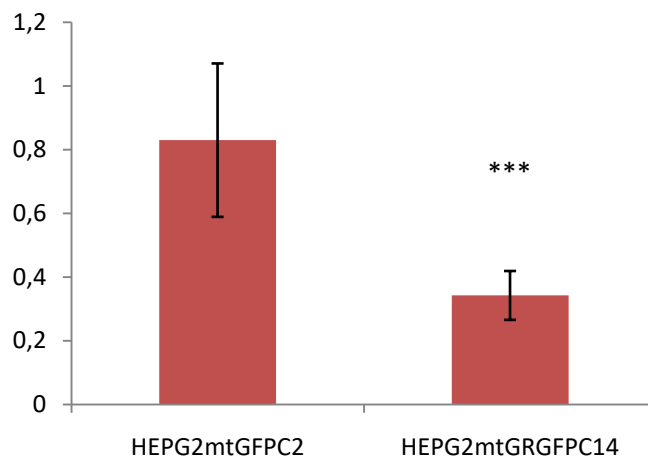


Δ)

Σχετικά επίπεδα Bcl-xL κανονικοποιημένα ως προς τα επίπεδα β-ακτίνης



Ε)



Σχήμα 5. Α,Γ) Δέκα εκχυλίσματα ιστού ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με διάμετρο πόρων 0,2μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία τους σε Bcl-xL και β-ακτίνη. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι των Bcl-xL/S (σε TBST 1x, milk 2%, 1:250, Santa Cruz) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της β-ακτίνης (σε TBST 1x, milk 2%, 1:4000). Παρατηρούμε τις ζώνες της Bcl-xL (30 kDa) και της β-ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά την διαδικασία του western blotting. Β,Δ) Παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της Bcl-XL μετά την κανονικοποίηση της με τα επίπεδα β-ακτίνης. Ε) Απεικονίζεται το διάγραμμα μέσου όρου των τιμών συνολικά και των δύο διαγραμμάτων κανονικοποίησης όπου αναγράφεται και ότι είναι στατιστικά σημαντικό, εφαρμόζοντας ttest με $p_{value}=9,22E-06$.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γνωρίζουμε ότι τα γλυκοκορτικοειδή συνδέονται στο GR, ο οποίος στη συνέχεια λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και έχει δράσεις γονιδιωματικές και μη-γονιδιωματικές. Οι γονιδιωματικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από την πυρηνική μετατόπιση του GR. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δρα και στο μιτοχόνδριο. Απουσία των γλυκοκορτικοειδών, ο κυτταροπλασματικός GR σχηματίζει ένα ετεροσύμπλεγμα με πρωτεΐνες- συνοδούς (chaperones) που διατηρούν τον GR σε αδρανή κατάσταση (Schlossmacher G. et al., 2011). Το ανενεργό σύμπλοκο, αποτελείται από τον υποδοχέα, την Hsp90, Hsp70, p60, p23 και FKBP51 (Dittmar K. et al., 1998). Ο πυρηνικός GR μπορεί στη συνέχεια να δρα είτε ως μεταγραφικός ενεργοποιητής είτε ως καταστολέας της μεταγραφής γονιδίων στόχων, ανάλογα με το γονίδιο και το κυτταρικό περιβάλλον (Schlossmacher G. et al., 2011).

Στη συγκεκριμένη έρευνα εξετάζεται ο ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος φαίνεται να συμμετέχει στις ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης του κυττάρου και συγκεκριμένα στον κύκλο του κιτρικού οξέος, αναπνευστικής αλυσίδας- οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αλλά και σε αποπτωτικούς μηχανισμούς.

Όσον αφορά τον κύκλο του κιτρικού οξέος, αρχίζει με τη συμπύκνωση μιας μονάδας δύο ατόμων άνθρακα, του οξαλοξικού, και μιας μονάδας δύο ατόμων άνθρακα, της ακετυλικής ομάδας του ακέτυλο-CoA. Το οξαλοξικό αντιδρά με το ακέτυλο-CoA και το H₂O για να παραχθεί το κιτρικό και το CoA. Αυτή η αντίδραση, η οποία είναι μία αλδολική συμπύκνωση που ακολουθείται από μία υδρόλυση, καταλύεται από την κιτρική συνθάση. Επιπλέον, η αφυδρογονάση μηλικού -2 είναι μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που συμμετέχει και αυτή στο κύκλο του κιτρικού οξέος και οξειδώνει το μηλικό για να σχηματιστεί οξαλοξικό, ενώ το NAD⁺ είναι ο δέκτης του υδρογόνου (Stryer L., 2014). Η μετάλλαξη της σχετίζεται με ορισμένες μορφές καρκίνων. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, που προκαλούν την μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για ηπατικά ένζυμα με την σύνδεση τους σε προσδετο-εξαρτώμενους υποδοχείς, όπως γλυκονογεννητικά ένζυμα. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σύνθεση του μιτοχονδριακού RNA ενεργοποιείται από τις ορμόνες (Psarra A.M. G. and Sekeris C. E., 2009). Λόγω του γεγονότος ότι οι περισσότερες από τις υπομονάδες OXPHOS κωδικοποιούνται πυρηνικά και απαιτούνται για το σχηματισμό ενεργών συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι στεροειδείς ορμόνες συντελούν στον συντονισμό της πυρηνικής και μιτοχονδριακής μεταγραφής (Psarra & Sekeris 2008). Αυτός ο συντονισμός πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση πυρηνικά κωδικοποιημένων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, των οποίων η μετέπειτα αυξημένη παρουσία στα μιτοχόνδρια μπορεί να διεγείρει τον μηχανισμό μεταγραφής των οργανιδίων. Επιπρόσθετα, μπορεί να δράσουν άμεσα τα γλυκοκορτικοειδή στην μιτοχονδριακή μεταγραφή. Έτσι, το μιτοχόνδριο, παρομοίως με τον πυρήνα, θα μπορούσε να είναι μια άμεση θέση δράσης των γλυκοκορτικοειδών μέσω του προσδετο-εξαρτώμενου υποδοχέα (Psarra A.M. G. and Sekeris C. E., 2009).

Στόχος λοιπόν είναι να εξετασθεί εάν επηρεάζονται τα ένζυμα που συμμετέχουν στο κύκλο του κιτρικού οξέος και συγκεκριμένα της μηλικής αφυδρογονάσης και της κιτρικής συνθάσης με τη δημιουργία όγκων

στα ποντίκια μέσω εμβολιασμού τους με τις κυτταρικές σειρές HEPG2mtGFPC2 που χρησιμοποιήθηκαν ως control και HEPG2mtGFPGR14.

Αρχικά, θα πρέπει να τονισθεί ότι στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής της συναδέλφου Καρράς Αικατερίνης χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ποντικών, από τις οποίες η μία εμβολιάστηκε με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2 και η άλλη με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Ακολούθησε, ανάπτυξη όγκων και στις δύο ομάδες ζώων και καταγραφή του αριθμού, των διαστάσεων και του ρυθμού ανάπτυξης αυτών. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι τα ποντίκια στα οποία εμβολιάστηκε η κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 παρουσίαζαν μεγαλύτερους όγκους από ότι τα ποντίκια που εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Έτσι, μετά την ομογενοποίηση των όγκων, παρασκευάστηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα από πέντε όγκους, οι οποίοι προήλθαν από ποντίκια που είχαν εμβολιαστεί με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 και άλλα κυτταρικά εκχυλίσματα από πέντε όγκους που προήλθαν από εμβολιασμό ποντικών με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2 με σκοπό την περαιτέρω μελέτη τους με εφαρμογή της μεθόδου western blot. Οι κυτταρικές σειρές επίσης δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται από Psarra & Sekeris 2011.

Έτσι λοιπόν φάνηκε μέσω western blotting ότι τα επίπεδα έκφρασης για τα ένζυμα της μηλικής αφυδρογονάσης και της κιτρικής συνθάσης σε όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με του όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2.

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της άμεσης δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια και άρα της μιτοχονδριακής μεταγραφής υπομονάδων ενζύμων που είναι απαραίτητα για την σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων, η οποία ενεργοποιεί παράλληλα την πυρηνική μεταγραφή ενζύμων που συμμετέχουν επίσης στη λειτουργία του μιτοχονδρίου, όπως τα ένζυμα του κύκλου Krebs, εξασφαλίζοντας τον συντονισμό πυρηνικής και μιτοχονδριακής μεταγραφής, και σύνθεση όλων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Επί πρόσθετα, ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι πηγή πρόδρομων ενώσεων για δομικές μονάδες πολλών άλλων μορίων, όπως είναι τα αμινοξέα, οι νουκλεοτιδικές βάσεις, η χοληστερόλη και η πορφυρίνη (το οργανικό συστατικό της αίμης). Έτσι η ενεργοποίηση του κύκλου του Krebs πιθανόν έχει ως αποτέλεσμα την εξασφάλιση της παραγωγής μεταβολικών ενδιάμεσων, δομικών λίθων, που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία νέων κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, το κιτρικό οξύ, το οποίο παράγεται από την κιτρική συνθάση χρησιμοποιείται για την παραγωγή ακετυλομάδων για σύνθεση λιπαρών οξέων. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ένα κοινό χαρακτηριστικό όλων των τύπων καρκίνου, απαιτεί λιπαρά οξέα για τη σύνθεση μεμβρανών και σηματοδοτικών μορίων (Currie E. et al. ,2013).

Όσον αφορά τον ρόλο του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση και συγκεκριμένα στο ενδογενές μονοπάτι απόπτωσης όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η σηματοδότηση μέσω γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την έκφραση του προ-αποπτωτικού Bim, μέλους της οικογένειας Bcl-2 , το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει τις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bax / Bak. Αυτές με την σειρά τους αλληλεπιδρούν και προκαλούν το άνοιγμα του καναλιού ανιόντος που εξαρτάται από τη τάση, VDAC (Voltage-dependent anion channels). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του δυναμικού της μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών. Το κυτόχρωμα c δεσμεύεται και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη APAF1 στο κυτταρόπλασμα και την επιτρέπει να

δεσμεύεται με ATP / dATP και να σχηματίζει το αποπτώσωμα, το οποίο μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-9. Ακολουθείται μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-9 η ενεργοποίηση της "effector" κασπάσης-3, η οποία θα οδηγήσει σε απόπτωση. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL αναστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c μέσω του μιτοχονδριακού πόρου και επίσης αναστέλλουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη κασπάσεων από το κυτόχρωμα c. Αυτή η ισορροπία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μπορεί να μεταβληθεί από τα γλυκοκορτικοειδή και εάν θα προκληθεί ή όχι απόπτωση εξαρτάται από τον τύπο του ιστού και τον κυτταρικό τύπο (Gruver-Yates A.L και Cidlowski J.A.,2013).

Η κασπάση-3 αποτελεί μία από τις ενεργές "effector" κασπάσες, η οποία παράγεται σε κύτταρα ως καταλυτικά ανενεργό ζυμογόνο, προκασπάση-3 και ενεργοποιείται με πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια της απόπτωσης σε κασπάση-3. Όταν λοιπόν θα ενεργοποιηθεί είναι υπεύθυνη για την πρωτεολυτική διάσπαση ενός ευρέος φάσματος κυτταρικών στόχων, που τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (Riedl S.J and Shi Y., 2004).

Το δεύτερο μέρος της έρευνας αποσκοπούσε στη διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση με την παρατήρηση των επιπέδων έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL και της προκασπάσης-3. Πραγματοποιήθηκε western blotting στα ίδια δείγματα. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL έχει χαμηλά επίπεδα έκφρασης στους όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με τους όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2. Επί πρόσθετα, παρατηρήθηκε μία τάση για μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης προκασπάσης -3 σε όγκους που προκλήθηκαν από τον εμβολιασμό με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14 σε σχέση με τους όγκους με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPC2, που αυτό έχει ως αποτέλεσμα μία τάση για αυξημένα επίπεδα της κασπάσης-3 λόγω πρωτεόλυσης της σε σχέση με τα control δείγματα. Τα αποτελέσματα βέβαια αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Έτσι λοιπόν, αποδείχτηκε ότι η προκρινόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή απόπτωση δεν συμμετέχει στη δημιουργία μικρότερου σε διάμετρο όγκου όπως θα ήταν το αναμενόμενο, αλλά αντιθέτως παρατηρείται η δημιουργία μεγαλύτερου σε διάμετρο όγκου. Άρα, συμπεραίνουμε ότι ο μηχανισμός της απόπτωσης δεν εμπλέκεται στην ερμηνεία της δημιουργία μεγαλύτερου σε διάμετρο όγκου στα ποντίκια που εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14, παρόλο που παρατηρήθηκε αυξημένη αποπτωτική δράση και μειωμένη αντι-αποπτωτική δράση. Η διατήρηση της λειτουργικότητας τόσο των μιτοχονδρίων όσο και ολόκληρου του κυττάρου απαιτεί ακριβή έλεγχο της απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και της μιτοχονδριακής βιογένεσης με ένα μηχανισμό θετικής-αρνητικής ανάδρασης. Γι' αυτό το λόγο τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ευρύ φάσμα μοριακών μηχανισμών που είναι απαραίτητοι για την διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Ο συντονισμός αυτός διατηρεί την εύρυθμη μιτοχονδριακή λειτουργία με την απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και δημιουργώντας νέα και υγιή. Στην προσπάθεια ερμηνείας λοιπόν των αποτελεσμάτων γνωρίζουμε ότι σε συνθήκες θνησιμότητας υπάρχει αδυναμία απομάκρυνσης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, διαταράσσοντας την μιτοχονδριακή βιογένεση που τελικά οδηγεί σε συσσώρευση των μιτοχονδρίων (Tavernarakis et al. ,2015). Αυτή η συσσώρευση μιτοχονδρίων προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί και να ευνοεί τον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκων, καθώς και την ενεργοποίηση απόπτωσης. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα πιθανόν να εκμεταλλεύονται το συντονισμό

αυτών των δύο διαδικασιών και αυτός μπορεί να είναι και ο λόγος για τον οποίον, οι όγκοι μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα στα ποντίκια που εμβολιάστηκαν με την κυτταρική σειρά HEPG2mtGFPGR14. Επίσης, συμπεραίνουμε ότι πιθανόν το κύτταρο προσπαθεί να ισορροπήσει τους μηχανισμούς της απόπτωσης και της κυτταρικής επιβίωσης μέσω των επιπέδων των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών.

Μελλοντικός στόχος του εργαστηρίου είναι η περαιτέρω μελέτη και κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, που διέπουν την δράση του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκορτικοειδών αποσκοπώντας στη διατήρηση της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Όλα αυτά θα συμβάλλουν στην αποσαφήνιση της μιτοχονδριακής σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκορτικοειδών κάτι που θα βοηθήσει και στη διαλεύκανση του ρόλου του στην παθογένεση ορισμένων μορφών καρκίνου αλλά και άλλων διαταραχών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rechavi M.R., Garcia H.E. and Laudet V. (2003), "The nuclear receptor superfamily", *Journal of Cell Science*, 585-586
2. Escriva H., Holland N.D., Gronemeyer H., Laudet V. and Holland L. Z. (2002), "The retinoic acid signaling pathway regulates anterior/posterior patterning in the nerve cord and pharynx of amphioxus, a chordate lacking neural crest", *Development*, 2905-2916
3. Sever R. and Glass C.K. (2013), "Signaling by Nuclear Receptors", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12.
4. Echeverria P.C. and Picard D. (2010), "Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility", *Biochim Biophys Acta*, 641-9
5. Jepsen K., Hermanson O., Onami T.M., Gleiberman A.S., Lunyak V., McEvelly R.J., Kurokawa R., Kumar V., Liu F., Seto E., Hedrick S.M., Mandel G., Glass C.K., Rose D.W. and Rosenfeld M.G. (2000), "Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development", *Cell*, 753-63
6. Bulynko Y.A. and O'Malley B.W. (2011), "Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry", *Biochemistry*, 313-28
7. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and Evans R.M. (1995), "The nuclear receptor superfamily: the second decade", *Cell*, 83(6):835-9
8. Germain P. and Bourguet W. (2013), "Dimerization of nuclear receptors", *Methods Cell Biology*. 21-41.
9. Holst J. P., Soldin O. P., Guo T. and Soldin S. J. (2004), "Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory", *HHS Author Manuscripts*, 105–118.
10. Zubeldia-Brenner L., Roselli C.E., Recabarren S.E., Gonzalez Deniselle M.C. and Lara H.E. (2016), *J Neuroendocrinol.*(7): 10.1111/jne.12401
11. Psarra A.M. and Sekeris C.E. (2008), "Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment" , Review Paper, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1-11
12. Zheng Y. and Murphy L. C. (2016) "Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors", *Nuclear Receptor Signal*, 14: e001.
13. Ward R.D. and Weigel N.L. "Steroid Receptor Phosphorylation: Assigning Function to Site-Specific Phosphorylation" *Biofactors*, 528–536.
14. Beato M. and Klug J., (2000), "Steroid hormone receptors: An update", *Human reproduction update*, Vol. 6, No 3, pp. 225-236
15. Levin E.R. and Hammes S.R. (2016), "Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 783-797
16. Kadmiel M. and Cidlowski J. A. (2013) "Glucocorticoid receptor signaling in health and disease", Review Paper, *Trends in pharmacological sciences*, 518-30

17. Gruver-Yates A.L. and Cidlowski J.A. (2013) "Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword Cells", Review Paper, *Cells*, 202–223
18. Psarra A.M., Solakidi S., Trougakos I.P., Margaritis L.H., Spyrou G. and Sekeris C.E. (2005), "Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli", *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2544-58
19. Schlossmacher G., Stevens A. and White A. (2011) "Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells", Review Paper, *The Journal of endocrinology*, 17-25
20. Pratt W.B. and Dittmar K.D. (1998) "Studies with Purified Chaperones Advance the Understanding of the Mechanism of Glucocorticoid Receptor-hsp90 Heterocomplex Assembly", *Trends in endocrinology and metabolism*, 244-52
21. Dean D.M. and Sanders M.M. (1996) "Ten years after: reclassification of steroid-responsive genes", *Molecular endocrinology*, 1489-95
22. Psarra A.M.G. and Sekeris C.E. (2009) "Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions", Review Paper, *Biochimica et Biophysica Acta*, 431-436
23. Riedl S.J. and Shi Y. (2004) "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis", Review Paper, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 897-907
24. Du C, Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. (2000) "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition", Review Paper, *Cell*, 33-42
25. Psarra, A.M.G. and Sekeris C.E. (2011) "Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor" *Biochimica et Biophysica*, 1814-1821
26. Stryer L. et al. (2012). Βιοχημεία (μεταφρ. Δ.Δραυνάς). Κρήτη: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
27. Palikaras K., Lionaki E and Tavernarakis N. (2015) "Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*" *Nature*, 525–528
28. Currie E. et al. (2013). "Cellular fatty acid metabolism and cancer" *Cell Metabolism*, 153-161
29. Ragsdale S.W and Carter E.L (2014) "Modulation of nuclear receptor function by cellular redox poise", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92-103