



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή
Καρρά Αικατερίνη

*<<Διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.
Ημισυνθετικά και φυτικής προέλευσης στεροειδή ως εν δυνάμει επιλεκτικοί
αγωνιστές του υποδοχέα>>*

Λάρισα, 2019

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

*<<Διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.
Ημισυνθετικά και φυτικής προέλευσης στεροειδή ως εν δυνάμει επιλεκτικοί
αγωνιστές του υποδοχέα>>*

*<< Biochemical characterization of Glucocorticoid Receptor mechanisms of
action. Plant steroids and their semisynthetic derivatives as putative selective
glucocorticoid receptor agonists>>*

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή

- 1.** Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)
- 2.** Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)
- 3.** Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)

Επταμελής Συμβουλευτική επιτροπή

- 1.** Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)
- 2.** Δημήτριος Λεωνίδας, Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)
- 3.** Καλλιόπη Παπαδοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)
- 4.** Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου, Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (μέλος)
- 5.** Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)
- 6.** Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)
- 7.** Γεώργιος Παπαδόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (μέλος)

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

*<<Διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.
Ημισυνθετικά και φυτικής προέλευσης στεροειδή ως εν δυνάμει επιλεκτικοί
αγωνιστές του υποδοχέα>>*

*Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: **12***

*Συνολικός αριθμός σελίδων: **201***

*Αριθμός Πινάκων: **11***

*Αριθμός Εικόνων: **72***

*Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: **266***

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

Ευχαριστίες

Αρχικά, κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρο καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα, καθώς και για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθειά και καθοδήγηση της σε οποιοδήποτε τυχόν πρόβλημα παρουσιάστηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Καλλιόπη Παπαδοπούλου τόσο για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα, όσο και για το γεγονός ότι δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Joseph M.Hayes, αλλά και τον Επίκουρο καθηγητή Γεώργιο Παπαδόπουλο, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προσομοίωσης που παρατίθενται στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Τα πειράματα αυτά συντέλεσαν στη δημιουργία μιας πιο ολοκληρωμένης <<εικόνας>> για τις ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν ως SEGRAs. Επίσης, τον κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω και για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην Επταμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή, Κωνσταντίνο Δήμα, υπεύθυνο του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής, τόσο για τους μύες όσο και για το χώρο που μας παραχώρησε για τη διεξαγωγή των in vivo πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς και για τη συμμετοχή του στην Επταμελή συμβουλευτική επιτροπή. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ιατρικής, Ευαγγελία Σερέτη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε και την άψογη συνεργασία της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στον Επίκουρο καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό, αλλά και στην Καθηγήτρια Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην Επταμελή συμβουλευτική επιτροπή, της παρούσας διατριβής. Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες Καραγκούνη Κωνσταντίνο και Πίσσα Γεώργιο για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα για την τέλεια συνεργασία που είχαμε εντός του εργαστηρίου, για την υπομονή του αλλά και τη βοήθεια του σε οτιδήποτε χρειάστηκε, όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Φωτεινή Καλούση και Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο αλλά και τον διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα, για την πολύ ωραία συνεργασία που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Μαρία Κωνσταντίνου, Μαρία Τζιόρτζιου, Μαρίνα Γιαννάκου, Σπυρίδων Ζορμπά, Παρασκευή Κυλινδρή, για την άψογη συνεργασία τους και την σημαντική συμβολή τους στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Giovanni Appendino, που μας χορήγησε κάποιες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αλλά και το ίδρυμα Μποδοσάκη για την χορηγία της κάμερας Qimaging ortiMOS, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των φωτογραφιών ανοσοϊστοχημείας που παρατίθενται στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ), καθώς και τη γενική γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για τη χρηματοδότηση μου (μέσω χορήγησης υποτροφίας), κατά τη διεξαγωγή του διδακτορικού. Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ θέλω να πω στην οικογένεια μου, για τη στήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των μακροχρόνιων σπουδών μου.

Διδακτορική διατριβή

Καρά Αικατερίνη

Συντμήσεις

- **ATG:** Autophagy related protein, πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αυτοφαγία
- **Beclin 1:** Ορθόλογη πρωτεΐνη του γονιδίου 6 της ζύμης που σχετίζεται με την αυτοφαγία, στα θηλαστικά
- **Binip3L:** Bcl-2/adenovirus E1B 19 KDa protein interacting protein 3, πρωτεΐνες που περιέχουν BH3 περιοχή και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2
- **CMX:** Mito Tracker red CMX-Ros
- **COX15:** Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog, οξειδάση του κυτοχρώματος c, ομόλογη της πρωτεΐνης συναρμολόγησης COX15
- **COX5B:** Cytochrome c oxidase subunit 5B, υπομονάδα VB της οξειδάσης του κυτοχρώματος c
- **COXI:** Cytochrome c oxidase subunit 1, υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c
- **COXII:** Cytochrome c oxidase subunit 2, υπομονάδα II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c
- **COXIV:** Cytochrome c oxidase subunit 4, υπομονάδα IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c
- **DBD:** DNA binding domain, περιοχή δέσμησης DNA
- **DEX:** Dexamethasone, δεξαμεθαζόνη
- **GR:** Glucocorticoid receptor, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
- **GREs:** Glucocorticoid Response Elements, στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή
- **Grim 19 ή NDUFA13:** NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 ή NDUFA13, υπομονάδα 13 της αφυδρογονάση NADH
- **HSP70:** Heat shock protein 70 kDa, μιτοχονδριακή πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 70 kDa
- **HSP90:** Heat shock protein 90 kDa, μιτοχονδριακή πρωτεΐνη θερμικού σοκ με μοριακό βάρος 90 kDa
- **LBD:** Ligand binding domain, περιοχή δέσμησης συνδέτη
- **LC3II:** LC3-phosphatidylethanolamine conjugate, ελαφριά αλυσίδα 3 της πρωτεΐνης 1 που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους ενωμένης με φωσφατιδυλεθαιλαμινη
- **LDH:** Lactate dehydrogenase, αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος
- **MAP1LC3B /LC3:** Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, ελαφριά αλυσίδα 3B των πρωτεϊνών 1A/1B που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους
- **MDH 2:** Malate dehydrogenase, αφυδρογονάση του μηλικού οξέος
- **Mtfa:** Mitochondrial transcription factor A, μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A
- **NDUFS2:** (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein II, mitochondrial, η φέρουσα σύμπλοκα Fe-S υπομονάδα II της αφυδρογονάσης NADH
- **NF-κB:** nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- **NQO1:** NAD(P)H quinone oxidoreductase, κυτταροπλασματική NADPH οξειδοαναγωγή κινονών
- **P/S:** Penicillin Streptomycin, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη
- **P62/SQSTM1:** Sequestosome 1, πρωτεΐνη σύνδεσης ουβικιτίνης
- **PBS:** Phosphate-buffered saline, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά
- **PDH:** Pyruvate dehydrogenase, αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

- **PPAR α** : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, μεταγραφικός παράγοντας που αποτελεί υποδοχέα που ενεργοποιείται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων
- **SDH**: Succinate dehydrogenase, αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος
- **SEGRAs**: Selective glucocorticoid receptor agonists, επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών
- **SEGRMs**: Selective glucocorticoid receptor modulators επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών
- **TBS**: Tris-buffered saline, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με Tris-HCl
- **TNF- α** : Tumor necrosis factor α , παράγοντας νέκρωσης όγκων
- **VDAC**: Voltage-dependent anion channel, τασιοεξαρτώμενος ανιοντικός διάυλος
- **PEPCK**: Phosphoenolpyruvate carboxykinase, καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος.

Διδακτορική διατριβή

Καρά Αικατερίνη

Περιεχόμενα

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Περίληψη..... | 1 |
| Abstract | 4 |
| 1. Εισαγωγή | 7 |
| 1.1 Πυρηνικοί Υποδοχείς- Γενικές πληροφορίες | 7 |
| 1.2 Γλυκοκορτικοειδή..... | 8 |
| 1.2.1 Γενικές πληροφορίες..... | 8 |
| 1.2.2 Βιολογική Δράση Γλυκοκορτικοειδών..... | 10 |
| 1.3 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών..... | 10 |
| 1.3.1 Γενικά..... | 10 |
| 1.3.2 Δομή | 11 |
| 1.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών | 12 |
| 1.3.4 Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών..... | 14 |
| 1.4 Μιτοχόνδρια και υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών | 19 |
| 1.4.1 Μιτοχονδριακές λειτουργίες..... | 19 |
| 1.4.2 Μιτοχονδριακή εντόπιση του GR..... | 19 |
| 1.4.3 Μηχανισμοί μέσω των οποίων ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών πιθανόν να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια | 20 |
| 1.4.4 GR και Μιτοχονδριακή Μεταγραφή | 21 |
| 1.4.5 Άλλοι Πυρηνικοί Μεταγραφικοί παράγοντες στα Μιτοχόνδρια | 26 |
| 1.4.6.2 Απόπτωση..... | 31 |
| 1.4.6.2.1 Αποπτωτικός Μηχανισμός | 32 |
| 1.4.6.2.2 Επαγωγή απόπτωσης από τα γλυκοκορτικοειδή και μηχανισμοί ανθεκτικότητας | 36 |
| 1.5 Αυτοφαγία..... | 37 |
| 1.5.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια της αυτοφαγίας..... | 37 |
| 1.5.2 << Πυρήνας>> του μηχανισμού της αυτοφαγίας | 39 |
| 1.5.3 mTOR Σηματοδότηση και Αυτοφαγία..... | 40 |
| 1.5.4 Μιτοφαγία..... | 44 |
| 1.5.5 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και Beclin-1 | 47 |
| 1.5.6 Απόπτωση και Αυτοφαγία..... | 49 |
| 1.5.7 Συσχέτιση Αυτοφαγίας και Καρκίνου..... | 51 |
| 1.5.7.1.1 Αυτοφαγία και Καταστολή του Καρκίνου | 51 |
| 1.5.7.1.2 Αυτοφαγία και Προώθηση του Καρκίνου | 52 |
| 1.5.8 Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων: Waburg effect και αυτοφαγία..... | 52 |
| 1.5.9 GR και Αυτοφαγία | 55 |

Διδακτορική διατριβή

Καρά Αικατερίνη

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6 Τα γλυκοκορτικοειδή ως φάρμακα | 56 |
| 1.6.1 Θεραπευτική Χρήση Γλυκοκορτικοειδών..... | 56 |
| 1.6.2 Επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs) | 57 |
| 1.6.3 Τριτερπένια και SEGRAs | 58 |
| 1.7 Σκοπός | 61 |
| 2. Υλικά και Μέθοδοι | 62 |
| 2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών..... | 69 |
| 2.2 Διαδικασία δημιουργίας απενεργοποιημένου εμβρυικού βόειου ορού με την χρήση του ζωάνθρακα (Charcol inactivated serum-cis)..... | 70 |
| 2.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων-Transfection | 70 |
| 2.3.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με την χρήση λιποσωμάτων (Λιποφεκταμίνη)..... | 71 |
| 2.3.2 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με την χρήση του χλωριούχου ασβεστίου..... | 72 |
| 2.4 Δοκιμασία προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας Λουσιφεράσης-Γαλακτοσιδάσης | 73 |
| 2.5 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας (Sulphorodamine B assay, SRB) | 75 |
| 2.6 Ανοσοκυτταροχημεία | 75 |
| 2.7 Μύες..... | 76 |
| 2.7.1 Εμβολιασμός μυών με τις καρκινικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR | 76 |
| 2.7.2 Ομογενοποίηση όγκων αφαιρεθέντων από μύες..... | 77 |
| 2.8 Απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων | 77 |
| 2.9 Ανοσοκατακρήμιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP) | 79 |
| 2.10 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)..... | 81 |
| 2.10.1 Συλλογή, Λύση, ομογενοποίηση ευκαρυωτικών κυττάρων και Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο της Bradford | 81 |
| 2.10.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) | 82 |
| 2.11 Western Blot (Ανοσοαποτύπωση) | 83 |
| 2.11.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης | 84 |
| 2.11.2 Αποκλεισμός μη ειδικών θέσεων (Blocking) | 84 |
| 2.11.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με την χρήση αντισωμάτων | 84 |
| 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση | 85 |
| 3.1 Χαρακτηρισμός τριτερπενοειδών ενώσεων ως εν δυνάμει SEGRA..... | 85 |
| 3.1.1 Σάρωσης μιας σειράς τριτερπενοειδών ενώσεων για πιθανή επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR | 85 |
| 3.1.2 Πρωτοπαναξαδιόλη (PPD) και Πρωτοπαναξατριόλη (PPT) ως εν δυνάμει SEGRA | 86 |

Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.2.1 In Silico μελέτες πρόσδεσης (Docking) των ενώσεων PPD και PPT στην περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών | 87 |
| 3.1.2.2 Επαγωγή πυρηνικής μετατόπισης του GR από τις PPD και PPT | 89 |
| 3.1.2.3 Καταστολή της από DEX επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τις ενώσεις PPD και PPT..... | 92 |
| 3.1.2.4 Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τις ενώσεις PPD και PPT..... | 94 |
| 3.1.2.5 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των ενώσεων PPD και PPT (Sulphorodamine B assay, SRB)..... | 95 |
| 3.1.2.6 Επαγωγή μιτοχονδριακά-επαγόμενης απόπτωσης από τις ενώσεις PPD και PPT..... | 96 |
| 3.1.3. Μποσγουελλικά οξέα και παράγωγα τους (Boswellic Acid: KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA, β-ABA) ως εν δυνάμει SEGRA | 97 |
| 3.1.3.1 In Silico μελέτες πρόσδεσης (Docking) των παραγώγων του Μποσγουελλικού οξέος στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών | 99 |
| 3.1.3.2 Τα παράγωγα του μποσγουελλικού οξέος επάγουν την πυρηνική μετατόπιση του GR..... | 103 |
| 3.1.3.3 Επίδραση των παραγώγων του μποσγουελλικού οξέος στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR | 105 |
| 3.1.3.4 Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τα παράγωγα του μποσγουελλικού οξέος μέσω GR σηματοδότησης | 107 |
| 3.1.3.5 Η επαγωγή μιτοχονδριακά-επαγόμενης απόπτωσης από τα παράγωγα του μποσγουελλικού οξέος..... | 110 |
| 3.1.4 Παράγωγα των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος..... | 111 |
| 3.1.4.1 Επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR από τα παράγωγα των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος | 113 |
| 3.1.4.2 Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος στην από DEX επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του GR | 114 |
| 3.1.4.3 Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ..... | 116 |
| 3.2 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια (mtGR)..... | 117 |
| 3.2.1 Έλεγχος αποτελεσματικής ανοσοκατακρήμνισης GR με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων..... | 117 |
| 3.2.2 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες και άλλα ρυθμιστικά μόρια σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 | 118 |
| 3.2.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την PDH | 122 |
| 3.3 Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην καρκινογένεση | 125 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.1 In Vivo μελέτες σε μύες..... | 125 |
| 3.3.2 Διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο GR επάγει καρκινογένεση.... | 130 |
| 3.3.2.1 Ο ρόλος του mtGR στην απόπτωση κατά την καρκινογένεση..... | 132 |
| 3.3.2.2 Ο ρόλος του mtGR στην αυτοφαγία | 135 |
| 3.3.2.3 Επίδραση του mtGR στη μεταβολική οδό του κύκλου του Krebs | 138 |
| 3.3.2.4 Ο ρόλος του mtGR στη Βιοσύνθεση ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά την καρκινογένεση | 140 |
| 3.3.2.5 GR και PDH | 143 |
| 3.3.2.6 Επίδραση του mtGR στην γλυκονεογένεση και στη φλεγμονή | 144 |
| 3.3.2.7 Επίδραση του mtGR στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ και μορίων άλλων σηματοδοτικών οδών που διασταυρώνονται με την GR σηματοδότηση | 148 |
| 3.4. Διερεύνηση της ορμονοεξαρτώμενης δράσης του mtGR σε κύτταρα HepG2, HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP | 150 |
| 3.4.1 Διερεύνηση του ρόλου του mtGR στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία σε ex vivo σύστημα κυττάρων..... | 150 |
| 3.4.2 Έλεγχος της ορμονοεξαρτώμενης διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία, υπό την επίδραση του mtGR..... | 154 |
| 4. Συμπεράσματα | 158 |
| Βιβλιογραφία | 174 |
| Δημοσιεύσεις | 188 |
| Συμμετοχή σε επιστημονικά συνέδρια | 189 |

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών και ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Οι ορμόνες αυτές ρυθμίζουν ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως το μεταβολισμό, την απόπτωση, τις ανοσολογικές αποκρίσεις, καθώς και την κυτταρική ανάπτυξη. Ο GR δρά ως μεταγραφικός παράγοντας, και ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά την έκφραση πολλών γονιδίων στόχων μέσω της άμεσης σύνδεσής του με ειδικές ορμονοεξαρτώμενες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (trans ενεργοποίηση) ή μέσω αλληλεπίδρασής του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων στόχων αυτών (trans καταστολή). Τα γλυκοκορτικοειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην trans καταστολή της μεταγραφής από τον GR και γι' αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική σε διάφορες ασθένειες πχ. ρευματοειδής αρθροίτιδα. Ωστόσο, η χρόνια και υψηλής δόση χρήση τους για θεραπευτικούς σκοπούς, οδηγεί παράλληλα σε πολλές αρνητικές παρενέργειες όπως διαβήτης, απώλεια μυϊκής μάζας, οστεοπόρωση. Για το λόγο αυτό σημαντική είναι η εύρεση διαφόρων ενώσεων αγωνιστών-ρυθμιστών του GR (SEGRAs, SEGRMs, SEGRAMs), που θα ενεργοποιούν επιλεκτικά τους μηχανισμούς της trans καταστολής του GR, ενώ δεν θα επηρεάζουν ή θα καταστέλλουν μηχανισμούς της trans ενεργοποίησης του GR. Επιπρόσθετα, ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να ρυθμίζει α) τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω άμεσης σύνδεσης του σε ειδικές ορμονοεξαρτώμενες αλληλουχίες, εντός της D-Loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, και β) μέσω αλληλεπίδρασής του με άλλους αποπτωτικούς ή αντιαποπτωτικούς παράγοντες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε μια σειρά τριτερπενοειδών ενώσεων (52 στο σύνολό τους) ως προς την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τη πυρηνική μετατόπιση του GR και να δρουν ως SEGRAs. Μεταξύ των τριτερπενοειδών ενώσεων που μελετήθηκαν ήταν και τα τετρακυκλικά τριτερπένια πρωτοπαναξαδιόλη (**PPD**) και πρωτοπαναξατριόλη (**PPT**), τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος [11-κετο β-μποςγουελλικό οξύ (**KBA**), 3-O-Ακέτυλο-11-κετο β-μποςγουελλικό οξύ (**AKBA**), α-μποςγουελλικό οξύ (**α-BA**), β-μποςγουελλικό οξύ (**β-BA**), Ακέτυλο α-μποςγουελλικό οξύ (**α-ABA**), Ακέτυλο β-μποςγουελλικό οξύ (**β-ABA**)], η α-αμυρίνη και τα παράγωγα της, καθώς και τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος. Όσον αφορά τις ενώσεις PPD και PPT, καθώς και τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος, υπολογιστικές μελέτες επαγόμενης πρόσδεσης (Induced Fit Docking), ανοσοϊστοχημείας, λουσιφεράσης και ανοσοαποτύπωσης (Western Blot) έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις, άλλες σε μεγαλύτερο (**KBA, AKBA, α-BA, PPT**) και άλλες σε μικρότερο βαθμό (**β-BA, α-ABA και β-ABA, PPD**), μπορούν να προσδένονται στον GR, να ενεργοποιούν την πυρηνική του μετατόπιση, και να καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NFκ-B, σε κύτταρα HeLa και HEK293, που εκφράζουν ενδογενώς τον GR. Η δράση αυτή δεν παρατηρήθηκε σε κύτταρα COS.7, τα οποία εκφράζουν μηδαμινά έως ελάχιστα επίπεδα GR, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του GR στην επιτέλεση αυτών των δράσεων. Μάλιστα πειράματα λουσιφεράσης, στα οποία πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση του GR, καταδεικνύουν ότι οι ενώσεις KBA και AKBA ασκούν

αθροιστική δράση κατά την συγχορήγησή τους με την DEX, επιβεβαιώνοντας τη συμμετοχή τους στη GR σηματοδότηση. Επίσης, όλες οι ενώσεις που προαναφέρθηκαν είτε δεν επηρεάζουν την επαγόμενη από δεξαμεθαζόνη (DEX) μεταγραφική δραστικότητα του GR είτε την καταστέλλουν. Συνεπώς, τόσο οι ενώσεις PPD και PPT, όσο και τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος μπορούν να χαρακτηριστούν ως SEGRAs και να αποτελέσουν μόρια οδηγούς για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων υποκαταστατών κορτιζόλης με μειωμένες παρενέργειες. Επιπρόσθετα, οι ενώσεις αυτές μπορούν να επάγουν απόπτωση στις κυτταρικές σειρές HeLa και HepG2. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι η αποπτωτική δράση ενισχύεται κατά την συγχορήγηση των ενώσεων AKBA με α -BA, με DEX, γεγονός που πιθανόν να υποδηλώνει αθροιστική δράση των ενώσεων αυτών με την DEX. Όσον αφορά την α -αμυρίνη και τα παράγωγα της, καθώς και τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος, δεν διέθεταν ικανότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του GR, αλλά ούτε και την ικανότητα καταστολής της μεταγραφικής δραστικότητας του NF- κ B σε σημαντικό βαθμό. Εξ αυτών, τα παράγωγα αμυρίνης παρουσίασαν καταστολή της από DEX επαγόμενης μεταγραφικής δραστικότητας του GR.

Στη συνέχεια, δεδομένου του σημαντικού ρόλου των μιτοχονδρίων στη ρύθμιση του μεταβολισμού του κυττάρου τόσο υπό φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες, αλλά και του γεγονότος ότι ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να επιδρά στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και απόπτωση, διερευνήθηκε ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του GR με πρωτεΐνες που παίζουν κύριο ρόλο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό, τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, απόπτωση και μηχανισμών εισόδου πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Οι πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίστηκαν να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών είναι οι εξής: οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακά βάρη 70 KDa (70 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP70) και 90 KDa (90 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP90), ο μεταγραφικός παράγοντας που αποτελεί υποδοχέα που ενεργοποιείται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α), η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate dehydrogenase, PDH), ο τασοεξαρτώμενος δίαυλος ανιόντων (Voltage dependent anion channel, VDAC), ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας MtfA, καθώς και η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2. Μεταξύ αυτών ισχυρή αλληλεπίδραση παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες PDH, HSP70 και PPAR α . Λόγω του κομβικού ρόλου της PDH στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, η αλληλεπίδραση του GR με την PDH αξιολογήθηκε ιδιαίτερα σημαντική και επαληθεύτηκε περαιτέρω τόσο με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων ανοσοκατακρήμνισης έναντι του GR όσο και με χρήση αντισωμάτων έναντι της PDH. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο υπό συνθήκες υπερέκφρασης του GR όσο και υπό συνθήκες ύπαρξης ενδογενών επιπέδων έκφρασης του mtGR.

Η αλληλεπίδραση του μιτοχονδριακού GR με την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH), ένα ένζυμο κλειδί στον καρκίνο, καθώς είναι υπεύθυνη για τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, μας ώθησε στη διερεύνηση του ρόλου του mtGR στην καρκινογένεση. Για

την επίτευξη του σκοπού αυτού πραγματοποιήθηκαν in vivo πειράματα καρκινογένεσης σε ανοσοκατεσταλμένους μύες NOD-SCID οι οποίοι είχαν έλλειψη B- και T- λεμφοκυττάρων, καθώς και σε μύες NSG, οι οποίοι είχαν έλλειψη των B-, T- και των NK (Natural Killer cells)-κυττάρων. Οι μύες εμβολιάστηκαν με κύτταρα από τις σταθερές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP ή HepG2mtGFPGR, οι οποίες υπερεκφράζουν σταθερά την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) ή την χιμαιρική GFPGR πρωτεΐνη, αντίστοιχα, με μιτοχονδριακή στόχευση. Η χρονική στιγμή εμφάνισης των όγκων στους μύες που είχαν εμβολιαστεί με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR προηγούνταν αυτής σε πειραματόζωα που είχαν εμβολιαστεί με HepG2mtGFP. Επιπρόσθετα, τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης όσο και το μέγεθος των όγκων, το οποίο μετρήθηκε όταν οι όγκοι αφαιρέθηκαν χειρουργικά από τους μύες, ήταν πολύ μεγαλύτεροι στους όγκους των κυττάρων HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με αυτούς των κυττάρων αναφοράς HepG2mtGFP.

Με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω του οποίου ο mtGR οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες σε ολικά και μιτοχονδριακά κλάσματα από τους προαναφερθέντες όγκους, ελέγχοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν στην απόπτωση, την αυτοφαγία, αναπνευστική αλυσίδα-οξειδωτική φωσφορυλίωση, τον κύκλο του κιτρικού οξέος τη γλυκονογένεση, καθώς και μόρια με τα οποία αλληλεπιδρά ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών.

Από τα πειράματα που εφαρμόστηκαν, εξήχθη το συμπέρασμα ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών τόσο μέσω της αλληλεπίδρασής του με την PDH όσο και μέσω της εμπλοκής του στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής καταστέλλει την έκφραση των υπομονάδων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και προκαλεί μεταβολές στα επίπεδα ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος, συντελώντας έτσι στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, ενισχύοντας τη γλυκόλυση και μειώνοντας τη γλυκονογένεση. Σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία διαδραματίζει και η αυτοφαγία, η οποία ενεργοποιείται ενισχύοντας έτσι την παραγωγή πρόδρομων μορίων, απαραίτητων για την ανάπτυξη των νεοσυντιθέμενων καρκινικών κυττάρων. Επίσης, παρουσία του mtGR, δεν ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί επαγωγής μιτοχονδριακά εξαρτώμενης απόπτωσης, σε συμφωνία με την ανταγωνιστική δράση απόπτωσης και αυτοφαγίας κατά την καρκινογένεση.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού GR υπό συνθήκες διαθεσιμότητας οξυγόνου, μελετήθηκε η διαφορική ορμονοεξαρτώμενη έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε κύτταρα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η επίδραση του mtGR στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και βιοσύνθεση OXPHOS εξαρτάται από την παρουσία της ορμόνης και το χρόνο έκθεσης σε αυτήν. Η αρχικά παρατηρούμενη ορμονοεξαρτώμενη επαγωγή της σύνθεσης της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c αντιστρέφεται με το χρόνο, ενώ η κατασταλτική δράση του mtGR στα επίπεδα της PEPCK λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτων συνθηκών.

Επίσης, δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές σε αυτοφαγικούς παράγοντες, υποδεικνύεται ότι η παρουσία του mtGR στα μιτοχόνδρια δεν αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για την επαγωγή αυτοφαγίας. Με βάση όλα τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η αλληλεπίδραση του mtGR με την PDH φαίνεται να παίζει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανόν να οδηγεί σε καταστολή της δραστηριότητας του ενζύμου, καταστολή της γλυκονεογένεσης και επαγωγή του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού όπως περιγράφεται στο φαινόμενο Warburg. Ενισχυτικά σε αυτήν την δράση δρά και η ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τον mtGR. Τα αποτελέσματα μας συνεισφέρουν στην κατανόηση του ρόλου του mtGR και στην ανάδειξη νέων φαρμακευτικών στόχων για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Abstract

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones, which exert their actions through glucocorticoid receptor (GR). GCs regulate many cellular functions such as metabolism, apoptosis, immune responses, and cell growth. Glucocorticoid receptor acts as transcriptional factor, transactivating or transrepressing the expression of a variety of target genes. Glucocorticoids are widely used in medicine, due to their anti-inflammatory and tissue specific apoptotic activities. However, chronic use of glucocorticoids can also lead to negative side effects, such as diabetes, loss of muscle mass, and osteoporosis. For this reason, there is high need for selective GR agonists (SEGRAs), which will dissociate transrepression from transactivation activities. GR is found to exert nuclear, cytosolic, cell membranous, but also mitochondrial localization. Mitochondrial GR can regulate mitochondrial transcription by direct binding to specific hormone responsive elements within the D-Loop regulatory region of the mitochondrial DNA. In addition via interaction with other regulatory molecules can affect mitochondrial dependent apoptosis. In this study, 52 Triterpenoids were examined for their ability to activate GR nuclear translocation and act as SEGRAs. Tetracyclic triterpene protopanaxadiol (**PPD**) and protopanaxatriol (**PPT**), derivatives of boswellic acid [11-keto beta Boswellic acid (**KBA**), 3-O-Acetyl-11-ketobeta Boswellic acid (**AKBA**), Boswellic Acid alpha (**α -BA**), Boswellic Acid beta (**β -BA**), Acetyl alpha-boswellic acid (**α -ABA**), Acetyl beta-boswellic acid (**β -ABA**)], the α -amyrin and its derivatives and derivatives of betulinic acid were further analysed for their dissociative GR activity. Thus, immunohistochemistry, luciferase reporter gene assays, immunoblotting analysis (Western Blot) and/or induced-fit docking analysis were applied for that purpose. PPD, PPT and boswellic acid derivatives, showed comparable to DEX efficiency to bind to the ligand binding domain of GR. Compounds KBA, AKBA, α -BA, PPT and to a lesser extent compounds β -BA, α -ABA and β -ABA, PPD were capable of inducing GR nuclear translocation, suppression of NF κ -B transcriptional activity in HeLa and HEK293 cells lines (positive GR cells), but not in COS.7 cells (negative GR cells), indicating involvement of GR in this processes. Moreover, overexpression of GR, in luciferase assays, revealed additive effect on the DEX- induced NF- κ B transcriptional repression by the KBA and

AKBA compounds. Also, in the presence of the above mentioned triterpenoids, no transactivational activity of GR was observed, whereas repression of the dexamethasone-induced (DEX) transcriptional activity of GR was observed. Consequently, PPD, PPT and boswellic acid derivatives could be considered as SEGRAs.

In addition, PPD, PPT and boswellic acid derivatives were capable in inducing apoptosis in HeLa and HepG2 cells. It is also noteworthy that upon coadministration of AKBA and α -BA compounds with DEX, enhanced apoptotic activity was observed indicating additive effects of AKBA and α -BA with DEX. Moreover, α -amyrin and its derivatives and betulinic acid derivatives were not capable of inducing GR nuclear translocation and suppression of NF- κ B transcriptional activation. No effect on GR transcriptional activation was observed by the compounds. Moreover, betulinic acid derivatives and α -amyrin exhibited transrepression of the dexamethasone-induced (DEX) transcriptional activity of GR, in HeLa cells, indicating potent hypoglycemic activities of the compounds. Furthermore, due to the important and not well-defined role of mitochondrial GR, we focused on the characterization of the GR interacting proteins in mitochondria. Proteins examined were key molecules in the regulation of the mitochondrial metabolism and transcription. Applying co-immunoprecipitation studies, by the use of specific antibodies, we showed that proteins such as 1) 70 Kilodalton Heat Shock Protein (HSP70), 2) 90 Kilodalton Heat Shock Protein (HSP90), 3) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), 4) Pyruvate dehydrogenase (PDH), 5) Voltage dependent anion channel (VDAC), 6) Mitochondrial transcription factor (MtfA), and the anti-apoptotic protein BCL2, are GR interacting proteins. Among them, the proteins PDH, HSP70 and PPAR α exhibited strong interactions with GR. PDH is a key enzyme, responsible for the observed metabolic reprogramming in several types of cancer cells. Thus, the observed GR-PDH interaction prompted us to examine, the role of mtGR in cancer. For this reason, NOD-SCID mice (lacking B- and T-cells), and NSG mice, [lacking B-, T-, and NK (Natural Killer cells)-cells] were inoculated with hepatocarcinoma HepG2 stable cell lines overexpressing a mitochondrial targeted green fluorescence protein (HepG2mtGFP) or a mitochondrial targeted GFPGR (HepG2mtGFPGR). Tumors produced in mice, vaccinated with HepG2mtGFPGR cells, were appeared earlier than tumors in control HepG2mtGFP vaccinated cells, in all cases examined. In addition, both the rate of growth and the size of the tumors were increased in the tumors of HepG2mtGFPGR cells, compared with those of HepG2mtGFP control cells.

In order to investigate the mechanism of action of mtGR in tumor development, the protein levels of molecules involved in autophagy, apoptosis, gluconeogenesis, Krebs cycle and other GR interacting molecules were examined in total and mitochondrial extract from the produced tumors.

Are results showed that in the presence of mtGR, protein levels of enzymes of oxidative phosphorylation and Krebs cycle were decreased. gluconeogenesis was suppressed as indicated by the decreased level of the gluconeogenic enzyme Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). This effect resembles the metabolic reprogramming observed upon Warburg effect In addition autophagy was activated

and contributed to tumor development, via production of precursors of biomolecules, that are necessary for the generation of the newly synthesized cancer cells. Mitochondrial dependent cells apoptosis was not activated.

In addition, in order to investigate the role of mitochondrial GR, under oxygen availability, the DEX-dependent expression of proteins involved in the mitochondrial function, in HepG2, HepG2mtGFP and HepG2mtGFPGR cells was examined. Our results showed that the regulation of mitochondrial transcription and OXPHOS biosynthesis by mtGR is hormone dependent and followed a diphasic phase upon time of exposure. Whereas, mtGR caused reduction in PEPCK protein levels in all conditions examined. Also, no changes in autophagic proteins were observed, suggesting that the presence of mtGR in mitochondria is not adequate condition for induction of autophagy. In conclusion, mtGR- PDH interaction appears to play a dominant role in the regulation of mitochondrial metabolism. This interaction may lead to suppression of PDH activity, suppression of gluconeogenesis, and induction of metabolic reprogramming, similar to that observed in the Warburg effect. Negative regulation of mitochondrial transcription by mtGR also support this action. In conclusion, our results contribute to understanding the role of mtGR and discovering new therapeutic targets for treatment of cancer.

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρηνικοί Υποδοχείς- Γενικές πληροφορίες

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι διαθέτουν όμοια δομή, και έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται σε συγκεκριμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, στον υποκινητή διαφόρων γονιδίων, ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή. Οι υποδοχείς αυτοί, σε απόκριση διαφόρων ενδογενών προσδετών, μπορούν να καταστέλλουν ή να ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους. Οι προσδέτες όταν συνδεθούν με τον υποδοχέα, αλλάζουν τη δομή του, ώστε να είναι εφικτή, η στρατολόγηση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου [1].

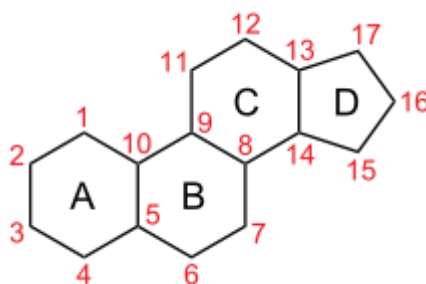
Υπάρχουν δύο κύριες υποκατηγορίες πυρηνικών υποδοχέων, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών και οι μη στεροειδείς. Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία, είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς αυτοί, όταν δεν είναι προσδεμένη κάποια ορμόνη πάνω τους, βρίσκονται έξω από τον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, το οποίο συμπεριλαμβάνει και τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους επιτυγχάνεται, μετά την πρόσδεση της αντίστοιχης ορμόνης στους υποδοχείς, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα, τον διμερισμό ή ετεροδιμερισμό τους, τη μετακίνηση τους στον πυρήνα και την αλληλεπίδρασή τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή ρυθμιστικά μόρια, όπως η RNA πολυμεράση, οι ακετυλοτρανσφεράσες, καθώς και απαδενυλάσες [1]. Στις στεροειδείς ορμόνες συμπεριλαμβάνονται τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, η προγεστερόνη, τα μεταλλοκορτικοειδή, η εκδυσόνη, η βιταμίνη D3, καθώς και οι οξυστερόλες [2,3].

Αντίθετα, οι μη στεροειδείς υποδοχείς, στην πλειονότητά τους, βρίσκονται στον πυρήνα, και έπειτα από την πρόσδεση ενός αγωνιστή, αλληλεπιδρούν με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς, ώστε να σχηματίσουν ετεροδιμερή, καθώς και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οδηγώντας στην μεταγραφή διαφόρων γονιδίων [1]. Τα υδρόφοβα μόρια τα οποία συνδέονται στους μη στεροειδείς υποδοχείς, μπορεί να είναι λιπαρά οξέα, προσταγλαδίνες, ρετινοϊκά οξέα, καθώς και λευκοτριένια [2,3].

1.2 Γλυκοκορτικοειδή

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

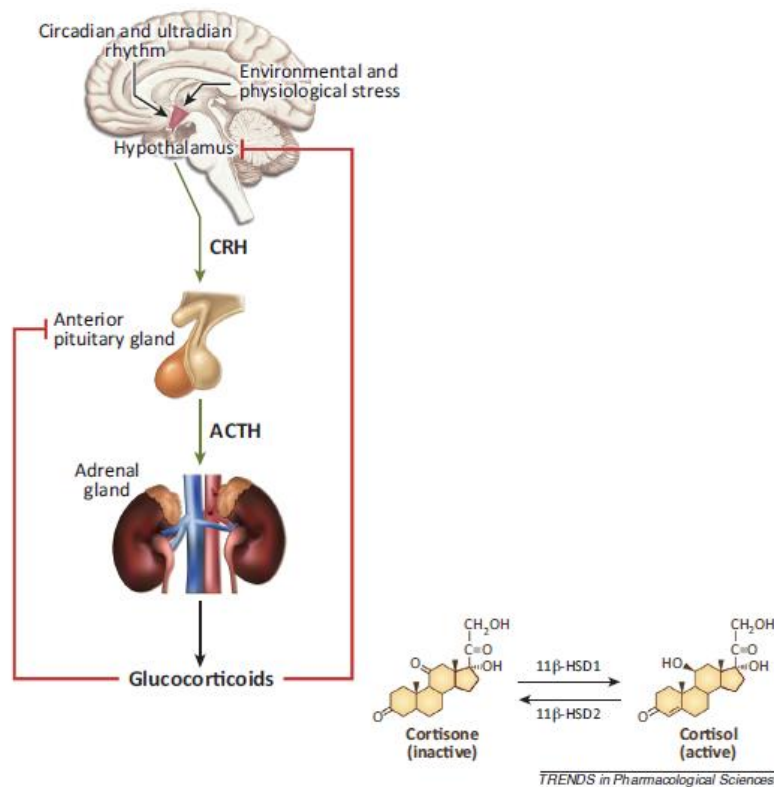
Τα γλυκοκορτικοειδή (GCS) είναι στεροειδείς ορμόνες, η δομή των οποίων είναι όμοια με αυτή του κυκλοπεντανοφενανθρενίου [4]. Το κυκλοπεντανοφενανθρένιο (**Εικόνα 1**) αποτελείται από 4 κυκλικούς δακτύλιους, οι 3 εκ των οποίων είναι εξαμελείς, ενώ ο τέταρτος δακτύλιος είναι πενταμελής, με συνολικό αριθμό ατόμων άνθρακα 17. Εξάιρεση σε αυτή τη δομή των στεροειδών ορμονών, αποτελεί η βιταμίνη D [4]. Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που διαθέτουν, ποικίλει και η ονοματολογία των στεροειδών ορμονών. Για παράδειγμα, τα στεροειδή που διαθέτουν 21 άτομα άνθρακα ονομάζονται πρεγκνάνες, αυτές που αποτελούνται από 19 άτομα άνθρακα, ανδροστάνες, ενώ αυτές που αποτελούνται από 18 άτομα άνθρακα, εστράνες (πχ. Οιστρογόνα) [4]. Το πιο γνωστό φυσικό γλυκοκορτικοειδές που εντοπίζεται στον οργανισμό είναι η κορτιζόλη. Σήμερα, έχουν συντεθεί πολλά συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, τα οποία έχουν μεγαλύτερη ισχύ και καλύτερη ικανότητα σύνδεσης με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, σε σύγκριση με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς είναι η δεξαμεθαζόνη (DEX) [5].



Εικόνα 1: Η δομή του κυκλοπεντανοφενανθρενίου.

Η φλοιώδης μοίρα των επινεφριδίων είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση και την παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών [4]. Η έκκριση τους υπόκειται σε έλεγχο από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA). Εξωτερικά και εσωτερικά σήματα διεγείρουν τον υποθάλαμο, γεγονός το οποίο οδηγεί στην απελευθέρωση της κορτικοτροπίνης (CRH), η οποία με την σειρά της διεγείρει τη σύνθεση και απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH), στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τέλος, η αδρενοκορτικοτροπίνη διεγείρει την παραγωγή και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων [6]. Με την σειρά τους, η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών, έχουν αρνητική επίδραση τόσο στην CRH όσο και στην ACTH, δημιουργώντας έτσι ένα αρνητικό σύστημα επανατροφοδότησης (**Εικόνα 2**). Το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι αυτό που καθορίζει την απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών και από το γεγονός αυτό καταλαβαίνουμε ότι υπάρχει μια άριστη σχέση μεταξύ του νευρικού και του ενδοκρινικού συστήματος [7].

Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών στον οργανισμό γίνεται με ένα κιρκαδικό ρυθμό [4]. Πιο συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη έκκριση τους παρατηρείται κατά τις πρωινές ώρες, ενώ μειώνεται η έκκρισή τους κατά την διάρκεια της ημέρας, φτάνοντας στα χαμηλότερα επίπεδά τους κατά την διάρκεια της νύχτας. Γι' αυτό το λόγο, σε μια πιθανή θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, είναι αποτελεσματικότερη η χορήγηση τους τις βραδινές ώρες, ώστε να μιμηθούν τον φυσιολογικό κιρκάδιο ρυθμό του οργανισμού [8].



Εικόνα 2: Η ρύθμιση της παραγωγής και έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων (HPA). Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ακολουθεί έναν κιρκαδικό ρυθμό. Ο υποθάλαμος εκκρίνει την κορτικοτροπίνη (CRH), η οποία διεγείρει την έκκριση της αδενοκορτικοτροπίνης (ACTH) στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η ACTH, με τη σειρά της, διεγείρει την έκκριση της κορτιζόλης στο αίμα, από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων. Στο αίμα, η πλειονότητα της κορτιζόλης παραμένει ενωμένη με την σφαιρίνη. Η αδέσμευτη κορτιζόλη αποτελεί την ενεργή μορφή της, η οποία μπορεί να μετατραπεί στην ανενεργή μορφή της, την κορτιζόνη [9].

1.2.2 Βιολογική Δράση Γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες απαραίτητες για την ζωή, καθώς διατηρούν την ομοιόσταση του οργανισμού, συμμετέχοντας σε μια πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών [6]. Αρχικά, τα γλυκοκορτικοειδή είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση της γλυκόζης στη συστηματική κυκλοφορία. Πιο συγκεκριμένα, η κορτιζόλη ενισχύει την διάσπαση του γλυκογόνου, ενισχύοντας τη δράση των υπεργλυκαιμικών ορμονών (πχ. κατεχολαμινών, γλυκαγόνης και αυξητικής ορμόνης), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα. Επίσης, η κορτιζόλη παρεμποδίζει την πρόσληψη της γλυκόζης από τον λιπώδη ιστό και από τους σκελετικούς μύες, παρεμβαίνοντας στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Επιπλέον, η κορτιζόλη μειώνει την σύνθεση των πρωτεϊνών και προκαλεί την αποικοδόμησή τους και την απελευθέρωση των αμινοξέων τους, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την απώλεια της μυϊκής μάζας και ενισχύοντας την παραγωγή πρόδρομων μορίων για τη σύνθεση της γλυκόζης. Επιπρόσθετα, η κορτιζόλη ενισχύει την αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια και τα υποστρώματα για την διεξαγωγή της γλυκονεογένεσης και κατά συνέπεια αυξάνει την γλυκόζη στο αίμα. Τέλος, η αύξηση του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, οδηγεί σε αύξηση της απέκκρισης του αζώτου από τα ούρα και αύξηση των ενζύμων που παίρνουν μέρος στον κύκλο της ουρίας [4].

1.3 Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών

1.3.1 Γενικά

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) αποτέλεσε τον πρώτο καλά μελετημένο μεταγραφικό παράγοντα στα θηλαστικά [10]. Ο GR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από συνδέτη, στον οποίο συνδέονται τα γλυκοκορτικοειδή, και έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του, μετά την προσδεσή του στις περιοχές του υποκινητή ή του ενισχυτή των συγκεκριμένων γονιδίων [11].

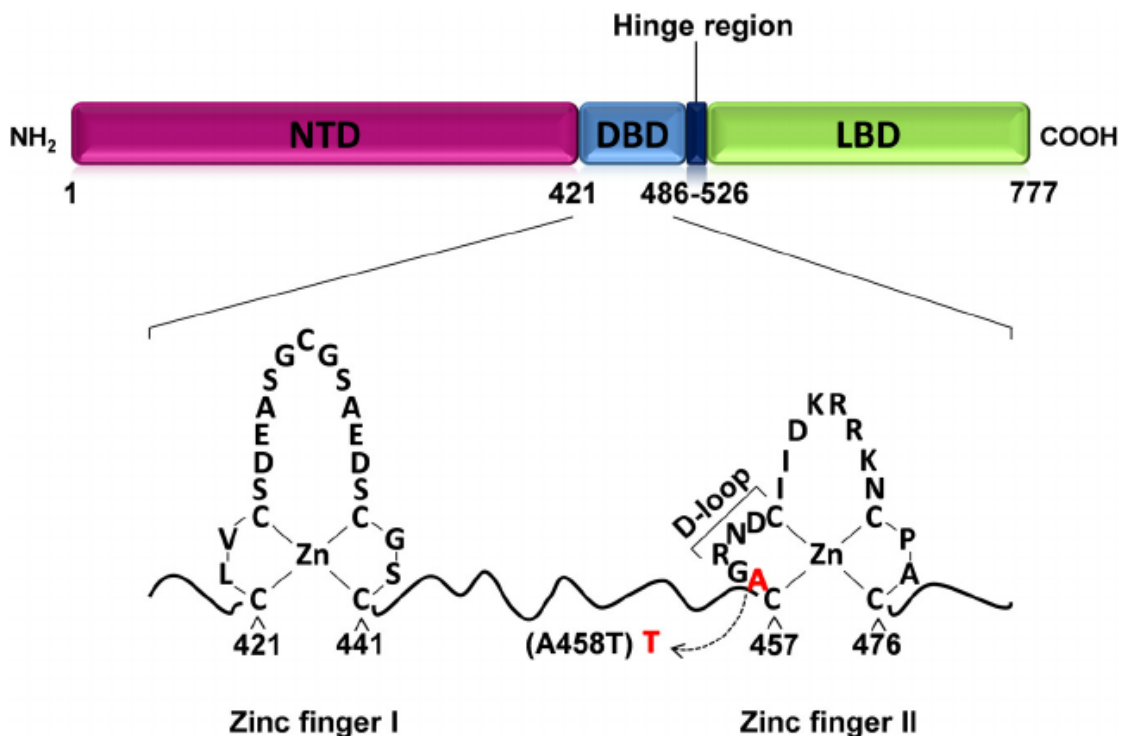
Το γονίδιο NR3C1 κωδικοποιεί τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά στα θηλαστικά, στις αρχές της δεκαετίας του 1980 [12]. Το γονίδιο αυτό, στον άνθρωπο, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και αποτελείται από 9 εξόνια [4].

Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την 5' αμετάφραστη περιοχή, ενώ τα εξόνια 2-9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη και την 3' αμετάφραστη περιοχή. Το αντίστοιχο γονίδιο στο ποντίκι και στον αρουραίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 18 [4].

1.3.2 Δομή

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές: 1) την αμινοτελική (N-τελική) περιοχή, 2) την περιοχή δέσμησης στο DNA (DBD), 3) την C-τελική περιοχή δέσμησης προσδέτη (LBD) (**Εικόνα 3**) [13].

Η N-τελική περιοχή διαθέτει λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής-1, ανεξάρτητη από προσδέτη (AF-1) και πολλές φορές δρά σε συνεργασία με τον παράγοντα AF-2, ο οποίος βρίσκεται στην περιοχή δέσμησης προσδέτη [14]. Στη N-τελική περιοχή, περιέχονται πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης και αποτελεί στόχο πολλών κυκλικο-εξαρτώμενων κινασών (Cdk), καθώς και πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα (MAPK) [15]. Η DBD περιοχή αποτελείται από 2 δακτύλους ψευδαργύρου, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη δέσμηση του DNA, για τον διμερισμό του GR καθώς και για την πυρηνική του μετατόπιση. Κάθε δακτύλιος ψευδαργύρου περιέχει, μεταξύ 4 κατάλοιπων κυστεϊνών, ένα άτομο ψευδαργύρου. Η ύπαρξη του δεύτερου δακτύλιου ψευδαργύρου είναι υψίστης σημασίας για το διμερισμό του GR [13]. Στην C-τελική περιοχή, εδράζεται η LBD περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp). Στην ίδια περιοχή βρίσκεται και ο παράγοντας AF-2, ο οποίος διαθέτει λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής [4]. Οι περιοχές AF-1 και AF-2 είναι απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής, καθώς αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές που σταθεροποιούν την RNA πολυμεράση II [16-18]. Τέλος, μεταξύ των περιοχών DBD και LBD υπάρχει και μια περιοχή σύνδεσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την πυρηνική μετατόπιση του GR [13].



Εικόνα 3: Δομή του GR υποδοχέα. Στην εικόνα φαίνονται η N-τελική περιοχή (NTD), η περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD), μια εύκαμπτη περιοχή σύνδεσης και η C-τελική περιοχή LBD. Η DBD περιοχή αποτελείται από δύο δακτύλους ψευδαργύρου. Σε ποντίκι, στο οποίο το αμινοξύ αλανίνη έχει μετατραπεί σε θρεονίνη, ο GR δεν μπορεί να σχηματίσει διμερή [13].

1.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών

Η έκφραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ολο το σώμα ποικίλει, εξαιτίας της ποικιλομορφίας που υπάρχει στους υποκινητές, στους μεταγραφικούς παραγόντες και στις θέσεις έναρξης της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου.

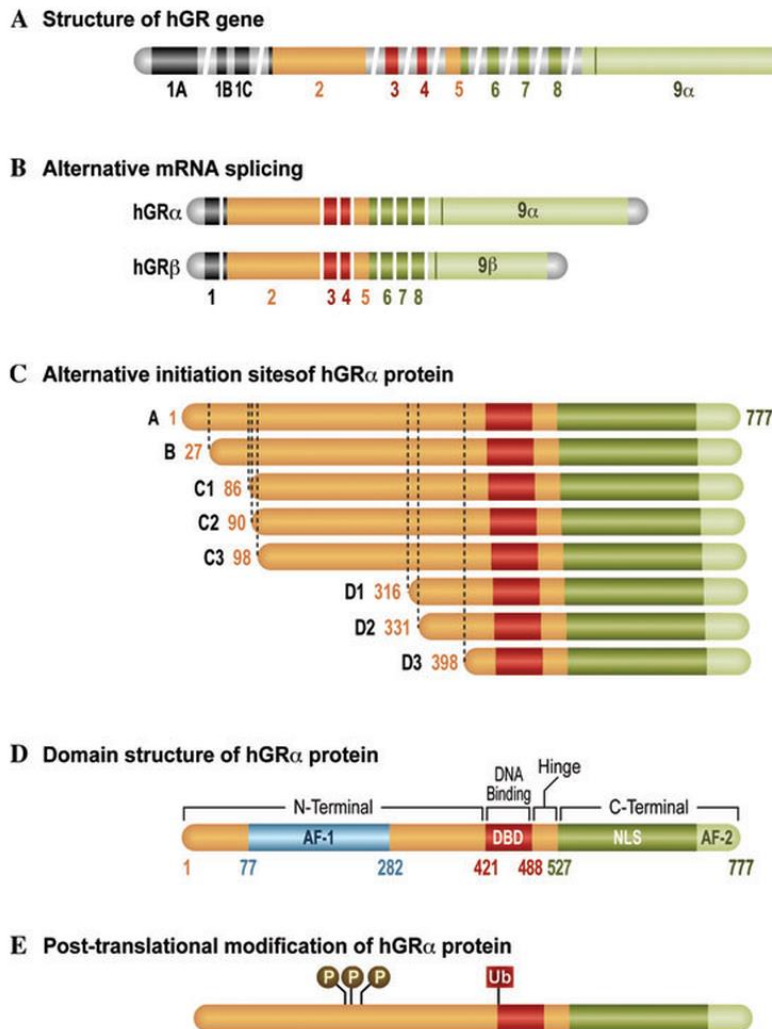
Επιπλέον, εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δύο διαφορετικών ισομορφών του GR, της ισομορφής α και της ισομορφής β (GRα και GRβ) (**Εικόνα 4B**) [19].

Και οι δύο ισομορφές διαθέτουν 727 κοινά αμινοξέα. Η GRα ισομορφή αποτελείται συνολικά από 777 αμινοξέα, ενώ η ισομορφή GRβ περιέχει μόνο 742 αμινοξέα. Επίσης, το μοριακό βάρος της ισομορφής α είναι 97 kDa, ενώ της β 94 kDa. Η GRα ισομορφή είναι η κυρίαρχη στον άνθρωπο, βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα [4], και μπορεί να δεσμεύει τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή, λαμβάνοντας μέρος, στην συνέχεια, σε διάφορους σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Αντίθετα, η ισομορφή GRβ εκφάζεται σε πολύ μικρότερα ποσοστά στον οργανισμό [19]. Είναι γνωστό ότι η ισομορφή GRβ δεν μπορεί να συνδεθεί με τα <<γνωστά>> γλυκοκορτικοειδή και είναι μεταγραφικά ανενεργή. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ισομορφή αυτή μπορεί να συνδέεται με ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές το RU-486, το οποίο αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [19]. Τέλος, η ισομορφή GRβ φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα της ισομορφής α [20-22].

Έχει βρεθεί ότι τα διαφορετικά ποσοστά έκφρασης των α και β ισομορφών στα κύτταρα του παγκρέατος, πιθανόν να σχετίζονται με ανάπτυξη ανοχής στη γλυκόζη, μετά από την λήψη γλυκοκορτικοειδών [4]. Επίσης, υψηλά ποσοστά της μορφής GRβ φαίνεται να σχετίζονται με διάφορες ασθένειες, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, ρευματοειδή αρθρίτιδα, άσθμα και ελκώδης κολίτιδα [19].

Επιπρόσθετα, έχουν ανακαλυφθεί και άλλες ισομορφές του GR στον άνθρωπο, οι οποίες προκύπτουν και αυτές, από εναλλακτικό μάτισμα, οι GR-γ, GR-A και GR-P. Επίσης, διαφορετικές ισομορφές του GR, μπορούν να προκύψουν, εξαιτίας των διαφορετικών θέσεων έναρξης της μετάφρασης του ώριμου mRNA (**Εικόνα 4Γ**). Οι ισομορφές αυτές, έχουν μικρότερο αμινοτελικό άκρο, αλλά έχουν ίδια αλληλουχία αμινοξέων καθοδικά των διαφορετικών θέσεων έναρξης της μετάφρασης. Έτσι, το mRNA των ισομορφών α και β, μπορεί να οδηγήσει σε 8 μεταφραστικές ισομορφές (στην περίπτωση της GRα ισομορφής, προκύπτουν οι εξής: GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, GRα-D3) η έκφραση των οποίων ποικίλλει στους διάφορους

ιστούς. Για παράδειγμα, η ισομορφή, GR α -C3 επάγει προαποπτωτικά γονίδια, αποτελεσματικότερα από ότι η κλασική ισομορφή GR α -A, σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Βέβαια, δεν συμβαίνει το ίδιο με την ισομορφή GR α -D3, πιθανότατα λόγω συγκρότησης περισσότερων συνενεργοποιητών από την GR α -C3 ισομορφή [19].



Εικόνα 4: Διαφορετικές ισομορφές του GR. **A)** Το γονίδιο του GR εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 και αποτελείται από 9 εξόνια, με τα εξόνια 1 και 9 να παρουσιάζουν ποικίλους πολυμορφισμούς. **B)** Οι ισομορφές hGR α και hGR β προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9. **Γ)** Επτά ακόμη ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, προκύπτουν ως προϊόντα διαφορετικών θέσεων έναρξης της μετάφρασης. **Δ)** Η δομή της ισομορφής hGR α . Η ισομορφή αυτή αποτελείται από την N-τελική περιοχή, την περιοχή δέσμευσης DNA, μια εύκαμπτη περιοχή σύνδεσης και την C-τελική περιοχή. **Ε)** Άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της ισομορφής hGR α , είναι δυνατόν να

συμβούν, μετά από φωσφορυλίωση της σερίνης 203, 211 και 226, καθώς και μετά από ουβικουιτινίωση της λυσίνης 426 [19].

1.3.4 Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών

- **Γενωμικός**

Απουσία ορμόνης, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP70, HSP90 και P23) και τις ανοσοφιλίνες (FKBP51 και FKBP52). Παρουσία αυτών των πρωτεϊνών, ο υποδοχέας βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση, αλλά διαθέτει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον προσδέτη [6].

Μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, ο υποδοχέας υφίσταται αλλαγή στην διαμόρφωσή του και αποδεσμεύεται από τις πρωτεΐνες με τις οποίες ήταν συνδεδεμένος. Το γεγονός αυτό, έχει σαν αποτέλεσμα, τη μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα, μέσω των πυρηνικών πόρων [6]. Στον πυρήνα, ο GR διμερίζεται και συνδέεται σε μια ειδική αλληλουχία DNA, η οποία ονομάζεται στοιχείο απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE). Τα GREs αποτελούνται από 15 κοινές βάσεις και έχουν την εξής αλληλουχία: 5'-AGAAGAnnnTGTGT [19]. Ο GR συνδέεται στις δύο παλίνδρομες αλληλουχίες του στοιχείου απόκρισης ως ομοδιμερές. Τα τρία νουκλεοτίδια μεταξύ των παλίνδρομων ακολουθιών είναι απαραίτητα για το διμερισμό του GR [6].

Έχει δειχθεί ότι μετά τη σύνδεση του GR, στα GREs, προκαλείται η επαγωγή πολλών γονιδίων και για το λόγο αυτό, αυτού του είδους τα GREs ονομάζονται θετικά στοιχεία απόκρισης (θετικά GREs). Επίσης, η πρόσδεση του GR, στα GREs, μπορεί να επιφέρει την καταστολή ορισμένων γονιδίων στόχων. Αυτά τα GREs χαρακτηρίζονται ως αρνητικά στοιχεία απόκρισης (αρνητικά GREs).

Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη στοιχείων απόκρισης, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων μέσω του GR: 1) τα απλά, 2) τα σύνθετα και 3) τα προσδεδεμένα (tethering) (**Εικόνα 5**) [23].

Στην περίπτωση των απλών και των σύνθετων GREs, ο GR, μετά την ενεργοποίησή του, συνδέεται απευθείας στο DNA, ως ομοδιμερές. Αντίθετα, στην περίπτωση των προσδεδεμένων GREs, ο GR συνδέεται σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες πχ. STAT5, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στο DNA, ενισχύοντας έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα τους [24]. Σε ποντίκια, τα οποία είχαν μια έλλειψη στη θέση διμερισμού του GR, παρατηρήθηκαν πολύ μειωμένα επίπεδα διαφόρων ηπατικών γονιδίων-στόχων του GR [25]. Η trans ενεργοποίηση πολλών γονιδίων εξαρτάται από το διμερισμό του GR. Παρόλα αυτά, άλλα γονίδια-στόχοι του GR υφίστανται trans ενεργοποίηση, ανεξάρτητα από την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης στη θέση διμερισμού, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση στις συγκεκριμένες περιπτώσεις συμβαίνει μέσω άλλου μηχανισμού, στον οποίο πιθανόν εμπλέκονται οι AF-1 και AF-2

περιοχές του υποδοχέα [26]. Παραδείγματα γονιδίων στα οποία επιτυγχάνεται trans ενεργοποίηση της μεταγραφής, μέσω του GR, είναι αυτά που κωδικοποιούν τα γλυκογενετικά ένζυμα, αμινοτρανσφεράσες τυροσίνης (TAT) [27], και φωσφοπυροσταφυλική καρβοξικινάση (PEPCK) [28].

Από την άλλη πλευρά, στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων, μέσω GR, συμμετέχουν αρνητικά στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (nGREs), τα οποία διαφέρουν στη δομή και την λειτουργία από τα θετικά GREs [29]. Τα nGREs μπορούν να αλληλεπιδρούν είτε με τις θέσεις δέσμησης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του υποκινητή του γονιδίου της προ-οπίομελανοκορτίνης (POMC) [30], είτε με τη θέση δέσμησης του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του υποκινητή της οστεοκαλσίνης [31]. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων μέσω nGREs είναι περιορισμένη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων γονιδίων είναι αυτά, τα οποία συμμετέχουν στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις του GR [29,32].

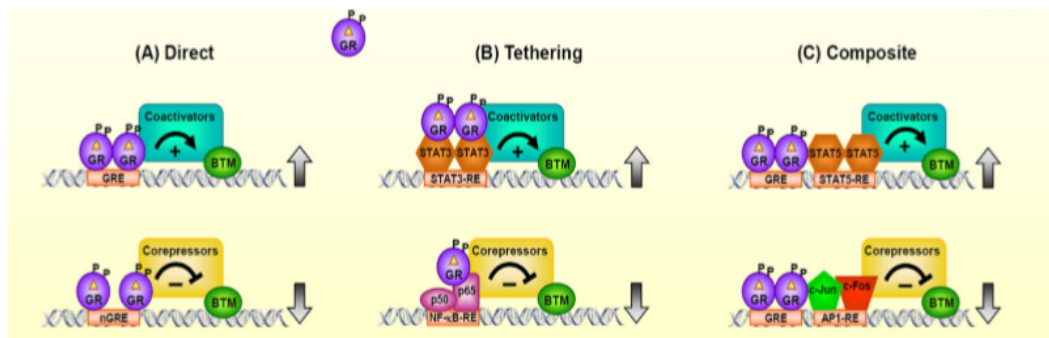
Ο κύριος μηχανισμός δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μέσω nGREs, έγκειται στην ικανότητά του GR, να προσδένεται πάνω σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και να καταστέλλει την δράση τους [24]. Αυτός ο μηχανισμός απαιτεί το διμερισμό του GR [25,33,34]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες στους οποίους ο GR συνδέεται με αυτόν τον τρόπο περιλαμβάνει την πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1 (AP-1), τον παράγοντα ρύθμισης της ιντερφερόνης-3 (IRF-3) και τον πυρηνικό παράγοντα-κΒ (NF-κΒ) [35,36]. Επιπλέον, καταστολή του NF-κΒ μέσω του GR, επιτυγχάνεται μέσω της καταστολής της φωσφορυλίωσης της σερίνης 2, σε μια από τις 2 θέσεις στο καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II, η οποία είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταγραφής [37].

Στα θηλαστικά, όταν αναφερόμαστε στον παράγοντα NF-κΒ εννοούμε το ετεροδιμερές, το οποίο αποτελείται από 2 υπομονάδες, τις p65/p50. Η μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα αυτού, ελέγχεται από την αλληλεπίδρασή του με τις πρωτεΐνες αναστολείς, μέλη της οικογένειας IκΒ. Σε ανενεργή μορφή, ο NF-κΒ βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ενωμένος με μια ή περισσότερες από τις πρωτεΐνες IκΒ, οι οποίες δεν επιτρέπουν την πυρηνική μετατόπιση του. Σε απόκριση διαφόρων σημάτων, τα οποία συμπεριλαμβάνουν και τις κυτοκίνες, οι IκΒ φωσφορυλιώνονται και αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα 26S, με αποτέλεσμα ο NF-κΒ να παραμένει ελεύθερος, να διμερίζεται και να μετατοπίζεται στον πυρήνα [38].

Ο ένας μηχανισμός με τον οποίο ο GR, καταστέλλει τον NF-κΒ είναι μέσω σύνδεσης του σε αυτόν (όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω) και αποτρέποντας την αλληλεπίδρασή του με τις κΒ θέσεις. Άλλος μηχανισμός, ο οποίος όμως δεν απαιτεί αλληλεπίδραση με τον NF-κΒ, αποτελεί η αύξηση των πρωτεϊνών αναστολέων IκΒ από τα γλυκοκορτικοειδή, και κατά συνέπεια, η αναστολή του NF-κΒ και η αύξηση των κυτοκινών [38].

Διαφορετικές θέσεις του GR αλληλεπιδρούν με τους παράγοντες AP-1 και NF-κB και γι'αυτό τον λόγο κάποια μετάλλαξη του GR που δεν του επιτρέπει να καταστείλει τον NF-κB, δεν επηρεάζει την ικανότητα καταστολής του AP-1 [39]. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν γονίδια που παίρνουν μέρος στη φλεγμονή και συνεπώς, η καταστολή τους από τον GR, προσδίδει στα γλυκοκορτικοειδή αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες [24].

Τέλος, άλλοι μηχανισμοί με τους οποίους ο GR καταστέλλει τη λειτουργία γονιδίων είναι μέσω της σύνδεσης του στη N-τερματική κινάση (JNK), οδηγώντας στην καταστολή της και συνεπώς και στην καταστολή του παράγοντα AP-1 [40,41].



Εικόνα 5: Η ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, μέσω του GR, ο οποίος ενεργοποιείται από τα γλυκοκορτικοειδή, γίνεται με τρεις τρόπους: μέσω απευθείας σύνδεσης του στο DNA (A), μέσω σύνδεσης του σε μεταγραφικούς παράγοντες που είναι προσδεσμένοι στο DNA (B) και τέλος μέσω αλληλεπίδρασης του με μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι σε γειτονικές περιοχές DNA (Γ) [6].

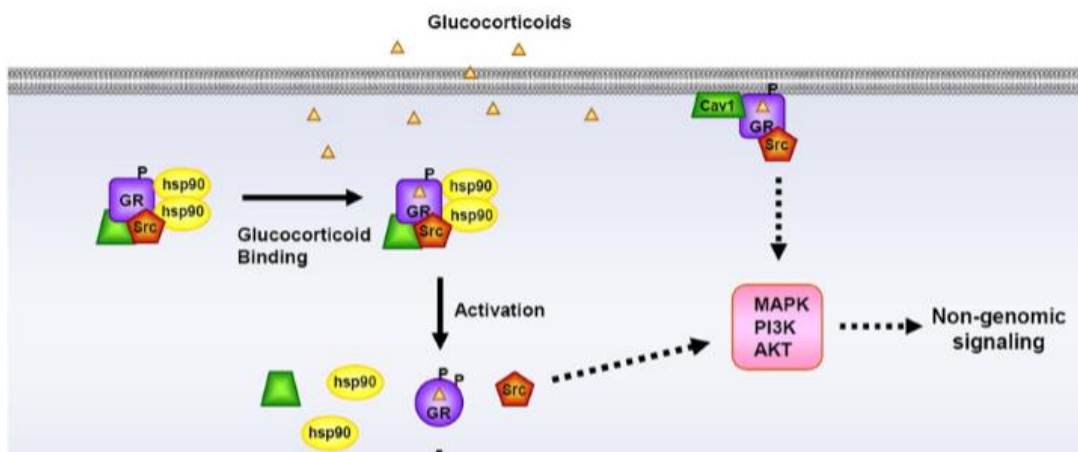
Συμπαράγοντες: Στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, με τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο GR δεν δρά μόνος του, αλλά σε συνδυασμό με άλλους συμπαράγοντες, ώστε να επιτευχθεί η αναδιοργάνωση της δομής της χρωματίνης. Οι συμπαράγοντες μπορεί να είναι είτε συνενεργοποιητές είτε συγκατασταλείς, ανάλογα με τη λειτουργία τους [42,43]. Οι παράγοντες αυτοί αλληλεπιδρούν με την AF-1 περιοχή του GR και μπορούν να προκαλούν ενζυματικές αντιδράσεις πχ. ακετυλάσες ιστονών (HATs) ή απακετυλάσες ιστονών (HDCAs). Παραδείγματα συνενεργοποιητών του GR είναι οι ακετυλάσες CREB-binding protein/p300 (CBP/p300) και οι πρωτεΐνες p160, στην κατηγορία των οποίων ανήκουν οι εξής πρωτεΐνες: Steroid receptor coactivator-1/ Nuclear receptor coactivator 1 (SRC1/NCoA1), Translation Initiation Factor 2/ Glutamate Receptor Interacting Protein 1/ Nuclear receptor coactivator 3 (TIF2/GRIP1/NCoA3), Immunomodulatory protein/ Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3/ Acid tolerance regulatory protein/ Amplified in breast cancer I (pCIP/RAC3/ACTR/AIB1/NCoA3) [44].

Οι TIF2/GRIP1 μπορούν να δράσουν και ως συγκαταστολείς του GR στις θέσεις σύνδεσης με τον παράγοντα AP-1 και τον NF-κΒ [45]. Στους συγκαταστολείς συμπεριλαμβάνονται και οι Nuclear receptor corepressor (NCoR) και οι Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors (SMRT) [24].

- **Μη Γενωμικός**

Ο τρόπος δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που περιγράψαμε πιο πάνω ονομάζεται γενωμικός. Οι αποκρίσεις αυτού του είδους έχουν διάρκεια από μερικά λεπτά έως μερικές ώρες [6].

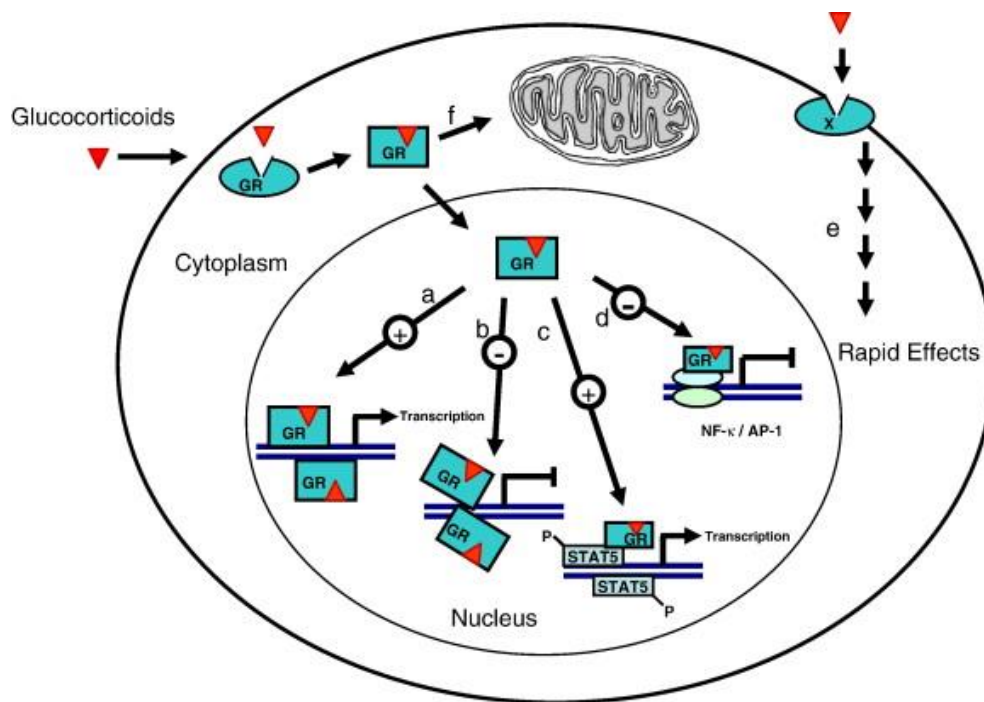
Αντίθετα, στην περίπτωση ενός μη γενωμικού μηχανισμού δράσης του GR, οι αποκρίσεις που επιτυγχάνονται είναι γρήγορες, της τάξεως των δευτερολέπτων έως και λεπτών και δεν απαιτούνται αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων (**Εικόνα 6**) [6].



Εικόνα 6: Ο GR μπορεί να δράσει μέσω ενός μη γενωμικού μηχανισμού, αλλάζοντας την ενεργότητα πολλών κινασών [6].

Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτού του είδους την σηματοδότηση, επιδρώντας στην ενεργότητα πολλών κινασών, όπως οι MAPKs, η PI3K και η AKT. Για παράδειγμα, η εξαρτώμενη από τα γλυκοκορτικοειδή απελευθέρωση των πρωτεϊνών με τις οποίες ο GR βρίσκεται σε σύμπλοκο (πχ. Υποδοχέας κινασών τυροσίνης, c-Src), όταν βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση, στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να οδηγήσει σε μη γενωμικές αποκρίσεις. Πιο συγκεκριμένα, όταν η c-Src, αποδεσμευτεί απ το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον GR, ενεργοποιεί έναν καταρράκτη κινασών, με άμεσο στόχο τη φωσφορυλίωση της αννεξίνης 1, την αναστολή της δράσης της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A2 και την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος [6]. Επιπλέον, η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών στον μεμβρανικό GR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του και την αλληλεπίδραση του με G πρωτεΐνες, γεγονός που οδηγεί και αυτό σε διάφορες μη γενωμικές αποκρίσεις [46].

Επίσης, είναι γνωστό ότι ο GR μπορεί να εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, αλληλεπιδρώντας με την καβεολίνη-1. Στην περίπτωση αυτή, όταν ο GR ενεργοποιείται, μετά την πρόσδεση με τα γλυκοκορτικοειδή, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την <<επικοινωνία>> μεταξύ των συστατικών του μεσοκυττάριου χώρου και τον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο περιλαμβάνει τη δράση της c-Src και τη φωσφορύλιωση των MAPKs από την κοννεξίνη-43 [6].



Εικόνα 7: Μηχανισμοί Δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Η πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον αντίστοιχο υποδοχέα τους μπορεί α) να ενεργοποιήσει ή β) να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και πάλι γ) να ενεργοποιήσει ή δ) να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων. ε) Η πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα, μπορεί, επίσης να οδηγήσει σε μη γενωμικές αποκρίσεις, μέσω της αλληλεπίδρασης με G πρωτεΐνες και άλλα μόρια με μηχανισμούς μεταγωγής σήματος. ζ) Στα μιτοχόνδρια, το σύμπλοκο γλυκοκορτικοειδούς-ορμόνης μπορεί να ρυθμίζει την μιτοχονδριακή μεταγραφή, αλληλεπιδρώντας με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα [47].

1.4 Μιτοχόνδρια και υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

1.4.1 Μιτοχονδριακές λειτουργίες

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν ζωτικής σημασίας οργανίδια, τα οποία παίρνουν μέρος σε ένα πλήθος κυτταρικών λειτουργιών. Το 90% της ενέργειας που χρειάζονται τα κύτταρα, προκύπτει μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μιας διαδικασίας που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Επίσης, τα οργανίδια αυτά εμπλέκονται στον ενδιάμεσο μεταβολισμό, στη βιοσύνθεση της αίμης, στην παραγωγή της ουρίας, καθώς και στη β οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο οξειδωτικό στρές, καθώς παράγουν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), αλλά και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη γήρανση. Για όλους αυτούς του λόγους, διαταραχές στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, έχουν συσχετισθεί με διάφορες νευρομυϊκές ασθένειες, όπως το Αλτσχάιμερ, το Πάρκινσον, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση καθώς και ο καρκίνος [48].

1.4.2 Μιτοχονδριακή εντόπιση του GR

Το 1990 ανακαλύφθηκε ότι ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια του ήπατος, σε απόκριση θεραπείας με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη [49]. Άλλοι ιστοί στους οποίους έχει ανιχνευθεί ο GR στα μιτοχόνδρια είναι σε κύτταρα HeLa [50], στον εγκέφαλο αρουραίου [51], σε κύτταρα γλοιώματος C6 του αρουραίου και σε κύτταρα γλοιώματος στον αμφιβλιστροειδή της σαλαμάνδρας [52]. Επιπλέον, μιτοχονδριακή εντόπιση του GR, παρατηρείται στις κυτταρικές σειρές HepG2, και στα καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος SaOS-2 [53]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι των ισομορφών GR α και GR β , ανακαλύφθηκε ότι η ισομορφή GR α εντοπίστηκε τόσο στα μιτοχόνδρια, όσο και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, σε αντίθεση με την GR β που εντοπίστηκε αποκλειστικά στον πυρήνα [53]. Επιπρόσθετα, μιτοχονδριακή εντόπιση του GR έχει παρατηρηθεί και στα T- λεμφοκύτταρα, η οποία σχετίζεται με την απόπτωση, σε απόκριση θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή, καθώς και σε κύτταρα εγκεφάλου, όπου η παρουσία του σχετίζεται πάλι με ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών ή μιτοχονδριακής μεταγραφής [54].

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός από τον GR έχουν βρεθεί και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, οι οποίοι μπορούν να μετατοπίζονται στο μιτοχόνδριο, μετά την ενεργοποίηση από κάποια ορμόνη, αυτοί μπορεί να είναι ο υποδοχέας των οιστρογόνων, των ανδρογόνων, ο υποδοχέας των θυροειδών ορμονών, ο <<ορφανός>> υποδοχέας Nur 77/TR3, η α ισομορφή του υποδοχέα ρετινοειδών (RXR α), ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος RAR και οι πρωτεΐνες συνενεργοποιητές PPAR β και γ 2 [48].

1.4.3 Μηχανισμοί μέσω των οποίων ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών πιθανόν να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια

Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών του μιτοχονδρίου είναι πυρηνικά κωδικοποιούμενες, η μετάφραση τους πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα και τελικά εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω διαφόρων μηχανισμών, έτσι ώστε να ασκήσουν τις δράσεις τους [55].

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί μέσω των οποίων οι κάθε λογής πρωτεΐνες εισέρχονται στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο το κλασικό μονοπάτι εισαγωγής της πλειονότητας των πρωτεϊνών περιλαμβάνει το σύμπλοκο της μετατοπάσης της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Translocase of the mitochondrial outer membrane, TOM), το οποίο δρά σε συνδυασμό με την τη μετατοπάση της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Translocase of the inner membrane, TIM), ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά των πρωτεϊνών εντός του μιτοχονδρίου [56].

Το σύμπλοκο TOM αποτελείται από διάφορες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των TOM20, TOM40 και TOM70 [56]. Η πρωτεΐνη TOM20 είναι υπεύθυνη για την είσοδο προ-πρωτεϊνών, οι οποίες στο N-τελικό άκρο τους φέρουν αλληλουχία-σηματοδότησης με στόχο την μήτρα του μιτοχονδρίου, καθώς και πεπτιδίων-οδηγών (leaders peptides). Από την μεριά της, η TOM70 είναι υπεύθυνη για την είσοδο υδροφοβικών προ-πρωτεϊνών πχ. μεταβολιτών της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου [55]. Αυτές οι προ-πρωτεΐνες για να διατηρήσουν την διαλυτότητα τους συνδέονται με τις ATP-εξαρτώμενες πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 kDa (HSP70) και 90 kDa(HSP90), οι οποίες με την σειρά τους συνδέονται με την N-τελική περιοχή της TOM70 [57,58]. Κατά την είσοδο των προ-πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο μέσω αυτού του μηχανισμού φαίνεται ότι οι προ-πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδρούν με την C-τελική περιοχή της TOM70 [55]. Τέλος, η πρωτεΐνη TOM40 ανήκει στην οικογένεια των τασιοεξαρτώμενων ανιονικών καναλιών-πορινών (VDAC) και αποτελείται από υδροφιλικές και υδροφοβικές περιοχές, σχηματίζοντας ένα κανάλι με δομή β-βαρελιού (β-barrel). Το κανάλι αυτό επιτρέπει την είσοδο τόσο υδροφοβικών πρωτεϊνών πχ. πρωτεΐνες μεταφορείς, όσο και υδροφιλικών πρωτεϊνών πχ. πρωτεΐνες της μήτρας του μιτοχονδρίου [56].

Όπως είναι ο γνωστό από την βιβλιογραφία, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δεν διαθέτει το συνηθισμένο αμινοτελικό πεπτίδιο με μιτοχονδριακή στόχευση, το οποίο βρίσκεται στις περισσότερες πρωτεΐνες, οι οποίες εισέρχονται στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, μια εσωτερική αλληλουχία του GR, που αποτελείται από τα αμινοξέα 601-635 έχει την ικανότητα να λειτουργεί ως ένα πεπτίδιο που στοχεύει στα μιτοχόνδρια [53].

Συμπερασματικά, με βάση όλα τα παραπάνω και δεδομένου ότι ο GR όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σχηματίζει σύμπλοκο στο οποίο συμμετέχουν οι HSP70, HSP90 και η ανοσοφιλίνη FKBP52 [55], είναι πιθανόν να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να ασκεί τις δράσεις του, με κάποιον από τους παραπάνω μηχανισμούς.

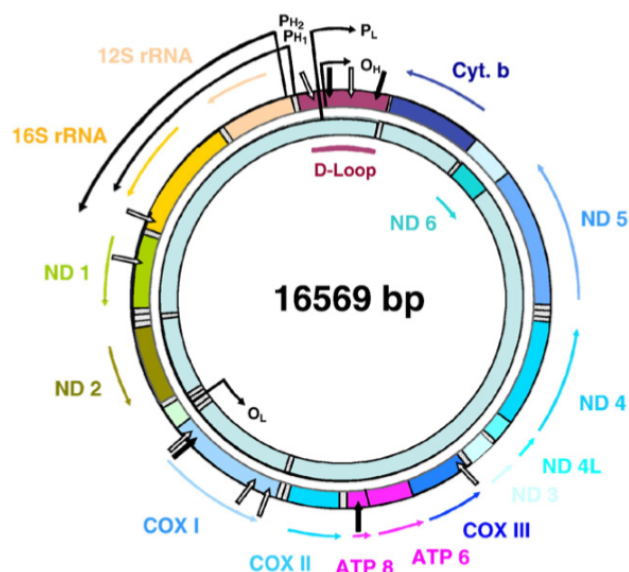
1.4.4 GR και Μιτοχονδριακή Μεταγραφή

Ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, όπως ήδη αναφέρθηκε, και να ρυθμίζει την μιτοχονδριακή μεταγραφή. Για το λόγο αυτό, αρχικά είναι αναγκαίο να αναφερθούν κάποιες γενικές πληροφορίες σχετικά με το μιτοχονδριακό DNA.

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο με μοριακό βάρος 16.569 βάσεις (bp), το οποίο φέρει 13 γονίδια που κωδικοποιούν υπομονάδες ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, συστατικά της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Επίσης, το ανθρώπινο mtDNA κωδικοποιεί 2 rRNAs και 22 tRNAs, απαραίτητα για την πρωτεϊνσύνθεση που επιτελείται στα μιτοχόνδρια [59].

Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA αποτελούνται από πουρίνες και πυριμιδίνες σε άνιση κατανομή, παράγοντας έτσι τη βαριά (H) και την ελαφριά (L) αλυσίδα. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κύριο υποκινητή (PL), ενώ η βαριά από 2 κοντινούς υποκινητές (PH1 και PH2), σε μια περιοχή ελέγχου, η οποία αποτελείται και από έναν εκτοπισμένο βρόχο (D Loop). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης φαίνεται να περιορίζεται στη D Loop, αν και η ύπαρξη ενδοκυττάρων ρυθμιστικών αλληλουχιών, πιθανόν, να υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων, ίσως, να πραγματοποιείται και σε άλλα στάδια. Η μεταγραφή των γονιδίων από τους υποκινητές PL και PH2 παράγει μακριά πολυκιστρονικά μόρια mRNA, μερικά από τα οποία κατέχουν το πλήρες μήκος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η απελευθέρωση των ώριμων mRNAs και tRNAs, γίνεται μετά την αποκοπή των tRNAs από το πολυκιστρονικό mRNA [47]. Σε αντίθεση με τους άλλους 2 υποκινητές, η μεταγραφή από τον υποκινητή PH1 παράγει μικρά μόρια mRNA, τα οποία περιλαμβάνουν και τα 2 rRNAs και καταλήγουν σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου του tRNA^{Leu}, καθοδικά του 16S Rrna [59]. Ένας τερματικός μεταγραφικός παράγοντας (mTERF), προωθεί τη λήξη της μεταγραφής, η οποία ξεκινάει από τη θέση πρόσδεσης του υποκινητή PH1 [47].

Τα mRNAs κωδικοποιούν τις επτά υπομονάδες του συμπλόκου I (ND 1-6 και ND4L), τις τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COXI, COXII και COXIII), δύο της ATP-συνθάσης (ATP 6,8), μια του κυτοχρώματος b (cyt-b), δύο ριβοσωμικά rRNAs (12S και 16S rRNA) και είκοσι δύο tRNAs [47]. Η ND6 και τα tRNAs της γλουταμίνης, της αλανίνης, του ασπαραγινικού οξέος, της κυστεΐνης, της τυροσίνης, του γλουταμινικού οξέος και της προλίνης είναι αποτέλεσμα της μεταγραφής της ελαφριάς αλυσίδας. Επιπλέον, έχουν βρεθεί τρεις μεταγραφικοί παράγοντες στο mtDNA, ο mTFA, ο mTFB1 και ο mTFB2 [47].



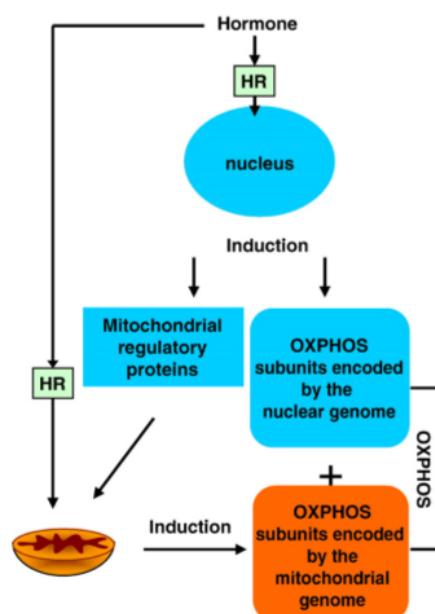
Εικόνα 8: Αναπαράσταση του μιτοχondριακού γονιδιώματος των θηλαστικών (mtDNA). Το mtDNA είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο, το οποίο αποτελείται από μια ελαφριά (L) και μια βαριά (H) αλυσίδα, με μοριακό βάρος 16569 βάσεις. Η μεταγραφή της L αλυσίδας πραγματοποιείται από τον υποκινητή PL, ενώ της H αλυσίδας, από δύο άλλους υποκινητές, τους PH1 και PH2. Τα mRNAs που προκύπτουν από τη μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας, κωδικοποιούν τις τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COXI, COXII και COXIII), επτά υπομονάδες του συμπλόκου I (ND 1-6 και ND4L), δύο υπομονάδες της ATP-συνθάσης (ATP 6,8), μια του κυτοχρώματος b (cyt-b), είκοσι δύο tRNAs και δύο ριβοσωμικά rRNAs (12S και 16S rRNA) [47].

Όσον αφορά τα γλυκοκορτικοειδή, όπως ήδη έχει αναφερθεί, συδέονται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και επάγουν την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων [60]. Σε ποντίκια στα οποία έχουν αφαιρεθεί χειρουργικά τα επινεφρίδια, μετά την χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, παρατηρείται πυρηνική σύνθεση RNA, η οποία συμπεριλαμβάνει και τα mRNAs των επαγόμενων ενζύμων, το ριβοσωμικό RNA καθώς και το tRNA [61-63]. Επίσης, σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι ορμόνες ενεργοποιούν και την σύνθεση του μιτοχondριακού RNA. Η σύνθεση αυτή σχετίζεται με τη διαδικασία αναπαραγωγής της ενέργειας, καθώς ο κύριος ρόλος του μιτοχondριακού γονιδιώματος, όπως ήδη έχει αναφερθεί, είναι να κωδικοποιεί τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (OXPHOS) και επίσης τα RNAs συμμετέχουν και στην σύνθεση των πρωτεϊνών του μιτοχondρίου [60].

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να τονισθεί ότι οι περισσότερες υπομονάδες OXPHOS είναι πυρηνικά κωδικοποιούμενες και είναι απαραίτητες για το σωστό σχηματισμό του συμπλόκου της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, πρέπει να αναφέρουμε ότι η μιτοχondριακή RNA πολυμεράση (POLRMT), ο μιτοχondριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM), καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας B2 (TFB2M), που συγκροτούν τη μεταγραφική <<μηχανή>>, κωδικοποιούνται όλα από τον πυρήνα [64]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αναγκαιότητα της συνεργασίας μεταξύ πυρηνικής και μιτοχondριακής μεταγραφής [60].

Η συνεργασία μεταξύ της πυρηνικής και της μιτοχονδριακής μεταγραφής των OXPHOS ξεκινάει από τον πυρήνα (**Εικόνα 11**), όπου ένα σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα συνδέεται πάνω στα στοιχεία απόκρισης HREs, έτσι ώστε να αυξήσει την μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS, καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων που απαιτούνται για την μεταγραφή αυτών των γονιδίων. Επιπλέον, επάγεται η έκφραση διαφόρων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια [48].

Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια διαθέτουν HREs και ότι οι στεροειδείς και θυροειδείς ορμόνες μπορούν να εισέρχονται στα μιτοχόνδρια και να επηρεάζουν άμεσα την μιτοχονδριακή μεταγραφή ενισχύει την υπόθεση της συνεργασίας μεταξύ της πυρηνικής και της μιτοχονδριακής μεταγραφής [48,65].



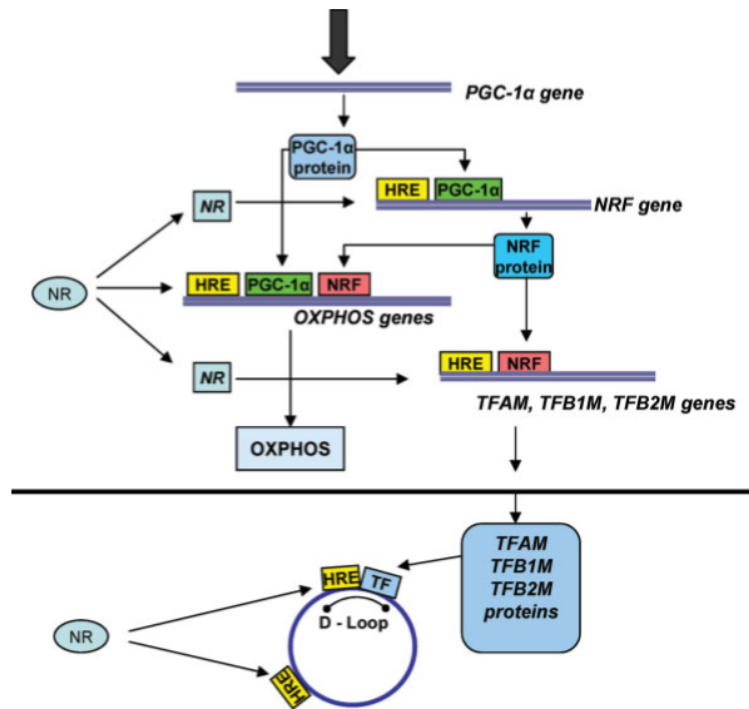
Εικόνα 11: Δράση των στεροειδών και θυροειδών ορμονών στην πυρηνική και μιτοχονδριακή βιοσύνθεση των OXPHOS, μετά την σύνδεση τους στους αντίστοιχους υποδοχείς. Στον πυρήνα το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα επάγει τόσο τη μεταγραφή των γονιδίων OXPHOS, όσο και μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες. Με την σειρά τους, οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες μετατοπίζονται στο μιτοχόνδριο και επάγουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Τέλος, οι ίδιες οι ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή καθώς μπορούν να συνδέονται σε μιτοχονδριακούς υποδοχείς και το σύμπλοκο ορμόνης υποδοχέα, να αλληλεπιδρά με συγκεκριμένες αλληλουχίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα [60,65].

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον GR, έχουν βρεθεί αλληλουχίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, εντός της ρυθμιστικής περιοχής D-Loop, με μεγάλη ομοιότητα με τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs). Επίσης, GREs έχουν βρεθεί σε γονίδια με κομβικό ρόλο, όπως η οξειδάση του κυτοχρώματος c I,

το ND1 και το 12S RNA [60]. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (HepG2) έχουν δείξει τη δυνατότητα σύνδεσης του GR με το μιτοχονδριακό DNA, τόσο στην D-Loop, όσο και στα ND1 και 12S RNA, γεγονός που υποδηλώνει μια άμεση επίδραση του υποδοχέα στη μιτοχονδριακή μεταγραφή [65].

Επιπλέον, παρουσία γλυκοκορτικοειδών, σε κύτταρα HEK 293 και HepG2, τα οποία διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο που έφερε αλληλουχία για μιτοχονδριακή στόχευση του GR, παρατηρήθηκε αυξημένη μιτοχονδριακή μεταγραφή των γονιδίων COX I, COX II, COX III, Cyt B, ATP8, ND I, ND II, 12S και 16S RNA, ακόμη και παρουσία α-αμανιτίνης (αναστολέας της πολυμεράσης II), ενώ η πυρηνική μεταγραφή του COX IV είχε ανασταλεί από α-αμανιτίνη [60,65,66].

Σε κύτταρα HepG2, παρουσία δεξαμεθαζόνης, παρατηρήθηκε και αύξηση των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων TFAM, TFB1M και TFB2M. Περαιτέρω μελέτες σε κύτταρα HepG2, με προσθήκη δεξαμεθαζόνης, επιβεβαίωσαν την αυξημένη έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων και ιδιαιτέρως του COX I [65]. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι ο GR δρα ως μεταγραφικός παράγοντας [67]. Επιπρόσθετα, μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές PCR και RNA-sequencing στον εγκέφαλο, έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών RNAs μεταβάλλονται, ύστερα από έντονο στρες, υποδεικνύοντας τον ρόλο του GR ως μεταγραφικό παράγοντα, υπό κανονικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των μιτοχονδριακών RNAs μειώνονται, με ιδιαίτερη μείωση στα επίπεδα έκφρασης των ND-3, ND-6 και ATP-6 [68]. Επιπλέον μελέτες σε εβρουονικά νευρικά βλαστικά κύτταρα αρουραίου, παρουσία δεξαμεθαζόνης, κατέδειξαν μείωση στην μεταγραφή του συμπλόκου I (ND-3) και του συμπλόκου III (Cytb) των ενζύμων που παίρνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση [69]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από μελέτη σε ποντίκια στα οποία έχει γίνει επινεφριδιοφλοιοκτομή και στα οποία τα επίπεδα έκφρασης πολλών μιτοχονδριακών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων του Cytb, παρατηρήθηκαν μειωμένα, παρουσία μικρής συγκέντρωσης κορτικοστερόνης [70].



Εικόνα 12: Η ρύθμιση της πυρηνικής και μιτοχονδριακής μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS από τις θυροειδείς και στεροειδείς ορμόνες. Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NR) μπορούν να προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές (HREs) πυρηνικών γονιδίων και να κωδικοποιούν τη μεταγραφή γονιδίων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων (NRF1/2), την μεταγραφή γονιδίων OXPHOS, καθώς και τη μεταγραφή μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων (TFAM, TFB1M, TFB2M). Ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NRF1/2 ρυθμίζει τη μεταγραφή των OXPHOS γονιδίων και των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων. Ο υποδοχέας PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma-coactivator 1a) ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή κάποιων πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και έμμεσα την πυρηνική μεταγραφή κάποιων γονιδίων OXPHOS, μέσω επαγωγής του μεταγραφικού παράγοντα NRF1/2, αλλά και και την μιτοχονδριακή μεταγραφή κάποιων γονιδίων OXPHOS, μέσω επαγωγής κάποιων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων. Οι παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν τα OXPHOS είναι οι στεροειδείς και θυροειδείς ορμόνες, ο παράγοντας IFN gamma, το στρες, διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά και διάφορα ασβεστιοεξαρτώμενα μονοπάτια [48].

1.4.5 Άλλοι Πυρηνικοί Μεταγραφικοί παράγοντες στα Μιτοχόνδρια

Εκτός από τους πυρηνικούς υποδοχείς που αναφέρθηκαν πιο πάνω, έχουν βρεθεί και πολλοί πυρηνικά κωδικοποιούμενοι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι μετατοπίζονται στο μιτοχόνδριο. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες, παίρνουν μέρος στη φυσική ανοσία, στην απόπτωση, καθώς και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων είναι οι NF-κΒ, AP-1, CREB, P53, (**Εικόνα 13**) c-Myc, Wnt13, Dok-4, HMGA1 και η c-Src [47]. Επιπλέον, έχουν βρεθεί και θέσεις δέσμησης για αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες στο μιτοχόνδριο, με ομολογία ως προς τις αντίστοιχες θέσεις στον πυρήνα [47].

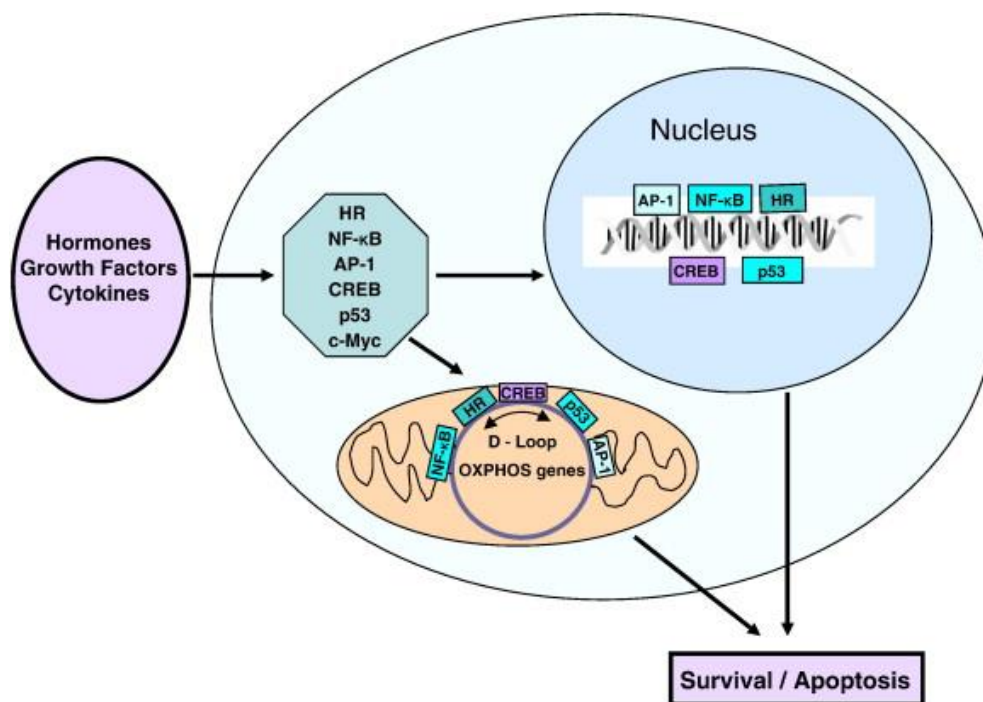
Όσον αφορά τον NF-κΒ, έχει εντοπιστεί στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς των T-λευκοκυττάρων. Ο παράγοντας αυτός, εμπλέκεται σε αποπτωτικές αποκρίσεις, καθώς η υπομονάδα p65, από την οποία αποτελείται, μαζί με την πρωτεΐνη I-κΒα απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια, όταν επάγεται απόπτωση. Επιπλέον ο NF-κΒ έχει βρεθεί στα μιτοχόνδρια της ανθρώπινης κυτταρικής σειράς των ινοβλαστών HT1080, στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές LNCaP και PC3 προστάτη και σε HeLa κύτταρα [47]. Τέλος, έχει αναφερθεί η ύπαρξη του NF-κΒ στα μιτοχόνδρια, στα καρκινικά κύτταρα U937 [71]. Η διέγερση των κυττάρων αυτών με TNFα, έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης I-κΒα. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των mRNAs των COX III και κυτοχρώματος b, μετά από κατεργασία με κυτοκίνες. Επίσης, μπλοκάροντας τη δράση του NF-κΒ, καταστέλλοντας την πρωτεΐνη I-κΒα, είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση των επιπέδων τόσο των mRNAs του COX III όσο και του κυτοχρώματος b. Όλα αυτά συνηγορούν στο γεγονός ότι ο NF-κΒ έχει δράση στο μιτοχόνδριο και ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών mRNAs [47].

Επίσης, και ο μεταγραφικός παράγοντας p53 έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια σε πολλές κυτταρικές σειρές, όπως στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά HT1080, στους ινοβλάστες και στα κύτταρα του ποντικού C3H10T1/2 [47]. Σε διάφορες καρκινικές σειρές, είτε λόγω καταστροφής του DNA είτε λόγω υποξίας, ένα μικρό κομμάτι του p53 έχει εντοπιστεί στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, καθώς και μέσα στο μιτοχόνδριο, μετά από μετακίνησή του από το κυτταρόπλασμα [72]. Η μετακίνηση αυτή, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαπερατότητας του μιτοχονδρίου και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκο με το p53 και έτσι να μπλοκάρουν τη δράση του. Για τον λόγο αυτό, μεταλλάξεις του p53, οι οποίες δεν επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή του με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL, έχουν ως αποτέλεσμα την μη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Επιπλέον, η διεξαγωγή πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης στο p53, έδειξε ότι η μετακίνηση του στο μιτοχόνδριο είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της απόπτωσης, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω ενός μη γενωμικού τρόπου δράσης [72,73]. Επιπρόσθετα, μια μετάλλαξη του p53 που επιδρά αρνητικά στην έκφραση

του 16S rRNA, είχε ως αποτέλεσμα μείωση των RNA που κωδικοποιούν τα γονίδια των OXPHOS, αλλά όχι του πυρηνικού RNA [74-76]. Τέλος, έχει βρεθεί ότι το p53 αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα των μιτοχονδρίων, MtTFA [77].

Όσον αφορά τον παράγοντα AP-1, έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια των κοκιδών κυττάρων της στοματικής κοιλότητας και στα κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού των αρουραίων. Η δράση του εξαρτάται από τη δράση του γλουταμικού οξέος και ενός αγωνιστή του (καϊνικός αγωνιστής), οι οποίοι παίρνουν μέρος κυρίως σε νευρικές αποκρίσεις. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο καϊνικός αγωνιστής αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του συμπλόκου AP-1, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση του τελευταίου στα μιτοχόνδρια και τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής [47].

Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας CREB, έχει βρεθεί στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στον εγκέφαλο του αρουραίου καθώς και στην μήτρα των μιτοχονδρίων των νευρώνων του ποντικού. Η μιτοχονδριακή μορφή του παράγοντα αυτού φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A, η οποία βρίσκεται στο μιτοχόνδριο. Η φωσφορυλιωμένη μορφή έχει την ικανότητα σύνδεσης στο δίκλωνο DNA, το οποίο περιλαμβάνει στοιχεία απόκρισης του ασβεστιοεξαρτώμενου κυκλικού AMP. Συνεπώς, η φωσφορυλίωση του CREB και η σύνδεση του στην D-Loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής [47].



Εικόνα 13: Η ρύθμιση της πυρηνικής και της μιτοχονδριακής μεταγραφής των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων. Παρουσία κυτοκινών, ορμονών και οξειδωτικού στρες, οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζουν τις

διαδικασίες της επιβίωσης και της απόπτωσης, τόσο πυρηνικά, όσο και μιτοχονδριακά. HR: υποδοχέας εξαρτώμενος από ορμόνη, NF-κΒ: πυρηνικός παράγοντας κΒ, AP-1: πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1, CREB: μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης cAMP, p53: ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, c-Myc: ογκογονική πρωτεΐνη, OXPHOS: οξειδωτική φωσφορυλίωση [47].

1.4.6 Δράσεις του GR στα μιτοχόνδρια

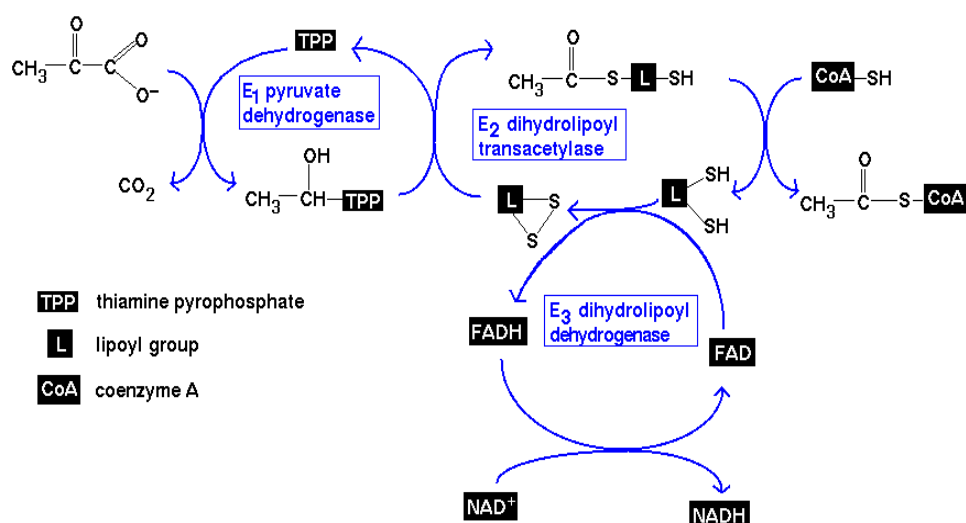
Ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να παίρνει μέρος ή να επηρεάζει διάφορες διαδικασίες που συμβαίνουν εντός των μιτοχονδρίων, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ο μεταβολισμός και η απόπτωση. Γι'αυτό το λόγο παρακάτω θα αναλυθούν αυτές οι 2 διαδικασίες.

1.4.6.1 Μιτοχόνδρια και Μεταβολισμός

Στην μήτρα του μιτοχονδρίου βρίσκονται όλα τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την διεξαγωγή της βιοσύνθεσης της αίμης, του κύκλου του κιτρικού οξέος, της παραγωγή της ουρίας, καθώς και της β οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Ωστόσο, τα ένζυμα που χρειάζονται για τη διεξαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης βρίσκονται αποκλειστικά στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων [78].

❖ Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος

Η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH) είναι ένα σύμπλοκο τριών ενζύμων που βρίσκεται μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα. Το σύμπλοκο αυτό αποκαρβοξυλιώνει οξειδωτικά το πυροσταφυλικό, με σκοπό τον σχηματισμό ακέτυλο-CoA. Η μη αντιστρεπτή αυτή αντίδραση συνδέει τον κύκλο του κιτρικού οξέος και την γλυκόλυση [78].



Εικόνα 9: Η αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος καταλύει 4 αντιδράσεις. Κατά την οξειδωση του πυροσταφυλικού από την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το πυροσταφυλικό στο λιποαμίδιο από την διυδρολιπούλο-τρανσακετυλάση. Στην συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο συμπάραγοντα FAD, από τη διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση και τέλος γίνεται μεταφορά τους στο NAD^+ , για την παραγωγή NADH. Έπειτα, το ακέτυλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο του Krebs για την πλήρη οξείδωση του σε CO_2 [78].

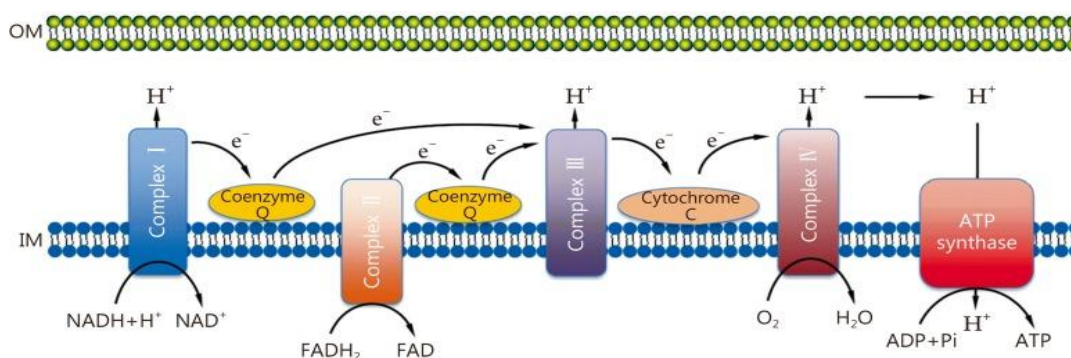
❖ **Κύκλος του Κιτρικού Οξέος**

Το ακέτυλο-CoA που παράγεται από τη γλυκόλυση και από την οξείδωση των λιπαρών οξέων οξειδώνεται πλήρως μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται κύκλος του κιτρικού οξέος, με σκοπό την παραγωγή 2 μορίων CO_2 και την αποθήκευση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, υπό τη μορφή μορίων NADH και FADH_2 , τα οποία θα αξιοποιηθούν κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στον κύκλο του κιτρικού οξέος, βρίσκονται στην μήτρα του μιτοχονδρίου, με εξαίρεση την αφυδρογονάση του ηλεκτρικού που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, καθώς αποτελεί μέρος του συμπλέγματος II της αναπνευστικής αλυσίδας [78].

❖ **Οξειδωτική φωσφορυλίωση**

Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων βρίσκονται τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (**Εικόνα 10**) και είναι τα εξής: 1) η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q (σύμπλοκο I), 2) η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III), και 3) η οξείδωση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Μέσω αυτών των ενζύμων, από τα NADH και FADH_2 , που έχουν παραχθεί κατά τον κύκλο του κιτρικού οξέος, πραγματοποιείται η αναγωγή του

μοριακού οξυγόνου σε νερό. Αρχικά, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c. Επίσης, το συνένζυμο Q (ουβικινόνη) μεταφέρει ηλεκτρόνια από το FADH₂, στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτόχρωμα c. Η παραγωγή του FADH₂ πραγματοποιείται στον κύκλο του κιτρικού οξέος, από την αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, ενώ η παραγωγή του ζεύγους Q-κυτόχρωμα c πραγματοποιείται από την αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q (σύμπλοκο II). Το κυτόχρωμα c διεξάγει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, και έτσι επιτυγχάνεται η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Τέλος, η μετακίνηση των ηλεκτρονίων μέσα στο μιτοχόνδριο, αποσκοπεί στη μετακίνηση των πρωτονίων εκτός της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και συνεπώς στην προσληψή τους από την ATP συνθάση για την παραγωγή ενέργειας (ATP) [78].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των ενζύμων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Μέσω των ενζυμικών συμπλόκων που φαίνονται στην εικόνα, πραγματοποιείται η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό από τα NADH και FADH₂ και απελευθερώνονται και πρωτόνια, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια από την ATP συνθάση για την παραγωγή ενέργειας (ATP) [79].

Αυτός ο πρωταρχικός ρόλος των μιτοχονδρίων στον κυτταρικό μεταβολισμό, απαιτεί τον συντονισμό και τη συνεργασία μεταξύ των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα και σε άλλα οργανίδια, και κυρίως στον πυρήνα. Τα ένζυμα που απαιτούνται για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) κωδικοποιούνται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό DNA. Τα μιτοχόνδρια ελέγχουν τις ανάγκες του κυττάρου για ενέργεια, μέσω ρύθμισης των επιπέδων των OXPHOS. Συνεπώς, εάν οι απαιτήσεις των κυττάρων για ενέργεια δεν είναι πολύ μεγάλες, η αναπνευστική αλυσίδα θα αυξάνει τα επίπεδα του ATP, μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης των OXPHOS, από μεταβολίτες, όπως το ADP. Αντίθετα, σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα χρειάζονται υψηλότερα ποσοστά ενέργειας, θα αυξήσουν τη βιοσύνθεση των OXPHOS, αυξάνοντας τη μεταγραφή τόσο των πυρηνικών, όσο και των μιτοχονδριακών OXPHOS γονιδίων [48].

1.4.6.2 Απόπτωση

Ο GR, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, έχει εντοπιστεί στο μιτοχόνδριο και μπορεί να παίρνει μέρος στην απόπτωση, σε απόκριση θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή. Γι' αυτό τον λόγο είναι αναγκαίο να αναλύσουμε το μηχανισμό με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση. Αρχικά, είναι σκόπιμο να αναφέρουμε κάποιες γενικές πληροφορίες για την απόπτωση.

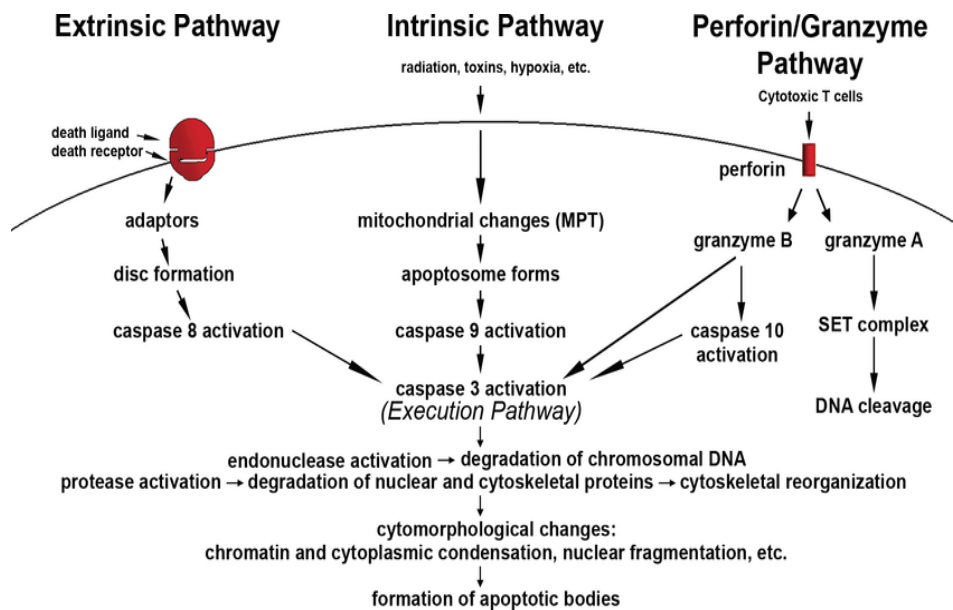
Το 1972 οι Kerr, Wyllie και Currie ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν τον όρο απόπτωση για να περιγράψουν μορφολογικά τον κυτταρικό θάνατο, αν και πολλά από τα συστατικά του αποπτωτικού μηχανισμού είχαν ήδη περιγραφεί [80-82]. Απόπτωση ονομάζεται η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, η οποία χαρακτηρίζεται από μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων [83]. Η διαδικασία αυτή είναι ζωτικής σημασίας, καθώς ρυθμίζει την αναγέννηση των κυττάρων, την ανάπτυξη του εμβρύου, τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, την ορμονοεξαρτώμενη ατροφία, καθώς και τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από χημικά αίτια. Η μη σωστή διεξαγωγή της απόπτωσης μπορεί να οδηγήσει σε διάφορους τύπους καρκίνου, σε αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους [84].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η απόπτωση λειτουργεί ως ένας ομοιοστατικός μηχανισμός, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης, καθώς και ως ένας μηχανισμός άμυνας κατά τη διάρκεια των ανοσολογικών αποκρίσεων ή σε καταστάσεις όπου τα κύτταρα είναι κατεστραμμένα εξαιτίας διαφόρων ασθενειών ή τοξικών ενώσεων [85]. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι διαφορετικά ερεθίσματα και συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση στα κύτταρα των διαφορετικών ιστών. Για παράδειγμα, τα κορτικοστεροειδή μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση στα θυμοκύτταρα, αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο και σε άλλες κυτταρικές σειρές [84]. Επίσης, κάποια κύτταρα διαθέτουν στην επιφανειά τους Fas ή TNF υποδοχείς και μετά την πρόσδεση ειδικού προσδέτη σε αυτούς τους υποδοχείς οδηγούνται σε απόπτωση. Επιπρόσθετα, ένα προκαθορισμένο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου σε κάποια κύτταρα, μπορεί να μπλοκαρισθεί, μετά την πρόσδεση μιας ορμόνης ή ενός αυξητικού παράγοντα [84].

Στο σημείο αυτό είναι αναγκαίο να αναφέρουμε το γεγονός ότι η απόπτωση διαφέρει από τη νέκρωση, αν και πολλές φορές συγχέονται. Η νέκρωση είναι μια τοξική διαδικασία και δεν απαιτεί παροχή ενέργειας (ATP) από το κύτταρο. Η νέκρωση συνήθως αναφέρεται στις διαδικασίες αποικοδόμησης που υφίστανται τα κύτταρα, μετά τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα, η απόπτωση είναι μια διαδικασία, η οποία απαιτεί παροχή ενέργειας (ATP) από το κύτταρο και περιλαμβάνει έναν καταρράκτη αντιδράσεων, ενεργοποιώντας τις πρωτεάσες κυστεΐνης, οι οποίες είναι γνωστές και ως κασπάσες. Παρότι οι δύο διαδικασίες διαφέρουν, το ίδιο ερέθισμα (πχ. θερμότητα, ακτινοβολία, υποξία) σε χαμηλές δόσεις μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε νέκρωση [84].

1.4.6.2.1 Αποπτωτικός Μηχανισμός

Υπάρχουν δύο κύρια αποπτωτικά μονοπάτια: 1) το εξωγενές και το 2) ενδογενές ή μιτοχονδριακό (**Εικόνα 14**). Τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και τα μόρια που παίρνουν μέρος στο ένα, να επηρεάζουν και το άλλο [86]. Επίσης υπάρχει ένα ακόμη αποπτωτικό μονοπάτι, στο οποίο η κυτταροτοξικότητα προέρχεται είτε από Τ-κύτταρα, είτε από το κοκκιοένζυμο περφορίνης [Martinvalet et al., 2005]. Και στα τρία αυτά μονοπάτια συμμετέχουν διάφορες κασπάσες. Οι κασπάσες, συναντώνται σε ανενεργή μορφή (προκασπάσες) και όταν ενεργοποιηθούν, μπορούν να ενεργοποιήσουν και άλλες προκασπάσες μέσω ενός καταρράκτη μεταγωγής σήματος, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο [84]. Τα μόρια αυτά διαθέτουν πρωτεολυτική δράση και έχουν τη δυνατότητα να <<κόβουν>> τις πρωτεΐνες σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος, με εξειδίκευση, αναγνωρίζοντας και τα γειτονικά αμινοξέα. Οι κασπάσες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: 1) εναρκτήριες (κασπάση 2, 8, 9 και 10), 2) τελεστές (κασπάση 3,6,7) και 3) κασπάσες που παίρνουν μέρος στην φλεγμονή (κασπάση 1, 4 και 5) [83,87]. Άλλες κασπάσες, οι οποίες αναφέρονται στην βιβλιογραφία είναι η κασπάση 11 που παίρνει μέρος στην απόπτωση και στην ωρίμανση των κυτοκινών στο σηπτικό σόκ, η 12, η οποία συντονίζει την απόπτωση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η 13, η οποία βρίσκεται στα βοοειδή και τέλος η 14 που είναι αυξημένη στα έμβρυα [88-91].



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών της απόπτωσης. Κάθε μονοπάτι ενεργοποιεί τις δικές του εναρκτήριες κασπάσες, οι οποίες στη συνέχεια στοχεύουν στην ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Ωστόσο υπάρχει και ένα μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει το κοκκιοένζυμο A και είναι ανεξάρτητο από την ενεργοποίηση των κασπασών [84].

Εξωγενές μονοπάτι

Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει τους υποδοχείς θανάτου, οι οποίοι είναι μέλη της οικογένειας υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF). Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από μια κυτταροπλασματική περιοχή 80 αμινοξέων, η οποία αποτελεί την περιοχή θανάτου και είναι απαραίτητη για τη μετάδοση του σήματος από την επιφάνεια του κυττάρου, στο εσωτερικό του. Υποδοχείς που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία και οι αντίστοιχοι προσδέτες τους είναι οι εξής: TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, FasL/FasR, Apo2L/DR4 και Apo2L/DR5 [84].

Στα σύμπλοκα υποδοχέων-προσδετών, FasL/FasR και TNF- α /TNFR1, οι υποδοχείς σχηματίζουν συστοιχίες και οι τριμερείς προσδέτες τους προσδένονται σε αυτούς, στρατολογώντας και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς που διαθέτουν και αυτές περιοχές θανάτου με τις οποίες μπορούν να συνδέονται με τους υποδοχείς. Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση του προσδέτη Fas, στον αντίστοιχο υποδοχέα του, έχει ως αποτέλεσμα και την πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής FADD (Fas-associated protein with death domain), ενώ η πρόσδεση του TNF στον υποδοχέα του έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογής TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein), η οποία στρατολογεί και άλλες δύο πρωτεΐνες τις FADD και RIP (Receptor-interacting protein kinases). Η πρωτεΐνη FADD αλληλεπιδρά με την προκασπάση 8, μέσω διμερισμού της περιοχής θανάτου. Όλα αυτά τα συμβάντα συντελούν στον σχηματισμό του συμπλόκου που επάγει το σήμα θανάτου (DISC) και την ενεργοποίηση της προκασπάσης 8, σε κασπάση 8 [84].

Ωστόσο, υπάρχει μια πρωτεΐνη, η c-FLIP, η οποία έχει την ικανότητα να συνδέεται στην FADD και στην κασπάση 8 και να σταματά την δράση τους και συνεπώς και την απόπτωση. Άλλη μια πρωτεΐνη, η Toso, μπορεί να καταστέλλει την κασπάση 8 στα T κύτταρα, μπλοκάρωντας την απόπτωση που επάγεται από τον υποδοχέα Fas [92].

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε το γεγονός ότι ενώ υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μέσω του εξωγενούς μονοπατιού, ο βασικός τρόπος δράσης τους επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μονοπατιού [93].

Ενδογενές-Μιτοχονδριακό Μονοπάτι

Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται ως απόκριση σε ενδογενή ερεθίσματα, όπως είναι η UV ακτινοβολία, τα γλυκοκορτικοειδή, καθώς και η πείνα και περιλαμβάνει τα μιτοχόνδρια [93].

Τα παραπάνω ερεθίσματα, προκαλούν αλλαγή στην διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μέσω ανοίγματος των πόρων της, και αλλαγή στο δυναμικό της. Όλες αυτές οι αλλαγές, οδηγούν σε απελευθέρωση δύο ομάδων προ-αποπτωτικών μορίων από τον διαμεμβρανικό χώρο στο κυττασόλιο.

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τις Smac/DIABLO, τις πρωτεάσες σερίνης HtrA2/Omi και το κυτόχρωμα c. Το τελευταίο συνδέεται στον παράγοντα Araf-1 και τον ενεργοποιεί, ενεργοποιώντας και την προ-κασπάση 9 και σχηματίζοντας το αποπτώσωμα. Η προ-κασπάση 9, με τη σειρά της, οδηγεί σε ενεργοποίηση της

κασπάσης 9. Όσον αφορά τις Smac/DIABLO, τις πρωτεάσες σερίνης, καθώς και άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες εμποδίζουν τη δράση των αναστολέων της απόπτωσης, με σκοπό την προώθηση της [84].

Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τον παράγοντα AIF και τις ενδονουκλεάσες G και CAD. Οι παράγοντες αυτοί απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και μετατοπίζονται στον πυρήνα, έχοντας ως στόχο την κατάτμηση του DNA και τη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης. Ο παράγοντας AIF και η ενδονουκλεάση G, δρουν ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση κάποιας κασπάσης, σε αντίθεση με την ενδονουκλεάση CAD, η οποία μετατοπίζεται στον πυρήνα, μετά την κατάτμηση της από την κασπάση-3 [94-96].

Η διεξαγωγή της απόπτωσης ρυθμίζεται και από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τόσο προαποπτωτικές όσο και αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι είτε θετικά είτε αρνητικά την απόπτωση. Στις πρωτεΐνες με αντι-αποπτωτική δράση ανήκουν οι Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-w και BAG, ενώ στις προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες ανήκουν οι Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik και Blk. Η ρύθμιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, μέσω ρύθμισης της διαπερατότητας από τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, θεωρείται ο βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν οι πρωτεΐνες αυτές [84].

Όσον αφορά τη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών είναι γνωστό ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης Bim, επάγοντας την έκφραση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax και Bak, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση αποπτωτικών πρωτεϊνών, καθώς και του κυτοχρώματος c. Όλα αυτά οδηγούν σε ενεργοποίηση της κασπάσης 9 και κατά συνέπεια και της κασπάσης 3, οδηγώντας σε απόπτωση. Συμπερασματικά, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζοντας τα επίπεδα των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών (πχ. Bad, Puma) και των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (πχ. Bcl-2, Bcl-xS) επάγουν ή καταστέλλουν την απόπτωση, αναλόγως τον κυτταρικό τύπο ή τον ιστό [93].

κατατμώντας την Bid σε t Bid. Η τελευταία εισέρχεται στα μιτοχόδια (9) και μαζί με τις Bax και Bak, οδηγούν σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και των SMAC/DIABLO (10). Το κυτόχρωμα c μαζί με τον παράγοντα Araf-1 και την κασπάση 9 σχηματίζουν το αποπτώσωμα και ακολουθεί ένας καταρράκτης σηματοδότησης κασπασών (11). Τέλος οι SMAC/DIABLO αναστέλλουν τις πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης (IAPs) [54].

1.4.6.2.2 Επαγωγή απόπτωσης από τα γλυκοκορτικοειδή και μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν τη δυνατότητα να επάγουν απόπτωση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι ορμόνες αυτές χρησιμοποιούνται εδώ και 50 χρόνια στην ιατρική, για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου [97]. Πιο συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία διαφόρων αιματολογικών κακοηθειών, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, της χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, του πολλαπλού μυελώματος, του λεμφώματος, του λεμφώματος Hodgkin's [93]. Επίσης, χορηγούνται ευρέως, μαζί με την κύρια θεραπευτική αγωγή στις χημειοθεραπείες, καθώς έχουν τη δυνατότητα, να μειώνουν τη ναυτία και τον εμετό που αυτές προκαλούν, αλλά μπορούν και να προστατεύουν τον φυσιολογικό ιστό από την κυτταροτοξικότητα που συνοδεύει αυτές τις αγωγές [97].

Ωστόσο, σήμερα, η χρήση τους περιορίζεται, εξαιτίας της αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή που αναπτύσσεται σε διάφορους τύπους καρκίνων, είτε εξαιτίας της παρατεταμένης χρήσης τους είτε λόγω υποτροπής της ασθένειας [93]. Οι μηχανισμοί, στους οποίους οφείλεται η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή, σχετίζονται με αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μεταλλάξεις στον GR, αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των διαφόρων ισομορφών του GR, αλλαγές στη ρύθμιση των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή μεταβολές στις αλληλεπιδράσεις με διάφορες κινάσες. Για παράδειγμα, παρουσία δεξαμεθαζόνης, σε πειράματα, στα οποία έγινε παροδική διαμόλυνση καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος με την ισομορφή GR α -D του υποδοχέα, η δεξαμεθαζόνη δεν είχε τη δυνατότητα να προκαλέσει απόπτωση, καθώς ούτε και να ανταγωνιστεί τη δράση του παράγοντα NF- κ B [98].

Επιπρόσθετα, σε διάφορα είδη καρκίνων, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν αντι-αποπτωτικές δράσεις και συνεπώς η χρήση τους ως συμπληρωματική θεραπευτική αγωγή σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία, σε αυτές τις περιπτώσεις, έχει αρνητικές επιπτώσεις. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων καρκινικών κυτταρικών σειρών είναι αυτές του μαστού, του εγκεφάλου, της μήτρας, του νευροβλαστώματος, του μελανώματος, του προστάτη, της οροδόχου κύστης, καθώς και ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος [93].

Τέλος, έχει βρεθεί ότι η δεξαμεθαζόνη μπορεί να ασκεί κυτταροπροστατευτική δράση σε κάποιες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, όπως σε κύτταρα ήπατος και σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού και να έχει αντι-αποπτωτική δράση στις καρκινικές σειρές αυτών των ιστών. Για παράδειγμα, σε πειράματα, στα οποία έγινε επαγωγή

της απόπτωσης, σε κύτταρα ήπατος αρουραίου, παρουσία δεξαμεθαζόνης, προκλήθηκε αύξηση των επιπέδων του NF-κΒ και κατά συνέπεια αναστολή της απόπτωσης [99]. Σε άλλα πειράματα, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την απόπτωση μέσω αύξησης των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-xL, MKP-1 καθώς και της SGK-1 [93].

1.5 Αυτοφαγία

1.5.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια της αυτοφαγίας

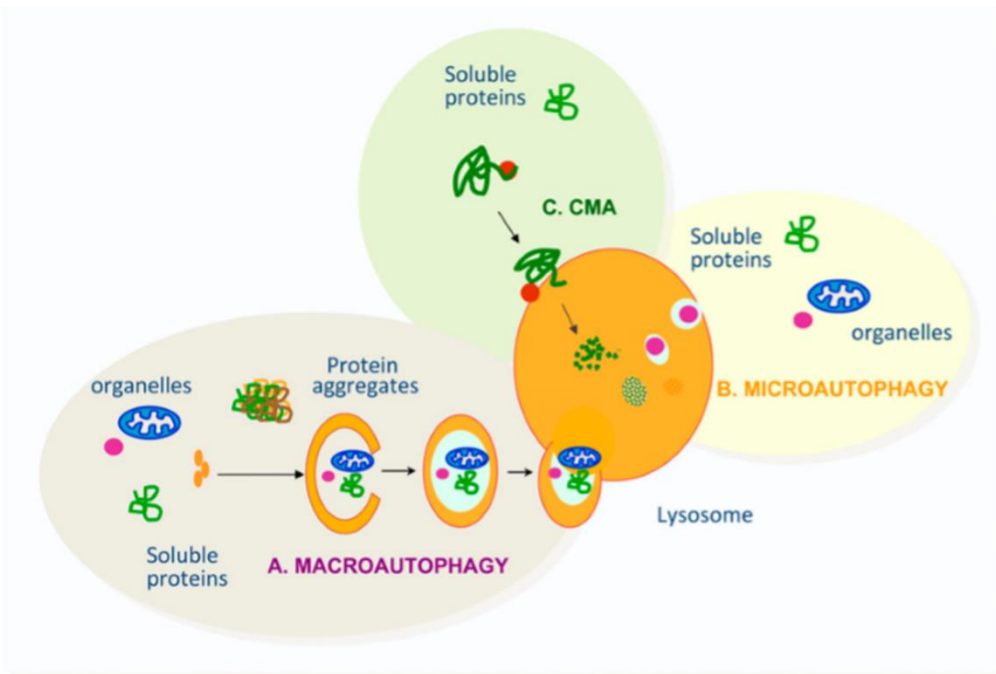
Η καταστροφή των κυττάρων συμβαίνει ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως γενετικές διαταραχές, γήρανση, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, καθώς και εξαιτίας περιβαλλοντικών παραγόντων. Το έργο του ελέγχου και της στοχευμένης απομάκρυνσης των κατεστραμμένων κυττάρων διεξάγεται από μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοφαγία [100]. Η αυτοφαγία είναι μια πολύ καλά ρυθμισμένη κυτταρική διαδικασία, η οποία οδηγεί στην αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών συστατικών, με την βοήθεια των λυσοσωμάτων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιτευχθεί μέσω 3 μηχανισμών (**Εικόνα 16**): 1) μακροαυτοφαγία 2) μικροαυτοφαγία και 3) αυτοφαγία μεσολαβούμενη από συνοδές πρωτεΐνες [101].

- 1) Η μακροαυτοφαγία είναι μια αρκετά καλά μελετημένη διαδικασία, η οποία συμμετέχει στο μεγαλύτερο ποσοστό της αποικοδόμησης που συμβαίνει εντός ενός κυττάρου, για τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Κατά την διάρκεια της μακροαυτοφαγίας, το μόριο που πρόκειται να αποικοδομηθεί εσωκλείεται εντός ενός κυστιδίου που αποτελείται από δύο μεμβράνες (αυτοφαγόσωμα) και το οποίο διαχωρίζεται με αυτόν τον τρόπο, από τα υπόλοιπα συστατικά του κυτοσολίου. Τα συστατικά του κυτοσολίου, που βρίσκονται εντός του αυτοφαγοσώματος υφίστανται αποικοδόμηση, μετά την σύντηξη του αυτοφαγοσώματος από δευτερογενή λυσοσώματα, στα οποία περιλαμβάνονται διάφορα ένζυμα, υπεύθυνα για την υδρόλυση των προς αποικοδόμηση συστατικών [101]. Στα διάφορα στάδια της μακροαυτοφαγίας συμμετέχουν κάποιες πρωτεΐνες που ονομάζονται Atg (autophagy-related), μεταξύ των οποίων το σύμπλεγμα Beclin 1/ κινάση της φωσφατιδυλινοσιτόλης τύπου III, καθώς και το σύμπλεγμα της κινάση της ραπαμικίνης με διάφορες βοηθητικές πρωτεΐνες, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μακροαυτοφαγίας. Η αναγνώριση μεμονωμένων πρωτεϊνών που βρίσκονται στο κυτοσόλιο και χρειάζεται να αποικοδομηθούν δεν είναι εφικτή μέσω του μηχανισμού της μακροαυτοφαγίας. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός διαθέτει εξειδίκευση, όταν το φορτίο που πρόκειται να αποικοδομηθεί αφορά είτε μη λειτουργικά οργανίδια, είτε ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών [101].
- 2) Όσον αφορά τον μοριακό μηχανισμό της μικροαυτοφαγίας στα θηλαστικά, δεν είναι γνωστός, καθώς δεν έχουν ταυτοποιηθεί τα γονίδια που συμμετέχουν σε αυτήν τη διαδικασία. Παρόλα αυτά, είναι γνωστό ότι κατά τη διαδικασία αυτή, τα συστατικά του κυτοσολίου που πρόκειται να αποικοδομηθούν συσσωρεύονται όλα μαζί και περικυκλώνονται σε <<σωληνάκια>> (tubules) ή εναλλακτικά προκαλείται αλλοίωση στην μεμβράνη των λυσοσωμάτων, έτσι ώστε να καταστή δυνατή η εισαγωγή των συστατικών που θα αποικοδομηθούν, εντός των λυσοσωμάτων [101]. Μέσω αυτής

της διαδικασίας είναι δυνατή η αποικοδόμηση λιπιδίων, πρωτεϊνών ή οργανιδίων [100].

- 3) Σε αντίθεση, με τους άλλους δύο μηχανισμούς της αυτοφαγίας, η αυτοφαγία που επάγεται από συνοδές πρωτεΐνες (CMA: Chaperone mediated autophagy) μπορεί με εξειδίκευση να αποικοδομεί μεμονωμένες κυτοσολικές πρωτεΐνες, προκαλώντας τη μετακίνησή τους κατά μήκος της μεμβράνης των λυσοσωμάτων και όχι μέσω εγκόλπωσής τους [101]. Πιο συγκεκριμένα, η Hsc70 (Heat shock chaperone 70), αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη και στη συνέχεια την μεταφέρει στο λυσόσωμα, μέσω σύνδεσής της στην πρωτεΐνη-υποδοχέα, η οποία σχετίζεται με το λυσόσωμα (LAMP2A). Οι πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζονται από την Hsc70 περιέχουν το μοτίβο KFERQ [100].

Η ενεργοποίηση και η λειτουργία ενός εκ των τριών παραπάνω μηχανισμών δεν είναι ανεξάρτητη, αντίθετα απαιτείται συντονισμός των εργασιών τους, ανάλογα με τις ανάγκες των κυττάρων κάθε χρονική στιγμή. Για παράδειγμα, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών ενεργοποιεί τόσο την μακροαυτοφαγία όσο και την αυτοφαγία που εξαρτάται από συνοδές πρωτεΐνες. Η πρώτη ενεργοποιείται στις πρώτες ώρες της έλλειψης (4-6 ώρες), ενώ εάν η έλλειψη των συστατικών συνεχιστεί, η μακροαυτοφαγία μειώνεται και ενεργοποιείται η CMA, η δραστηριότητα της οποίας φτάνει στα μέγιστα επίπεδα, εντός 12 ωρών και συνεχίζει μέχρι να εξαλειφθεί η έλλειψη. Επίσης, το μπλοκάρισμα ενός μονοπατιού οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός άλλου. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι ενώ η μακροαυτοφαγία έχει τη δυνατότητα αποικοδόμησης όλων των υποστρωμάτων της CMA, η έλλειψη της CMA εκθέτει το κύτταρο σε πολλούς στρεσογόνους παράγοντες [101].



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση των τριών τύπων της αυτοφαγίας στα θηλαστικά. **A)** Η μακροαυτοφαγία αποικοδομεί οργανίδια, διαλυτές πρωτεΐνες, καθώς και σύμπλοκα πρωτεϊνών μέσω ενός κυστιδίου που διαθέτει διπλή μεμβράνη. **B)** Η μικροαυτοφαγία αποικοδομεί οργανίδια και διαλυτές πρωτεΐνες,

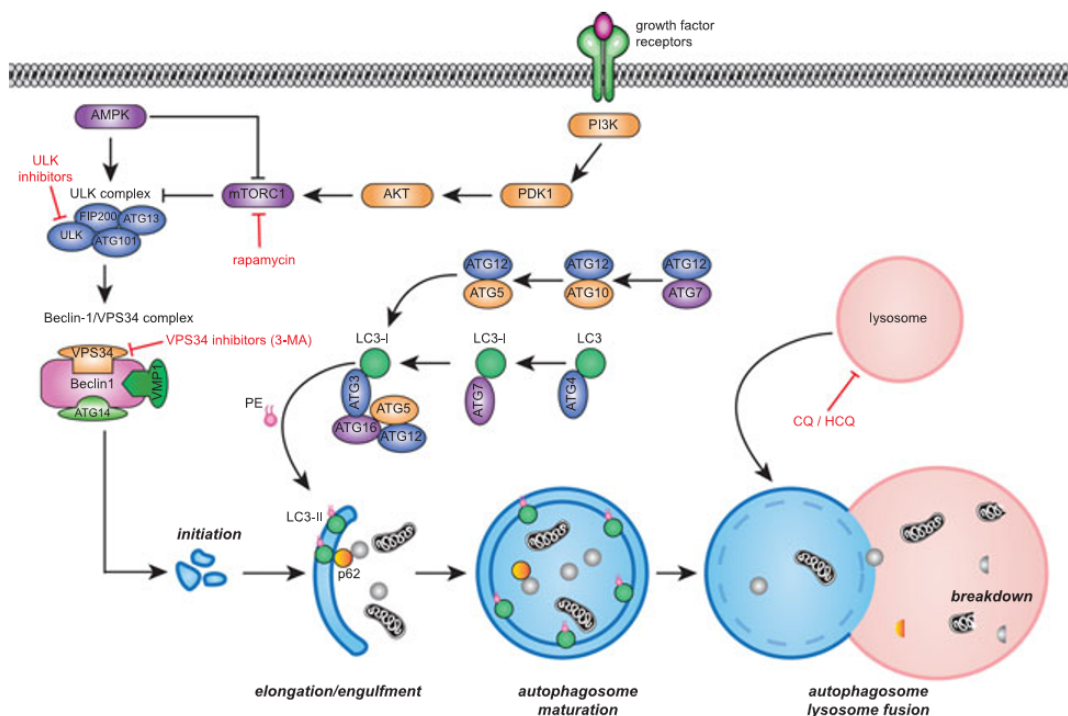
μέσω μικρών κυστιδίων που είναι ενσωματωμένα στο λυσόσωμα. Γ) Η εξαρτώμενη από συνοδές πρωτεΐνες αυτοφαγία (CMA) αποικοδομεί μόνο συγκεκριμένες διαλυτές πρωτεΐνες, χωρίς την αλλαγή της μεμβράνης, που απαιτείται στους προηγούμενους τύπους αυτοφαγίας, για την εισαγωγή του υποστρώματος εντός του λυσοσώματος [101].

1.5.2 << Πυρήνας>> του μηχανισμού της αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία μπορεί να διαχωριστεί στην φάση έναρξης, επιμήκυνσης, ωρίμανσης του αυτοφαγοσώματος, σύντηξης του αυτοφαγοσώματος-λυσόσωματος και τέλος στην φάση της αποικοδόμησης των συστατικών που περιέχονται στα αυτοφαγολυσόσωμα (Εικόνα 17). Η έναρξη της αυτοφαγίας, πραγματοποιείται με την καταστολή του συμπλόκου 1 του μηχανικού στόχου της ραπαμικίνης (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1), το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες, καταστέλλει την κινάση 1 που σχετίζεται με την αυτοφαγία (Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1). Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών ενεργοποιούνται τα μονοπάτια της κινάσης 3 της φωσφοινοσιτόλης (phosphoinositide 3-kinase, (PI3K)/Akt), καθώς και το μονοπάτι των πρωτεϊνικών κινάσων με μιτογόνο δράση (mitogen-activated protein kinase, MAPK), τα οποία καταστέλλουν την TOR σηματοδότηση και ενεργοποιούν την αυτοφαγία. Ένα ακόμη μονοπάτι, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της αυτοφαγίας μέσω ενεργοποίησης της ULK1 κινάσης και καταστολής του mTORC1 μονοπατιού είναι αυτό της πρωτεϊνικής κινάσης που είναι υπεύθυνη για την ομοιοστάση της ενέργειας στα κύτταρα (5'adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK). Η ULK1 κινάση μαζί με το σύμπλοκο Beclin 1-VPS34 βοηθούν στην έναρξη σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος. Ένας αναστολέας του VPS34 και συνεπώς και του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος είναι η 3-μεθυλαδενίνη (3-MA) [102].

Η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος επιτελείται από 2 πρωτεΐνες οι οποίες είναι ομοιοπολικά συζευγμένες, τις ATG12 και ATG5 και μεσολαβείται και από τις πρωτεΐνες ATG7 και ATG10. Οι ATG12 και ATG5 είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες με την πρωτεΐνη ATG16, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σωστή τοποθέτηση των άλλων δύο, ώστε να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος. Στη συνέχεια, το LC3 υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από την πρωτεΐνη ATG4 και σχηματίζει το LC3I, το οποίο με τη σειρά του μεταφέρεται στην πρωτεΐνη ATG3, μέσω σύνδεσης του με την πρωτεΐνη ATG7. Έπειτα, πραγματοποιείται η σύζευξη του λιπιδίου φωσφατιδυλεθαλωναμίνη (PE) στο LC3I, σχηματίζοντας το LC3II. Αυτό το βήμα ενισχύεται και από το σύμπλοκο ATG5/ATG12/ATG16. Το LC3II εισέρχεται στη μεμβράνη του επιμηκυμένου αυτοφαγοσώματος και ακολουθεί η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος, κατά τη διάρκεια της οποίας οι πρωτεΐνες p62/sequestosome 1 (SQSTM1) απομονώνουν τις πρωτεΐνες και τα οργανίδια προς αποικοδόμηση εντός του σχηματιζόμενου αυτοφαγοσώματος. Τέλος, το ώριμο αυτοφαγόσωμα συντήκεται με το λυσόσωμα, για το σχηματισμό του αυτολυσόσωματος, με τη βοήθεια των μεμβρανικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με το λυσόσωμα (LAMP-1 και LAMP-2). Το στάδιο αυτό μπορεί να ανασταλεί από την χλωροκίνη (CQ) και από την υδροξυχλωροκίνη (HCQ). Τα προς αποικοδόμηση συστατικά βρίσκονται μέσα στο

αυτοφαγόσωμα και εκεί υφίστανται αποικοδόμηση από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του λυσοσώματος (πχ. νουκλεάσες, λιπάσες, πρωτεάσες, σουλφατάσες) [102].

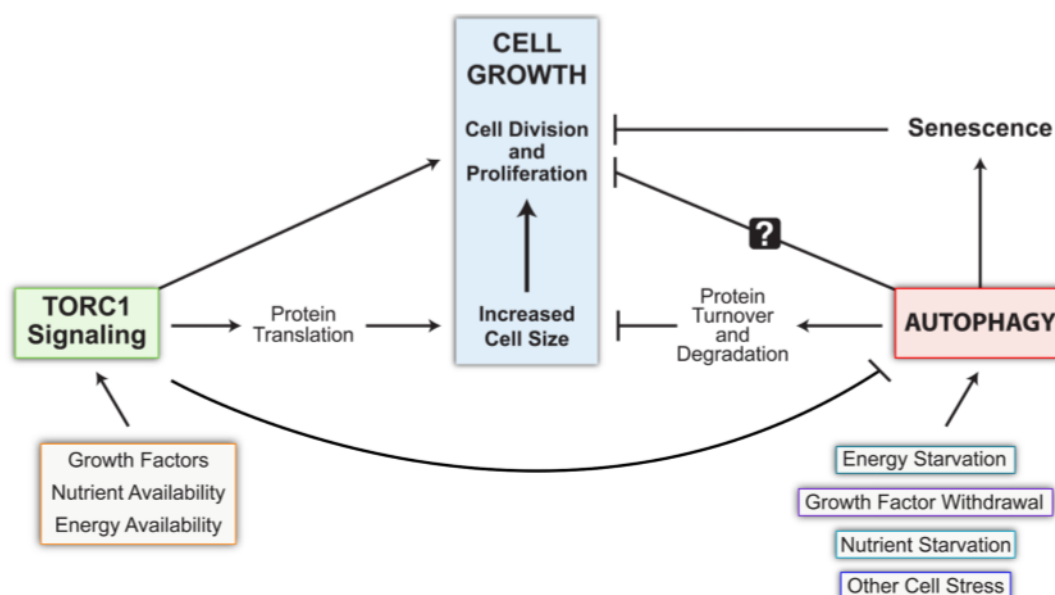


Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της αυτοφαγίας. Η έναρξη της αυτοφαγίας πραγματοποιείται μέσω της ULK1 κινάσης και του συμπλόκου Beclin 1-VPS34. Η επέκταση και η ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος απαιτούν την ύπαρξη πολλών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία. Οι ATG12 και ATG5 συνδέονται με την πρωτεΐνη ATG16 έτσι ώστε να σχηματιστεί το αυτοφαγόσωμα. Έπειτα, το LC3 πρωτεολύεται από την πρωτεΐνη ATG4 και ακολουθεί η σύζευξή του με το λιπίδιο φωσφατιδυλεθιλαμινη (PE) σχηματίζοντας το LC3II. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η απομόνωση των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών, εντός του αυτοφαγοσώματος από τις πρωτεΐνες p62/sequestosome 1 (SQSTM1). Τέλος, πραγματοποιείται ο σχηματισμός του αυτολυσοσώματος, μετά την σύντηξη του ώριμου αυτοφαγοσώματος με το λυσόσωμα και η αποικοδόμηση των συστατικών που βρίσκονται μέσα στο αυτοφαγόσωμα, από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του λυσοσώματος [102].

1.5.3 mTOR Σηματοδότηση και Αυτοφαγία

Η κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζεται από δύο διαδικασίες που έχουν ανταγωνιστική δράση (**Εικόνα 18**): 1) την mTOR σηματοδότηση και 2) την αυτοφαγία. Η ύπαρξη ή η έλλειψη διαφόρων σημάτων, όπως το στρές, οι αυξητικοί παράγοντες, τα αμινοξέα, καθώς και η ενέργεια, μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει ένα από τα παραπάνω μονοπάτια και συνεπώς να ρυθμίσει την κυτταρική ανάπτυξη. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας οδηγεί σε καταστολή της mTOR σηματοδότησης.

Ωστόσο, η απορρύθμιση ενός εκ των δύο μονοπατιών, μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση [103].



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της mTOR σηματοδότησης, της αυτοφαγίας και της κυτταρικής ανάπτυξης. Η σηματοδότηση mTORC1 ενισχύει την κυτταρική ανάπτυξη, προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και την αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, αλλά και καταστέλλοντας την αυτοφαγία. Αντίθετα, η αυτοφαγία καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη μέσω αποικοδόμησης πρωτεϊνών και οργανιδίων. Επίσης, η αυτοφαγία καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενισχύοντας την διαδικασία της γήρανσης. Οι παράγοντες που σηματοδοτούν την έναρξη του mTORC1 μονοπατιού είναι η ύπαρξη των αυξητικών παραγόντων, καθώς και η διαθεσιμότητα των κυττάρων σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια, ενώ έλλειψη αυτών των παραγόντων αλλά και έκθεση των κυττάρων σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες επάγουν την αυτοφαγία [103].

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του μονοπατιού TOR και της αυτοφαγίας αναλυτικά (**Εικόνα 19**), είναι οι εξής:

- 1) Η ινσουλίνη και οι αυξητικοί παράγοντες, που ανήκουν στην κατηγορία των αναβολικών ορμονών, προωθούν την κυτταρική ανάπτυξη, ενεργοποιώντας το TOR μονοπάτι και καταστέλλοντας την αυτοφαγία. Υπάρχουν 2 σύμπλοκα TOR σηματοδότησης, το TORC-1 και το TORC-2. Το TORC-1 είναι ευαίσθητο στην ραπαμικίνη και είναι αυτό, το οποίο ελέγχει την παρουσία των αυξητικών παραγόντων, καθώς και των θρεπτικών συστατικών και θα δώσει το έναυσμα για ανάπτυξη στα κύτταρα [104]. Το πιο κοινό μονοπάτι μέσω του οποίου δρά η ινσουλίνη είναι το PI3K-TOR. Παρουσία, των κατάλληλων αυξητικών παραγόντων, οι υποδοχείς κινασών τυροσίνης θα φωσφορυλιώσουν διάφορα υποστρώματα, με στόχο την ενεργοποίηση των κινασών PI3Ks, τάξεως 1, για την παραγωγή 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατιδυλινοσιτόλης από 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη. Η ύπαρξη της φωσφατιδυλινοσιτόλης στην μεμβάνη ενεργοποιεί το Akt μονοπάτι, το οποίο με τη σειρά του καταστέλλει το σύμπλοκο TSC1/TSC2. Το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιεί την δραστικότητα της Rheb GTPάσης, η

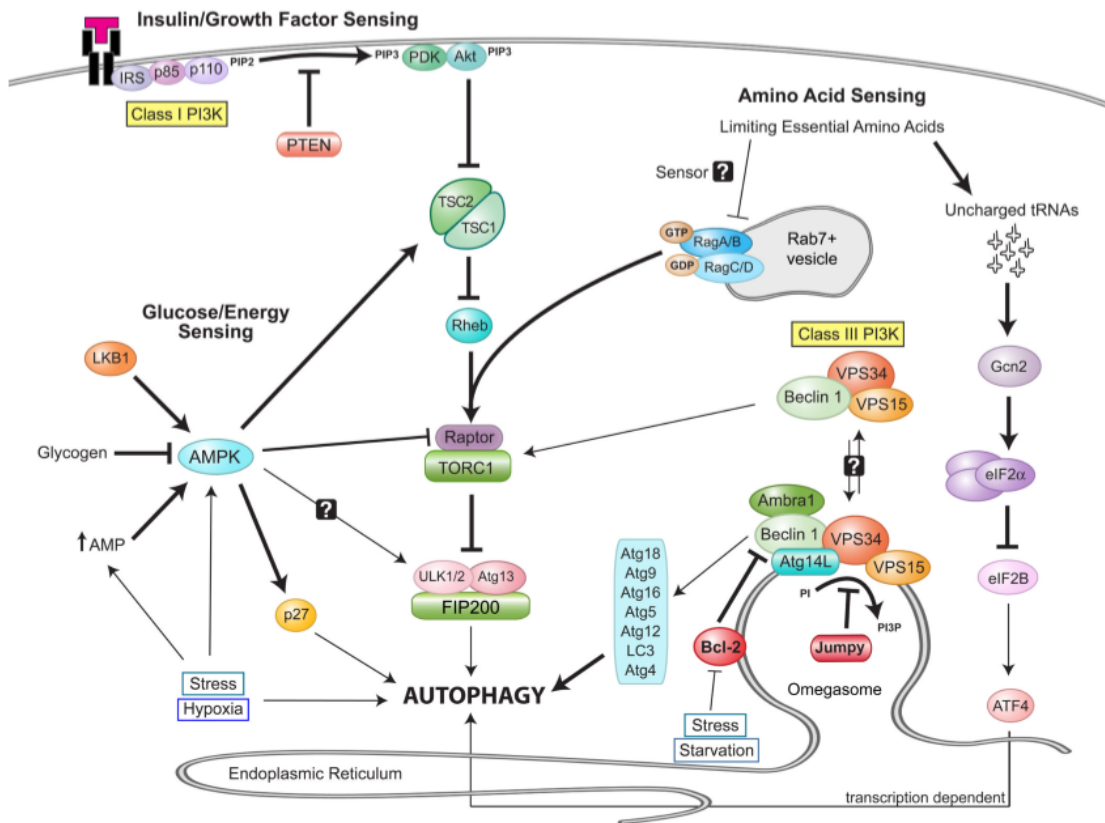
οποία μεταρέπει το GTP σε GDP. Η Rheb GTPάση ενεργοποιεί την κινάση TORC1, σε αντίθεση με την Rheb GDPάση, η οποία την καταστέλλει [103]. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι, η έλλειψη αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε αυτοφαγία, μέσω καταστολής του παραπάνω μονοπατιού και αντίθετα, η καταστολή της αυτοφαγίας απαιτεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-TOR [103].

- 2) Η παρουσία των αμινοξέων και ιδιαίτερα της λευκίνης είναι καθοριστικής σημασίας για την ενεργοποίηση του TOR μονοπατιού και συνεπώς για την κυτταρική ανάπτυξη. Απουσία αμινοξέων, επάγεται αυτοφαγία, μέσω καταστολής της σηματοδότησης TOR και ενεργοποίηση με τη σειρά του, ενός συμπλόκου που περιέχει την πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αυτοφαγία, Atg13, την πρωτεΐνη FIP200 (Focal adhesion kinase-interacting protein 200) και τις κινάσες ULK 1 και 2 [105,106]. Επίσης, ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, μέσω έλλειψης αμινοξέων μπορεί να επιτευχθεί, μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης των RAF κινασών, οι οποίες μπορούν να υφίστανται αρνητική ρύθμιση από τις Ras κινάσες και έτσι να καταστέλλεται η αυτοφαγία [107]. Τέλος, ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, εξαιτίας έλλειψης αμινοξέων, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω σηματοδότησης του παράγοντα eIF2a (eukaryotic translation initiation factor-2 on it's a subunit) καθώς και ως απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στο στρές (ER stress) [103].
- 3) Τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη και το πυροσταφυλικό οξύ είναι απαραίτητα συστατικά ενός κυττάρου, από τα οποία προμηθεύεται την απαραίτητη ενέργεια (ATP) για την επιβίωση του [108]. Έλλειψη ενέργειας, οδηγεί σε ενεργοποίηση της AMPK κινάσης και συνεπώς του AMPK μονοπατιού, εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων του AMP σε σχέση με το ATP. Το μονοπάτι αυτό καταστέλλεται, παρουσία γλυκαγόνης. Τέλος, η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού, καταστέλλει το TOR μονοπάτι, ενώ αντίθετα επάγει την αυτοφαγία [103].
- 4) Το στρες είναι ένας ακόμη καθοριστικός παράγοντας, που επάγει την αυτοφαγία, περιορίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη και προωθώντας την κυτταρική επιβίωση. Στα θηλαστικά υπάρχουν 3 διαμεμβρανικοί υποδοχείς, υπεύθυνοι για τη διαχείριση του στρές (IRE1a, ATF6 και PERK) [109,110]. Μετά την ενεργοποίηση από το στρες, ο υποδοχέας της πρωτεΐνης 1-α που σχετίζεται με την ινσιτόλη (inositol-requiring protein-1^α, IRE1 α), αυτοφωσφορυλιώνεται και υφίσταται αλλαγή στην διαμορφωσή του, γεγονός που του επιτρέπει να συνδεθεί μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογής του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (protein tumor necrosis factor-α, TNF-α), με την κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα που σχετίζεται με τον παράγοντα 2 (TNF-α-receptor-associated factor 2, TRAF2) [111]. Η συναρμολόγηση του TRAF2 είναι καθοριστικής σημασίας για την έναρξη της αυτοφαγίας, ως απόκριση σε σήματα που προέρχονται από τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR) και τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα, την ενεργοποίηση της c-Jun NH(2)-τερματικής κινάσης (JNK) [112]. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη Bcl-2 φωσφορυλιώνεται από την JNK-κινάση και αποσυναρμολογείται από το σύμπλοκο στο οποίο είναι ενωμένη με την πρωτεΐνη του γονιδίου Beclin 1 (σύμπλοκο Bcl-2/ Beclin 1). Επίσης, η JNK-κινάση αλλάζει τα επίπεδα έκφρασης του Beclin 1, γεγονός που ίσως συνηγορεί και αυτό στην αυτοφαγία [103]. Παράλληλα, με την ενεργοποίηση της JNK κινάσης, στρατολογείται και η κινάση IκB (IKK) από τα σύμπλοκα IRE1α- TRAF2, γεγονός που έχει κι αυτό σαν αποτέλεσμα την έναρξη της αυτοφαγίας, με ένα τρόπο ανεξάρτητο από τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα-

κΒ (NF-κΒ). Το μονοπάτι αυτό είναι σημαντικό για την επαγωγή της αυτοφαγίας, καθώς φαίνεται ότι καταστέλλει την TOR σηματοδότηση και επάγει τις κινάσες AMPK και JNK [103].

Επιπρόσθετα, η πρωτεϊνική κινάση PERK (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), οδηγεί στην έναρξη της αυτοφαγίας, μέσω φωσφορυλίωσης του παράγοντα eIF2α και ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία. Τέλος, επαγωγή της αυτοφαγίας, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της ενεργοποίησης του AMPK μονοπατιού από το ασβέστιο. Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) είναι ο κύριος χώρος αποθήκευσης του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Συνεπώς, όταν επηρεαστεί από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες, απελευθερώνεται το ασβέστιο, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε αυτό και επάγεται αυτοφαγία [103].

Όπως είναι γνωστό, το ενδοπλασματικό δίκτυο δέχεται πολλά στρεσογόνα σήματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και γι' αυτό το λόγο, μπορεί να λειτουργεί ως ένας διακόπτης, ο οποίος περιορίζει την κυτταρική ανάπτυξη. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι ο περιορισμός της ανάπτυξης των κυττάρων οφείλεται στο γεγονός ότι το ενδοπλασματικό δίκτυο παρέχει τις απαραίτητες μεμβράνες στο αυτοφαγόσωμα, ώστε να μπορέσει να σχηματιστεί [113]. Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 φωσφορυλιώνεται και αναστέλει την αυτοφαγία μέσω σύνδεσής της στην BH3 περιοχή της πρωτεΐνης Beclin 1. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και ότι το τελευταίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του προ-αυτοφαγοσώματος, πιθανολογείται ότι η Bcl-2 διαχωρίζει την πρωτεΐνη Beclin 1, σε μια υποπεριοχή της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, μακριά από την περιοχή σχηματισμού του προ-αυτοφαγοσώματος στο ενδοπλασματικό δίκτυο [113].



Εικόνα 19: Συντονισμός μεταξύ της σηματοδότησης TORC1 και της αυτοφαγίας. Στην εικόνα, απεικονίζονται τα κρίσιμα σημεία ελέγχου του μονοπατιού TORC1 και της αυτοφαγίας και κατά συνέπεια και της κυτταρικής ανάπτυξης. Οι έντονες γραμμές απεικονίζουν ενεργοποίηση ή καταστολή μορίων που έχουν αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν άμεσα στα συγκεκριμένα μονοπάτια, ενώ οι λεπτές γραμμές απεικονίζουν έμμεση ενεργοποίηση μορίων. Τέλος, τα ερωτηματικά υποδηλώνουν ότι τα συγκεκριμένα στάδια των μονοπατιών δεν έχουν διελευκανθεί ακόμη στα θηλαστικά [103].

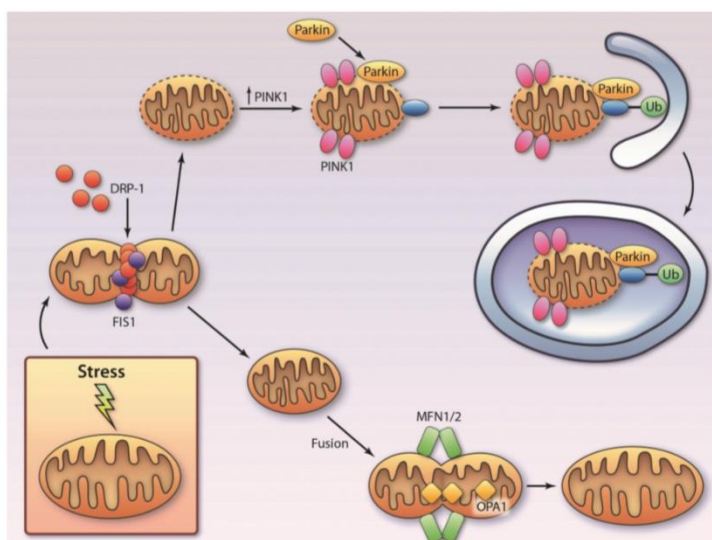
1.5.4 Μιτοφαγία

Η καταστροφή των μιτοχονδρίων οδηγεί σε ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της απόπτωσης και της αυτοφαγίας. Τα κύτταρα για να απομακρύνουν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, τα εσωκλείουν στα αυτοφαγοσώματα, εντός των οποίων τα αποικοδομούν. Η μιτοφαγία βοηθάει τα κύτταρα να εξαλείψουν μόνο τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, χωρίς τα ίδια να οδηγηθούν σε απόπτωση ή σε νέκρωση [114].

Ένα μονοπάτι καθοριστικής σημασίας στη μιτοφαγία είναι αυτό των πρωτεϊνών PINK1 (putative-induced kinase 1)/ Parkin (**Εικόνα 20**). Η πρωτεΐνη Parkin είναι μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης, η οποία κάτω υπό φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια σε περίπτωση απουσίας του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Δψm). Στα μιτοχόνδρια, η πρωτεΐνη

Parkin ουβικτινιλιώνει τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, έτσι ώστε να γίνει επαγωγή της μιτοφαγίας. Οι πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων οι οποίες αποτελούν στόχους της Parkin είναι κυρίως οι εξής: VDAC1 (Voltage-dependent anion-selective channel 1), MFN1 (mitofusin-1), MFN2 (mitofusin-2) και MIRO (Mitochondrial Rho GTPase). Η πρωτεΐνη

PINK1 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία βρίσκεται σε πολύ μικρά ποσοστά στα υγιή μιτοχόνδρια, καθώς κατατιμίζεται από τις μιτοχονδριακές πρωτεάσες και αποικοδομείται από το πρωτεόσωμα. Αντίθετα, σε περιπτώσεις απουσίας του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η PINK1 δεν αποικοδομείται και συσσωρεύεται στο εξωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, στρατολογώντας και την πρωτεΐνη Parkin. Η στρατολόγηση της Parkin μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με άμεση αλληλεπίδρασή της με την PINK1 και αγκυροβόλησής της στα μιτοχόνδρια, είτε εξαιτίας της φωσφορυλίωσης της από την PINK1 ενεργοποιώντας την, είτε λόγω φωσφορυλίωσης διαφόρων υποστρωμάτων της από την PINK1, αυξάνοντας τη συγγένεια της Parkin για τα μιτοχόνδρια. Εναλλακτικά, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η λειτουργία της Parkin είναι ανεξάρτητη από την PINK1 [114].



Εικόνα 20: Ρύθμιση του μηχανισμού της μιτοφαγίας. Αρχικά, τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια υφίστανται διάσπαση εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη DPR-1 (dynamin-related protein 1). Η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης οδηγεί σε συσσώρευση της πρωτεΐνης PINK1 (putative-induced kinase 1) στα μιτοχόνδρια, η οποία με την σειρά της στρατολογεί και την λιγάση της ουβικιτίνης Parkin. Η Parkin ουβικτινιλιώνει τις πρωτεΐνες της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, ώστε να αποικοδομηθούν από τα αυτοφαγوسώματα. Τα υγιή κομμάτια του μιτοχονδρίου διασπώνται από τις πρωτεΐνες mitofusin-1/2 (MFN 1/2) και optic atrophy protein 1 (OPA1) [114].

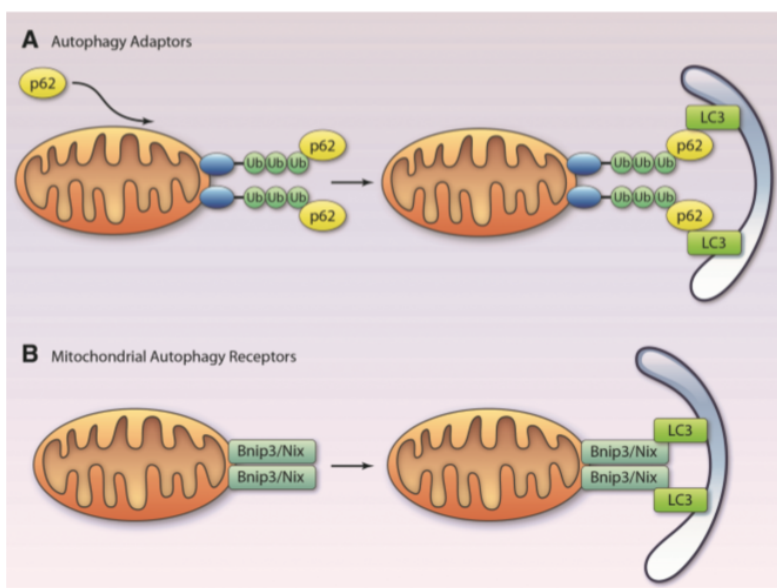
Με βάση όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα αυτοφαγوسώματα αναγνωρίζουν <<ειδικά σήματα>> (ουβικιτίνη) στα μιτοχόνδρια που είναι κατεστραμμένα και πρόκειται να αποικοδομηθούν και έτσι η διαδικασία της

αποικοδόμησης γίνεται επιλεκτική. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη πρωτεϊνών προσαρμογέων και αυτοφαγικών υποδοχέων στα μιτοχόνδρια που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αυτοφαγία. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της πρωτεΐνης προσαρμογής p62/SQSTM1 (**Εικόνα 21A**) [115,116]. Η p62 διαθέτει μια περιοχή με την οποία μπορεί να συνδέεται με τις ουβικιτίνες και άλλη μια περιοχή σύδεσης με το LC3. Συνεπώς, η σύνδεση του p62 στα ουβικιτινωμένα υποστρώματα και η επακόλουθη σύδεση του LC3 σε αυτό, οδηγεί σε αποικοδόμηση των <<σημασμένων μιτοχονδρίων>>. Η ύπαρξη του p62 στρατολογούμενο από το Parkin, φαίνεται να είναι καθοριστικής σημασίας για την επαγωγή της αυτοφαγίας, καθώς έρευνες έχουν δείξει ότι η έλλειψη του έχει οδηγήσει σε αναστολή της αυτοφαγίας. Επίσης, η στρατολόγηση του p62, απουσία του Parkin, δεν επιτρέπει την έναρξη της μιτοφαγίας [116,117].

Μια πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την αυτοφαγία και η οποία θα αναφερθεί και παρακάτω είναι η AMBRA1 (activating molecule in Beclin-1-regulate autophagy protein 1) [118]. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια κατά την έναρξη της αυτοφαγίας. Ωστόσο, μπορεί να βρίσκεται ήδη στα μιτοχόνδρια ενωμένη με την Bcl-2 και μετά από επαγωγή αυτοφαγίας, να αποδεσμεύεται από την τελευταία, ώστε να αλληλεπιδράσει με το Beclin-1 και να αρχίσει τον σχηματισμό νέων φαγοσωμάτων. Η πρωτεΐνη AMBRA1 αλληλεπιδρά και με το Parkin και η αλληλεπίδραση αυτή είναι σημαντική για την αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων [119]. Η επαγόμενη από την AMBRA1 αυτοφαγία εξαρτάται από το Parkin, δεν συμβαίνει όμως το ανάποδο. Συνεπώς, ο ρόλος της AMBRA1 αφορά τον σχηματισμό νέων φαγοσωμάτων, ενώ το LC3 αλληλεπιδρά με τα φαγοσώματα που έχουν σχηματιστεί και μέσω p62 ενώνεται με τα ουβικιτινωμένα μιτοχόνδρια [120].

Επιπρόσθετα, εκτός από το μονοπάτι PINK1/ Parkin, υπάρχει και ένα ακόμη μονοπάτι αποικοδόμησης των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, το οποίο είναι ανεξάρτητο από την δράση της ουβικιτίνης. Στο μονοπάτι αυτό συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8, οι οποίες συνδέονται σε αυτοφαγικούς υποδοχείς. Στη ζύμη αυτοφαγικός υποδοχέας αποτελεί η πρωτεΐνη ATG32, η οποία συνδέεται με την ATG8, μέσω της LC3 περιοχής που διαθέτει. Στα θηλαστικά αυτοφαγικοί υποδοχείς αποτελούν οι πρωτεΐνες NIX και BINIP3L (Bcl-2/adenovirus E1B 19 KDa protein interacting protein 3), οι οποίες διαθέτουν κι αυτές περιοχές πρόσδεσης του LC3, στις οποίες συνδέονται οι πρωτεΐνες LC3 και GABARAP (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein), συνδέοντας με αυτό τον τρόπο τις πρώτες με τα αυτοφαγοσώματα (**Εικόνα 21B**) [114].

Τέλος, υπάρχουν έρευνες που υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες NIX και BINIP3L στα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση του Parkin. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι σε περιπτώσεις υπερέκφρασης του BINIP3L, το Parkin μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, ενώ έλλειψη του Parkin, μειώνει την αυτοφαγική δράση του BINIP3L [121].

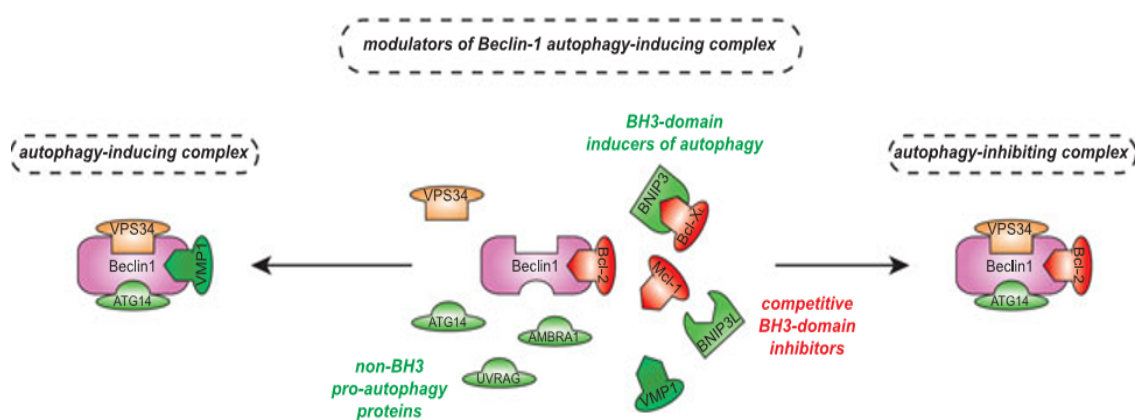


Εικόνα 21: Αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων με την βοήθεια των πρωτεϊνών προσαρμογέων και των αυτοφαγικών υποδοχέων. **A)** Η πρωτεΐνη p62 συνδέεται στις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες-προσαρμογείς που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και μέσω αλληλεπίδρασης της με το LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) δεσμεύεται με τα αυτοφαγοσώματα, ώστε να επιτευχθεί η αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων. **B)** Αυτοφαγικοί υποδοχείς που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια (BINIP3L: Bcl-2/adenovirus E1B 19 KDa protein interacting protein 3, NIX) αλληλεπιδρούν άμεσα με το LC3 και συνεπώς και με τα αυτοφαγοσώματα [114].

1.5.5 Αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και Beclin-1

Η πρωτεΐνη Beclin-1 αποτελεί μόριο κλειδί για την έναρξη ή μη της αυτοφαγίας, καθώς διαθέτει θέσεις σύνδεσης για πολλές προαυτοφαγικές και αντιαυτοφαγικές πρωτεΐνες (**Εικόνα 22**). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1), καταστέλλουν την αυτοφαγία μέσω της σύνδεσης τους στην περιοχή BH3 της πρωτεΐνης Beclin-1 [122,123]. Εκτός από αυτές τις πρωτεΐνες, στην ίδια περιοχή της πρωτεΐνης Beclin-1 μπορούν να συνδεθούν και η πρωτεΐνη του γονιδίου που σχετίζεται με την αντίσταση στην UV ακτινοβολία (UV radiation resistance-associated gene, UVRAG), η πρωτεΐνη 1 της μεμβράνης των κενοτόπιων (vacuole membrane protein 1, VMP1), μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αυτοφαγία (activating molecule in Beclin-1-regulate autophagy protein 1, AMBRA1), καθώς και ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών υψηλής κινητικότητας (high mobility group box 1, HMGB1) [118,124-126]. Επίσης, γνωστή είναι και η ύπαρξη άλλων πρωτεϊνών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και να προωθούν την αυτοφαγία, μη επιτρέποντας τη σύνδεση τους στο Beclin-1 [127,128]. Τέτοιου είδους πρωτεΐνες είναι η πρωτεΐνη 3 που αλληλεπιδρά με την Bcl-2 και επάγεται από την υποξία (hypoxia-inducible Bcl-2 interacting protein 3, BNIP3), καθώς και οι πρωτεΐνες που περιέχουν BH3 περιοχή

και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2 interacting protein 3 like proteins that also contains BH3 domain, BNIP3L) [127]. Σε πολλές μελέτες, στις οποίες είτε έχει γίνει siRNA σίγηση της Bcl-2 είτε έχουν χρησιμοποιηθεί προσομοιώσεις της BH3 περιοχής με δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xl, παρατηρήθηκε η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας [128-131]. Εκτός από την περίπτωση της αυτοφαγίας, οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και στη μιτοφαγία. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν την δυνατότητα να συνδέονται με τις πρωτεΐνες Parkin και την κινάση που επάγεται από την πρωτεΐνη PTEN (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) και να καταστέλλουν τη μιτοφαγία. Στην περίπτωση της μιτοφαγίας, η καταστολή της εξαρτάται από την μετακίνηση του Parkin στα αποπολωμένα (depolarized) μιτοχόνδρια και όχι από την πρωτεΐνη Beclin-1 [132,133].



Εικόνα 22: Η πρωτεΐνη Beclin-1 και οι ρυθμιστές της. Οι πρωτεΐνες Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 (κόκκινο χρώμα) συδέονται στην BH3 περιοχή της πρωτεΐνης Beclin-1 και οδηγούν σε καταστολή της αυτοφαγίας. Την δράση των παραπάνω πρωτεϊνών ανταγωνίζονται οι πρωτεΐνες UVRAG (UV radiation resistance-associated gene), VMP1 (vacuole membrane protein 1), AMBRA1 (activating molecule in Beclin-1-regulate autophagy protein 1) και HMGB1 (high mobility group box 1). Επίσης, γνωστή είναι και η ύπαρξη και άλλων πρωτεϊνών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl-2 και να προωθούν την αυτοφαγία, μη επιτρέποντας την σύνδεση τους στο Beclin-1. Τέλος, οι πρωτεΐνες BNIP3 (hypoxia-inducible Bcl-2 interacting protein 3), και BNIP3L (Bcl-2 interacting protein 3 like proteins that also contains BH3 domain) μπορούν να συδέονται με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και να αποτρέπουν την σύνδεση τους από την πρωτεΐνη Beclin-1 [102].

1.5.6 Απόπτωση και Αυτοφαγία

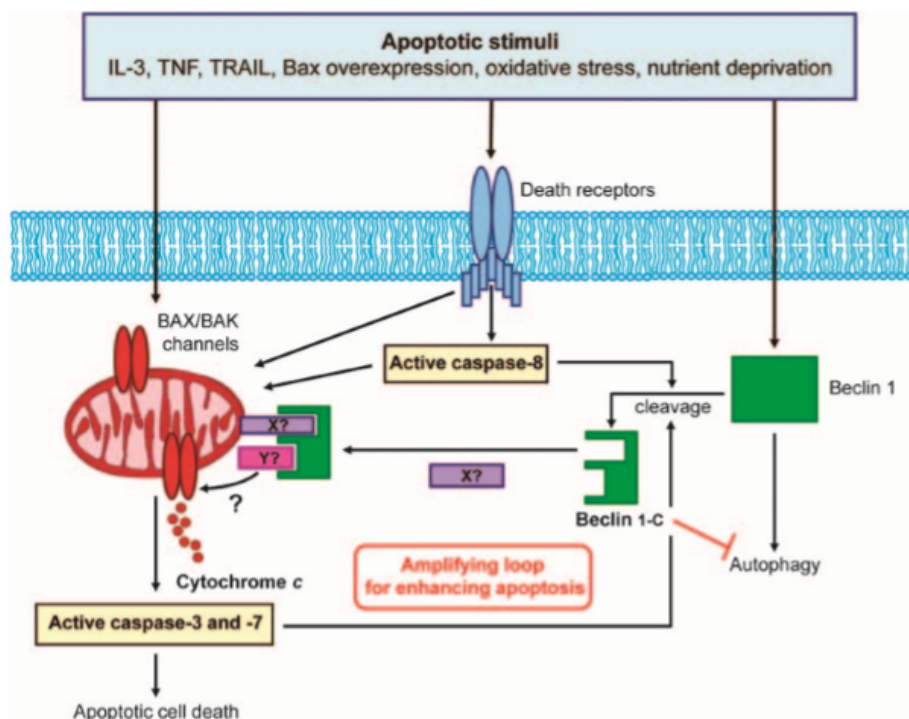
Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη Beclin-1 εκτός από τη συμμετοχή της στην έναρξη της αυτοφαγίας, διαθέτει και αντιαποπτωτική δράση, καθώς προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση [134]. Η πρωτεΐνη αυτή, καθώς και η κινάση 3 της φωσφατιδυλινοσιτόλης τάξεως III μπορούν να υφίστανται κατάτμηση από τις κασπάσες, ως απόκριση σε διάφορα σήματα που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση είτε του ενδογενούς είτε του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης (**Εικόνα 23**) [135,136]. Οι κασπάσες που συμμετέχουν στην κατάτμηση των παραπάνω πρωτεϊνών είναι οι 3, 7 και 8. Παραδείγματα διαφόρων σημάτων, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν την κατάτμηση της πρωτεΐνης Beclin-1, έχουν αναφερθεί σε πολλές μελέτες και μπορούν να είναι τα εξής: η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Bax, η ενεργοποίηση του υποδοχέα θανάτου (TRAIL), η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, καθώς και το οξειδωτικό στρές [136-139].

Η πλήρης λειτουργική πρωτεΐνη Beclin-1, χωρίς την ύπαρξη κάποιου θραύσματος, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και διαθέτει την ικανότητα ενεργοποίησης της αυτοφαγίας. Αντίθετα, σε περίπτωση που η πρωτεΐνη Beclin-1 έχει υποστεί κατάτμηση, παύει να είναι λειτουργική και χάνει την αυτοφαγική της δράση. Το N-τελικό θραύσμα της Beclin-1 (Beclin 1N, aa 1-133) έχει πυρηνική εντόπιση, ενώ το C-τελικό θραύσμα της Beclin-1 (Beclin 1C, aa 150-450) έχει μιτοχονδριακή εντόπιση [135,136]. Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι το C-τελικό θραύσμα της Beclin-1 μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, ως απόκριση της έναρξης της απόπτωσης, εξαιτίας της έλλειψης της ιντερλευκίνης-3. Η N τελική περιοχή της πρωτεΐνης Beclin-1 περιέχει την BH3 περιοχή και δεν επιτρέπει στην C-τελική περιοχή να προωθήσει την απόπτωση. Η απομάκρυνση της ρυθμιστικής περιοχής στο N-τελικό άκρο πιθανόν να είναι αυτή που επιτρέπει στο C-τελικό άκρο, να ασκήσει την προαποπτωτική δράση του. Επίσης, η κατάτμηση της Beclin-1 από τις κασπάσες, πιθανόν να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός καινούργιου N-τελικού άκρου, που επιτρέπει στο C-τελικό άκρο να ασκήσει τις προαποπτωτικές του δράσεις [136].

Επιπρόσθετα, και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία μπορούν να κατατμηθούν από τις κασπάσες πχ. οι πρωτεΐνες Atg5 και Atg4D. Η κατάτμηση της Atg5 επιτρέπει στην πρωτεΐνη που παράγεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και να ενισχύει την απόπτωση, επιτρέποντας την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C. Επιπλέον, η μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση ενισχύεται και από την πρωτεΐνη Atg4D, με τη μόνη διαφορά ότι ενώ στις πρωτεΐνες Beclin-1 και Atg5, μετά την κατάτμηση τους, χάνεται η αυτοφαγική τους λειτουργία, στην πρωτεΐνη Atg4D ενισχύεται [140,141].

Τέλος, η πρωτεΐνη Flip (Fllice inhibitory protein), η οποία αποτελεί αναστολέα της επαγόμενης απόπτωσης από υποδοχείς θανάτου, αποτελεί και αναστολέα της αυτοφαγίας. Η ικανότητά της αυτή έγκειται στο γεγονός ότι ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη LC3 για τη σύνδεση της με την πρωτεΐνη Atg3, αποτρέποντας τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μια ακόμη απόδειξη

της ύπαρξης σύνδεσης μεταξύ των διαδικασιών της απόπτωσης και της αυτοφαγίας [142].



Εικόνα 23: Μοντέλο ρύθμισης της απόπτωσης, από την πρωτεΐνη Beclin-1 και τα θραύσματά της. Σήματα που οδηγούν στην επαγωγή είτε του ενδογενούς είτε του εξωγενούς μονοπατιού της απόπτωσης, ενεργοποιούν και το μονοπάτι της αυτοφαγίας. Η κατάτμηση της Beclin-1 από τις κασπάσες έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία δύο θραυσμάτων, του N-τελικού και του C-τελικού. Το C-τελικό θραύσμα της Beclin-1 μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια από το κυτταρόπλασμα και ενισχύει την απόπτωση μέσω ενός μηχανισμού επανατροφοδότησης, όπως φαίνεται και στην εικόνα. Όπου: X, Y: παράγοντες που διευκολύνουν την μετακίνηση και την εύκολη διαπερατότητα του C-τελικού θραύσματος της Beclin-1 στα μιτοχόνδρια [139].

1.5.7 Συσχέτιση Αυτοφαγίας και Καρκίνου

Η αυτοφαγία μπορεί να έχει διπλό ρόλο στον καρκίνο, καταστέλλοντας την δράση του ή ενισχύοντάς την [143].

1.5.7.1.1 Αυτοφαγία και Καταστολή του Καρκίνου

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου του Beclin-1 στην αυτοφαγία ήταν οι πρώτες που κατέδειξαν την αυτοφαγία, ως ένα μηχανισμό καταστολής της καρκινογένεσης [144,145]. Σήμερα, είναι γνωστό ότι το 40-75% των καρκίνων του στήθους, των ωθηκών και του προστάτη στον άνθρωπο παρουσιάζει έλλειψη του ενός εκ των δύο αλληλομόρφων του γονιδίου Beclin-1, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21 [146]. Επίσης, πειραματόζωα, τα οποία δεν διέθεταν το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου Beclin-1 ήταν επιρρεπή στην ανάπτυξη καρκίνου και ιδιαίτερα λεμφώματος και ηπατοκαρκινώματος [145]. Επιπλέον, μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης του γονιδίου Beclin-1 έχει παρατηρηθεί σε πολλούς καρκίνους του εγκεφάλου [147].

Επιπρόσθετα, φωσφορυλιώσεις που υφίσταται η πρωτεΐνη Beclin-1 σε διάφορες θέσεις καταλοίπων τυροσίνης, με τρόπο εξαρτώμενο από τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal growth factor, EGFR), καθώς και χρήση μοντέλων στα οποία η πρωτεΐνη Beclin-1 έχει μεταλλαχθεί στις θέσεις καταλοίπων τυροσίνης έδειξαν μείωση της δραστηριότητας του συμπλόκου Beclin-1/PI3KC3, μείωση της αυτοφαγίας και αύξηση της ανάπτυξης διαφόρων ειδών καρκίνου [148]. Όσον αφορά το σύμπλοκο Beclin-1/PI3KC3 είναι επίσης γνωστό ότι ρυθμίζει και την ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Το παράδοξο με την ρύθμιση αυτής της πρωτεΐνης έγκειται στο γεγονός ότι, ενώ η πρωτεΐνη Beclin-1 θεωρείται ένας ογκοκατασταλτικός παράγοντας, έλλειψη ενός αλληλομόρφου του γονιδίου Beclin-1 οδηγεί σε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 και μείωση της καρκινογένεσης [144,149].

Εκτός από την πρωτεΐνη Beclin-1 και οι πρωτεΐνες Atg3, Atg5, Atg7, Atg9, Atg16L1, Atg4C και RAB7A, οι οποίες εμπλέκονται στην αυτοφαγία, έχουν ογκοκατασταλτικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η έλλειψή τους οδηγεί σε καρκίνο, ο οποίος βέβαια είχε καλοήγη φαινότυπο και δεν εξελισσόταν σε κακοήγη [150-156]. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι το γονίδιο Beclin-1 εδράζεται δίπλα στο γονίδιο BRCA1, στο ίδιο χρωμόσωμα. Ελλείψεις του γονιδίου BRCA1, αλλά όχι του Beclin-1 οδηγούν σε καρκίνο του στήθους και των ωθηκών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού, αποτελούν το έναυσμα για τα συγκεκριμένα ήδη καρκίνου. Λαμβάνοντας υπόψιν το παραπάνω, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι έλλειψη του Beclin-1, δεν έχει βρεθεί σε άλλα είδη καρκίνου καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αυτοφαγία ως μηχανισμός καταστολής της καρκινογένεσης παίζει καθοριστικό ρόλο στα πρωταρχικά στάδια της καρκινογένεσης [157].

1.5.7.1.2 Αυτοφαγία και Προώθηση του Καρκίνου

Σε ένα υποξικό περιβάλλον, στο οποίο υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων, η επαγωγή της αυτοφαγίας προωθεί την ανάπτυξη του καρκίνου εξαιτίας του μεταβολικού στρες [158]. Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού με τον οποίο πολλαπλασιάζονται, έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούν την αυτοφαγία ως έναν μηχανισμό, ο οποίος θα τους εξασφαλίσει την απαραίτητη ενέργεια (ATP), αλλά και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά και τους ενδιάμεσους μεταβολίτες που χρειάζονται για να μπορέσουν να αναπτυχθούν [145].

1.5.8 Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων: Warburg effect και αυτοφαγία

Η αυτοφαγία, όπως ήδη έχει αναφερθεί, βοηθά τα καρκινικά κύτταρα να ανταπεξέλθουν στο στρες και να προσαρμοστούν στις μεταβολικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του καρκίνου, με σκοπό την παραγωγή της απαραίτητης ενέργειας και την βιοσύνθεση των μακρομορίων που απαιτούνται για γρήγορο πολλαπλασιασμό [159].

Σύμφωνα με το Warburg effect, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν τη γλυκόλυση για την παραγωγή της ενέργειας που χρειάζονται, ενώ φαίνεται να μειώνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό (**Εικόνα 24A**). Ωστόσο, η παρουσία όλων των μιτοχονδρίων ως μη λειτουργικών, όπως προτείνεται από Warburg effect, έχει αποδειχθεί ότι δεν ισχύει πάντα. Αντίθετα, πιστεύεται ότι επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων αποτελεί το κομβικό σημείο της καρκινογένεσης [160].

Όσον αφορά, το μεταβολισμό της γλυκόζης, πολλά είδη καρκίνων τείνουν να χρησιμοποιούν την αερόβια γλυκόλυση ως μέσο για την παραγωγή ενδιάμεσων μεταβολιτών, απαραίτητων για τις αναβολικές διεργασίες τους [161][Hsu and Sabatini, 2008]. Στη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο παίζουν η επαγόμενη από πρωτεΐνες θερμικού σοκ αυτοφαγία (CMA) και η μακροαυτοφαγία [159]. Πιο συγκεκριμένα η CMA ρυθμίζει τα επίπεδα της ισομορφής 2 της κινάσης του πυροσταφυλικού (PKM2), τα οποία τείνουν να αυξάνονται σε πολλά είδη καρκίνου. Ο πιο αργός ρυθμός με τον οποίο η PKM2 μετατρέπεται το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ σε πυροσταφυλικό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταβολικών ενδιάμεσων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η CMA έχει τη δυνατότητα αποικοδόμησης της PKM2, γεγονός που οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση των μεταβολικών ενδιάμεσων, όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη και η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, τα οποία χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό και την αναπτυξή τους [162].

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων είναι καθοριστικός για την διεξαγωγή του αναερόβιου μεταβολισμού από τα καρκινικά κύτταρα (**Εικόνα 24B**). Μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων μέσω του μηχανισμού της μιτοφαγίας, οδηγεί σε

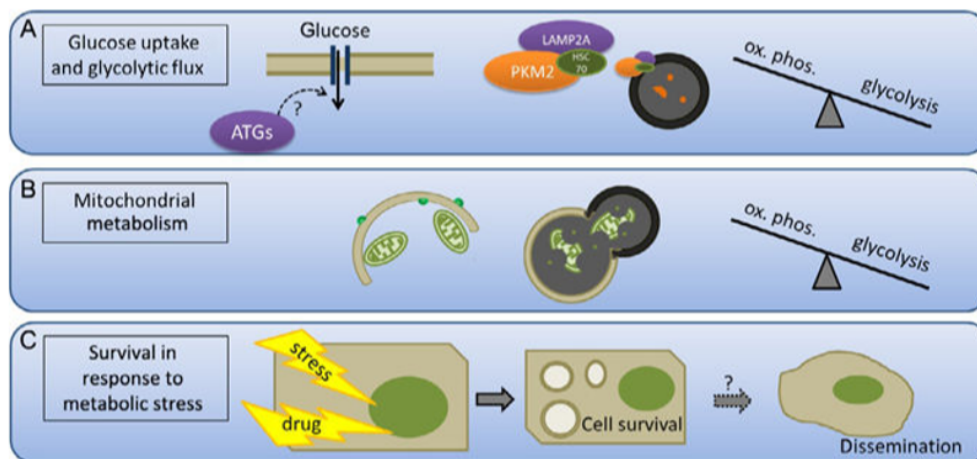
μείωση της μιτοχοδριακής βιογένεσης και συνεπώς μείωση του οξειδωτικού μεταβολισμού και αύξηση της γλυκόλυσης πχ. μελάνωμα εξαρτώμενο από το γονίδιο BRAF. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό του οξειδωτικού στρές, κατά την διάρκεια του οποίου αυξάνεται η πρωτεΐνη-ρυθμιστής της καλσινευρίνης-1 (RCAN1-1L), οδηγώντας σε αύξηση των πόρων της μιτοχονδριακής μεμβράνης και μείωση του ATP. Συνεπώς, αναστέλλεται η σηματοδότηση mTOR, ενεργοποιείται το AMPK μονοπάτι και επάγεται μιτοφαγία και αύξηση της γλυκολυτικής πορείας [159].

Από την άλλη πλευρά, στην βιβλιογραφία αναφέρονται και περιπτώσεις, στις οποίες τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν σε μεγαλύτερο βαθμό την οξειδωτική φωσφορυλίωση και όχι την γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό της μετάλλαξης V600E στην περιοχή της κινάσης του γονιδίου BRAF. Η μετάλλαξη BRAF^{V600} οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας της κινάσης I του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος και ταυτόχρονη αύξηση της δραστηριότητας της φωσφατάσης II του ίδιου συμπλόκου, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη δραστηριότητα του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος και οδηγώντας σε οξείδωση του πυροσταφυλικού μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος [163].

Εκτός από την γλυκόζη, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης, να εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζονται χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη και τα αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες υποξίας και έλλειψης γλυκόζης, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν το αμινοξύ γλουταμίνη, το οποίο υπάρχει σε αφθονία στα θηλαστικά, ως μεταβολικό ενδιάμεσο, προμηθεύοντας τον κύκλο του κιτρικού οξέος, με απώτερο σκοπό την παραγωγή ενέργειας [164-167]. Η γλουταμίνη μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται γλουταμινόλυση. Αρχικά, η γλουταμινάση μετατρέπει τη γλουταμίνη σε γλουταμικό, με ταυτόχρονη παραγωγή αμμωνίας, το οποίο με την σειρά του μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό από την αφυδρογονάση του γλουταμικού. Η παραγωγή του παραπροϊόντος της αμμωνίας είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς επάγει την αυτοφαγία. Επιπλέον, η γλουταμίνη μπορεί να μετατραπεί σε πυροσταφυλικό και στη συνέχεια σε γαλακτικό, μέσω του μηλικού ενζύμου. Τέλος, ένα ακόμη μονοπάτι μέσω του οποίου η γλουταμίνη μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό, περιλαμβάνει την μετατροπή της γλουταμίνης σε γλουταμικό, έπειτα σε α-κετογλουταρικό και τελικά σε κιτρικό. Το κιτρικό με την σειρά του μπορεί να μετατραπεί σε α-κετυλο-CoA μέσω της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης-1 (Isocitrate-dehydrogenase-1, IDH1). Ουσιαστικά ενισχύει τη βιοσύνθεση πουρινών και πυριμιδινών, καθώς και των αμινοξέων, προμηθεύοντας με άζωτο τα βιοσυνθετικά μονοπάτια [167-169]. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διοχέυτηση του κύκλου του κιτρικού οξέος με αμινοξέα, συνεπώς έλλειψη της μειώνει σημαντικά και τα αμινοξέα [159]. Όσον αφορά το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, κι αυτός αλλάζει κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης (**Εικόνα 25**). Τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την σύνθεση των λιπαρών οξέων μέσω του ένζυμου ATP-κιτρικής λυάσης, όπως αποδείχθηκε από in vitro μελέτες. Στον καρκίνο του προστάτη, για παράδειγμα, αυξάνεται η σύνθεση της χοληστερόλης και στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα

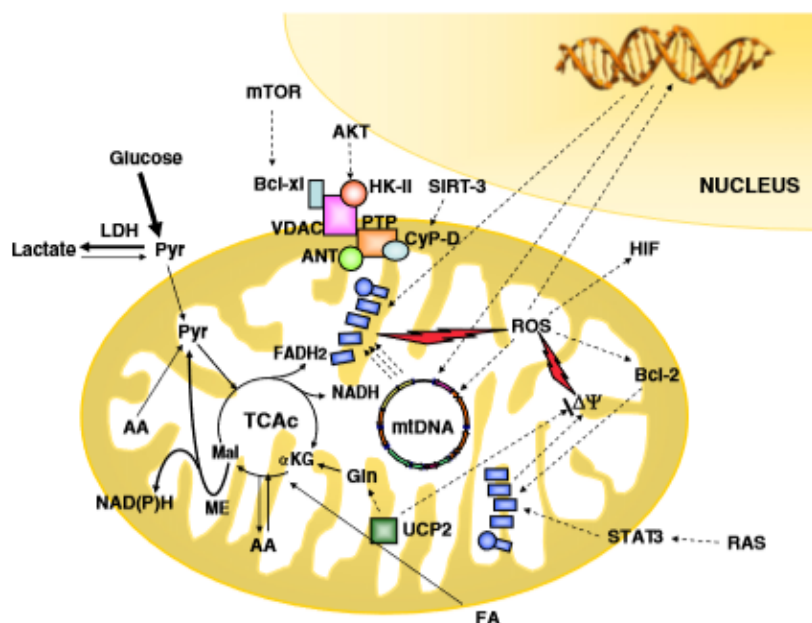
οξειδώνονται, αποτελώντας μια σημαντική πηγή ενέργειας για τα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτή την διαδικασία συμμετέχει και η αυτοφαγία-λιποφαγία μέσω της οποίας γίνεται αποικοδόμηση των λιπιδίων, παράγοντας με αυτό τον τρόπο ενέργεια πχ. υδρόλυση τριγλυκεριδίων στα ηπατοκύτταρα. Τέλος, η αυτοφαγία ενισχύει την όλη διαδικασία μειώνοντας τον αριθμό των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, γεγονός που συμβάλλει κι αυτό στην οξείδωση των λιπαρών οξέων [159].

Τέλος, μελέτες που διερευνούσαν τον ρόλο των μιτοχονδριακών ενζύμων στην καρκινογένεση έδειξαν μείωση των επιπέδων κάποιων από αυτών σε διάφορα είδη καρκίνων. Για παράδειγμα, μεγάλη μείωση των επιπέδων της αφυδρογονάσης NADH και του πρωτεϊνικού συμπλέγματος I (COXI), παρατηρήθηκε σε όγκους στα νεφρά και σε επιδερμικό καρκίνωμα πνεύμονα. Επίσης, μείωση του COXI παρατηρήθηκε και σε καρκίνο του θυροειδούς αδένου, που οφειλόταν σε μια μετάλλαξη στο μιτοχονδριακό γονίδιο ND1, καθώς και σε K-Ras μεταλλαγμένα κύτταρα, στα οποία όμως δεν παρατηρήθηκε μείωση κάποιου άλλου ενζύμου της αναπνευστικής αλυσίδας. Επιπρόσθετα, μείωση των γονιδίων των οξφωσ πχ. μείωση της ATP συνθάσης, έχει παρατηρηθεί σε πολλούς κληρονομικούς καρκίνους που συνδέονται με δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων [170]. Εκτός από τα γονίδια των οξφωσ και μείωση διαφόρων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων παρατηρείται σε διάφορα είδη καρκίνων πχ. τα μεταλλαγμένα κύτταρα BRAF^{V600} καταστέλλει την έκφραση του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα PPAR-γ coactivator 1-a (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1a) [171].



Εικόνα 24: Προώθηση του καρκίνου μέσω της αυτοφαγίας. Α) Η αυτοφαγία ενισχύει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα, καθώς και την γλυκολυτική πορεία, αυξάνοντας τα γλυκολυτικά ενδιάμεσα, τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας από τα καρκινικά κύτταρα Β) Η αυτοφαγία αποικοδομεί τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, ενισχύοντας την οξείδωση των λιπαρών οξέων και μειώνοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Γ) Η αυτοφαγία προωθεί την κυτταρική επιβίωση έναντι στρεσογόνων παραγόντων πχ. έλλειψη αυξητικών παραγόντων, στρές του ενδοπλασματικού δικτύου, μέσω αποικοδόμησης των κυτταροπλασματικών παραγόντων πχ. κατεστραμμένων

πρωτεϊνών, ώστε να διατηρήσει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, γεγονός, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μετάσταση [159].



Εικόνα 25: Μιτοχονδριακές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης. Σε πολλά είδη καρκίνων παρατηρείται μείωση της οξείδωσης του πυροσταφυλικού μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος. Η αναπλήρωση του κύκλου επιτυγχάνεται από το αμινοξύ γλουταμίνη (Gln), το οποίο εισέρχεται στην μιτοχονδριακή μήτρα, εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης UCP2 (Uncoupling protein 2). Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την πρόσληψη των ελεύθερων λιπαρών οξέων, οδηγώντας σε οξείδωσή τους, που έχει ως στόχο την παραγωγή ενέργειας. Τέλος, διάφορα σήματα πχ. ROS αυξάνουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης, γεγονός που έχει ως συνέπεια την ανθεκτικότητα έναντι της απόπτωσης. Για παράδειγμα, η παραγωγή ROS αυξάνει τα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, οδηγώντας στην δημιουργία διαφόρων μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα [170].

1.5.9 GR και Αυτοφαγία

Κάθε ιστός έχει διαφορετικές ενεργειακές απαιτήσεις, οι οποίες ελέγχονται από την σηματοδότηση των διαφόρων ορμονών. Ο κομβικός ρόλος των ορμονών φαίνεται και από την ικανότητα τους να αναστέλλουν ή να ενεργοποιούν διάφορες μεταβολικές διεργασίες, καθώς και να επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που παίρνουν μέρος στα μεταβολικά μονοπάτια. Ένα από αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια, του οποίου η ρύθμιση από τις ορμόνες είναι καθοριστικής σημασίας είναι η αυτοφαγία [172].

Σήμερα, είναι γνωστό ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την ικανότητα ρύθμισης της αυτοφαγίας [172]. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή

(δεξαμεθαζόνη) επάγουν την έναρξη της αυτοφαγίας σε L6 μυοκύτταρα (L6 myotubes), μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης AMPK και του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τα επίπεδα διαφόρων γονιδίων που λαμβάνουν μέρος στην αυτοφαγία, μερικά από τα οποία είναι τα Beclin-1, ATG5, LC3, SQSMT1/P62. Όλα αυτά τα γεγονότα οδηγούν στην εξαρτώμενη από την AMPK κατάτμηση των μιτοχονδρίων (μιτοφαγία), η οποία σχετίζεται και με αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης DNM1L (dynamin 1-like/dynamin-related protein 1). Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας από την επαγόμενη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων ελέγχοντας και μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την μυική ατροφία [173].

Επίσης, σε μελέτες αναφέρεται ότι θεραπεία η οποία βασίζεται σε χορήγηση χαμηλών δόσεων γλυκοκορτικοειδών επάγει την αυτοφαγία στα λευχαιμικά κύτταρα, καθώς και στα οστεοκύτταρα και στους οστεοκλάστες. Ωστόσο, ο πλήρης μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η επάγωση αυτή δεν είναι χαρακτηρισμένος [172]. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό από βιβλιογραφικές αναφορές ότι παρατεταμένη χορήγηση υψηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης οδηγεί σε απόπτωση των οστεοκυττάρων, ενώ χαμηλές δόσεις δεξαμεθαζόνης διεγείρουν τον σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων και κατά συνέπεια της αυτοφαγίας. Σε αυτή την περίπτωση η αυτοφαγία λειτουργεί ως ένας μηχανισμός, ο οποίος προστατεύει τα οστεοκύτταρα από τις αρνητικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψιν τον διττό ρόλο της αυτοφαγίας, ως ένας μηχανισμός, ο οποίος μπορεί να οδηγεί είτε στον κυτταρικό θάνατο είτε στην κυτταρική επιβίωση, μικρή έκθεση στα γλυκοκορτικοειδή πιθανόν να λειτουργεί θετικά για τα οστεοκύτταρα καθώς επιτυγχάνεται η αντικατάσταση των κατεστραμμένων οργανιδίων και τα κύτταρα επιβιώνουν. Αντίθετα, παρατεταμένη έκθεση στα γλυκοκορτικοειδή, οδηγεί σε θάνατο των οστεοκυττάρων και συνεπώς δρά αρνητικά στην ποιότητα και την μάζα των οστών [174].

1.6 Τα γλυκοκορτικοειδή ως φάρμακα

1.6.1 Θεραπευτική Χρήση Γλυκοκορτικοειδών

Εκτός από την επίδραση που έχουν τα γλυκοκορτικοειδή στο μεταβολισμό, έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν και το ανοσοποιητικό σύστημα και για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιούνται ως θεραπεία για την μείωση της φλεγμονής και την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιούνται σε ποικίλες κλινικές εφαρμογές [4]. Πιο συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή συνταγογραφούνται χάρης των αντιφλεγμονωδών, ανοσοκατασταλτικών και αντιαλλεργικών ιδιοτήτων τους [175], καθώς και για την ικανότητα τους να ανακουφίζουν από τον εμμετό που προκαλείται από την χημειοθεραπεία [176]. Η πρώτη χρήση των γλυκοκορτικοειδών χρονολογείται στα τέλη της δεκαετίας του 1940, όταν ο Philip Hench χρησιμοποίησε την κορτιζόλη για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [8], κερδίζοντας το βραβείο Nobel [177]. Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται τόσο για συστημική θεραπεία όσο και για τοπική. Στη δερματολογία έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία του ατοπικού

εκζέματος. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί στο άσθμα για τη μείωση της υπερευαισθησίας των βρόγχων. Τέλος, υπάρχουν αναφορές, ότι τα γλυκοκορτικοειδή συμμετέχουν στην κυκλοφορία και τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων (γ' αυτό και χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικό μέσο στους αιματολογικούς καρκίνους), καθώς γνωστή είναι και η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη του πνεύμονα των πρόωρων νεογνών [4].

Παρά τις θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην φλεγμονή και την αλλεργία, προκαλούν διάφορες παρενέργειες, σε πολλά όργανα και ιστούς, οι οποίες βέβαια εξαρτώνται και από τον χρόνο χρήση τους, καθώς και από την δόση στην οποία χορηγούνται. Παραδείγματα, τέτοιου είδους αρνητικών δράσεων είναι η αύξηση της εναπόθεσης του λίπους [178,179], η δυσλιπιδαιμία [180,181], η ηπατική στεάτωση [178], η υπερφαγία [182], η μυϊκή ατροφία [183], και ο διαβήτης [184].

1.6.2 Επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs)

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες θεραπείες, εξαιτίας των αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους. Παρόλα αυτά, η χρήση τους περιορίζεται, εξαιτίας διαφόρων αρνητικών παρενεργειών που επιφέρουν. Παλαιότερα, θεωρούσαν ότι οι θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών ήταν αποτέλεσμα του μηχανισμού καταστολής της μεταγραφής από τον GR, ενώ οι αρνητικές παρενέργειες σχετίζονταν με τον μηχανισμό ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ωστόσο, πλέον, είναι γνωστό ότι μερικές ανοσοκατασταλτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις οφείλονται επίσης είτε σε ενεργοποίηση της έκφρασης προφλεγμονωδών παραγόντων (πχ. απώλεια μυϊκής μάζας και υπεργλυκαιμία) ή σε καταστολή της έκφρασης αντιφλεγμονωδών (πχ. καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσις-επινεφριδίων), καθώς και στο συνδυασμό αυτών των δύο (πχ. οστεοπόρωση) [184,185].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι χρήσιμη θα ήταν η εύρεση ενώσεων, προσδετών του GR, οι οποίες θα ενεργοποιούν επιλεκτικά, συγκεκριμένους μηχανισμούς του υποδοχέα, αλλάζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Τέτοιου είδους ενώσεις, είναι γνωστές στη βιβλιογραφία ως επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs) ή ρυθμιστές (SEGRMs) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ο όρος SEGRAs χρησιμοποιήθηκε για ενώσεις, οι οποίες είχαν στεροειδή δομή, ενώ ο όρος SEGRMs αναφέρεται σε μη στεροειδείς ενώσεις [186].

Η πρώτη ουσία που χαρακτηρίστηκε ως SEGRMs ήταν η χημική ένωση A (CpdA) [187]. Η ένωση αυτή επάγει αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, στρατολογώντας και άλλους συμπαράγοντες και συνεπώς δημιουργώντας ένα << νέο προφίλ >> θέσεων δέσμευσης για την ουσία. Παρόλο το γεγονός ότι η ουσία αυτή έχει προσφέρει νέες γνώσεις στους ερευνητές σχετικά με τα SEGRMs, δεν μπορεί να γίνει χρήση της σε θεραπευτικό επίπεδο, καθώς συνοδεύεται με ανάπτυξη αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή και διαθέτει περιορισμένο εύρος χρήσης [186].

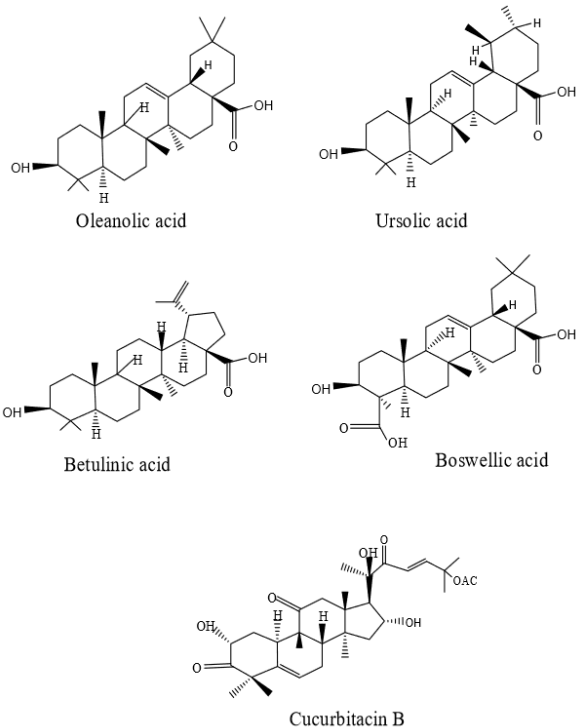
Συμπερασματικά, η δημιουργία ή εύρεση ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως SEGRAMs και να αξιοποιηθούν σε φαρμακευτικό επίπεδο κρίνεται απαραίτητη. Ωστόσο, για να καταστή εφικτό αυτό, πρέπει να λάβουμε

υπόψιν μας, τους διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης του GR, στους οποίους συμμετέχουν διαφορετικοί προσδέτες, συμπαράγοντες, υποκινητές καθώς και τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται ο υποδοχέας [186]. Έτσι, αναλύοντας όλη <<την βιολογία>> του υποδοχέα θα είναι δυνατή η εύρεση ισχυρών και εκλεκτικών αγωνιστών του.

1.6.3 Τριτερπένια και SEGRAs

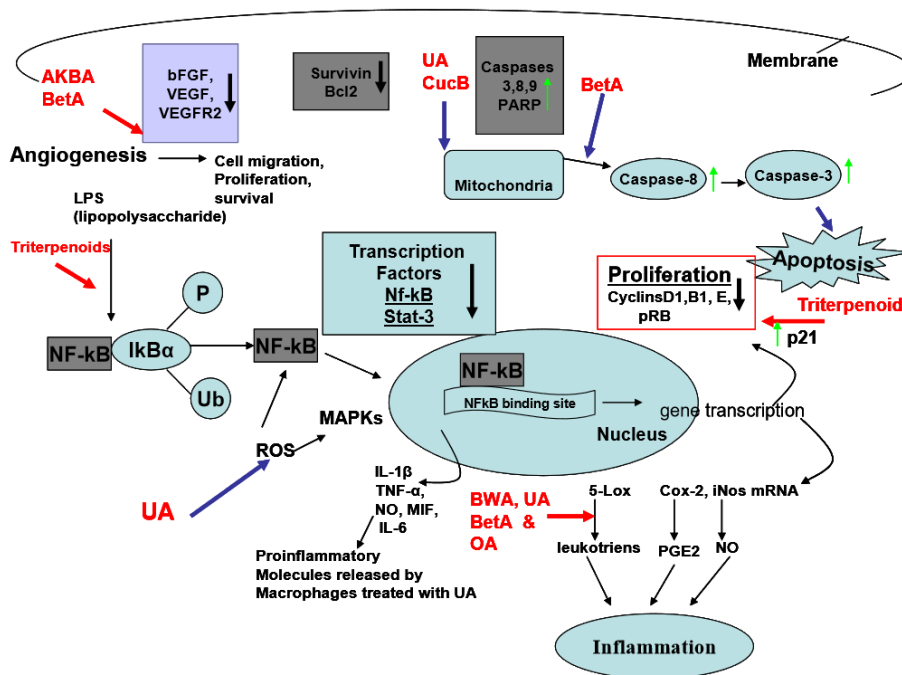
Τα τερπένια είναι ενώσεις με ποικίλες βιολογικές δράσεις, οι οποίες βρίσκονται τόσο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (φυτά, ζώα) όσο και στους προκαρυωτικούς (μύκητες). Ωστόσο, η περιεκτικότητα των φυτών σε τερπένια είναι πολύ μεγαλύτερη, σε σχέση με όλους τους άλλους οργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8) και ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που περιέχουν σε μονοτερπένια (C10), σεσκιτερπένια (C15), διτερπένια (C20), ημιτερπένια (C25), τριτερπένια (C30) και τετρατερπένια (C40). Οι μονάδες ισοπρενίου μπορεί να είναι γραμμικές ή κυκλικές (μονο-, δι-, τρι-, τετρα-, πεντακυκλικές). Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες ομάδες τερπενίων, είναι τα τριτερπένια, των οποίων η δομή μπορεί να είναι είτε πεντακυκλική (ταραξάνες, ολεανάνες, ουρσάνες, λουπάνες) είτε τετρακυκλική (δαμαράνες, κουρκουμπιτάνες, ευθάνες) (**Εικόνα 26**) [188].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός πεντακυκλικού τριτερπενίου είναι αυτό του μπόσγουελλικού οξέος, που προέρχεται από την ουρσάνη, η οποία βρίσκεται στα φυτά που ανήκουν στο είδος *Boswellia* [189]. Τα οξέα αυτής της κατηγορίας διαθέτουν δύο μεθυλομάδες, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να δημιουργούν δεσμό με τον άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 20 του σκελετού τους και έτσι να σχηματίζουν την <<α>> διαμόρφωσή τους. Επιπλέον, οι δύο μεθυλομάδες του μπόσγουελλικού οξέος μπορούν να ενώνονται, η μια στον άνθρακα 19 και η άλλη στον άνθρακα 20, σχηματίζοντας την <<β>> διαμόρφωση τους [190].



Εικόνα 26: Η δομή διαφόρων τριτερπενοειδών [189].

Σήμερα, είναι γνωστό ότι τα τριτερπένια διαθέτουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντικές, αντιβακτηριακές, καθώς και αντιμυκητιακές ιδιότητες. Η αντιφλεγμονώδης δράση των τριτερπενοειδών έγκειται στην ικανότητα τους να μειώνουν την έκφραση των μορίων που παίρνουν μέρος στην φλεγμονή, όπως η 5-λιποξυγενάση (5-LOX), η συνθάση του νιτρικού οξέος (iNOS), η κυκλοξυγενάση-2 (COX-2), καθώς και ο πυρηνικός παράγοντας -κΒ (NF-κΒ) (**Εικόνα 27**). Επίσης, σε πειράματα τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα, σχετικά με την αντικαρκινική δράση των τριτερπενίων φαίνεται να αναστέλλουν την ανάπτυξη των όγκων, ρυθμίζοντας τα μονοπάτια της απόπτωσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όσον αφορά το μονοπάτι της απόπτωσης, τα τριτερπένια, αλλάζουν το δυναμικό της μεμβράνης των μιτοχονδρίων και μειώνουν την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, ενεργοποιώντας διάφορες κασπάσες. Τέλος, τα τριτερπένια αναστέλλουν την αγγειογένεση, αναστέλλοντας το σχηματισμό των αιμοφόρων αγγείων, καθώς και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων [189].



Εικόνα 27: Η επίδραση των τριτερπενοειδών σε διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος, μέσω αλληλεπίδρασης τους με διάφορα μόρια <<στόχους>>. Οι μπλε γραμμές δηλώνουν επαγωγή, οι κόκκινες αναστολή, οι πράσινες υποδεικνύουν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, ενώ οι μαύρες μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων. Τα πεντακυκλικά τριτερπενοειδή ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας τους πολυσακχαρίτες και διεγείροντας την έκφραση των COX-2 και iNOS στα μακροφάγα, περιορίζοντας τη μετατόπιση του παράγοντα NF-κΒ στον πυρήνα. Επίσης, τα τριτερπενοειδή ασκούν αντιπολλαπλασιαστική δράση, μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου, αυξάνοντας την έκφραση της πρωτεΐνης p21^{cip1/waf1} και μειώνοντας την έκφραση των κυκλινών D1, B1, E και pRb. Όσον αφορά την απόπτωση, τα τριτερπενοειδή αλλάζουν το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, μειώνουν την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2 και ενεργοποιούν τις ανενεργές κασπάσες, μέσω κατάτμησης τους. Τέλος, η επίδραση των τριτερπενοειδών στην αγγειογένεση επιτυγχάνεται μέσω αρνητικής ρύθμισης των παραγόντων bFGF και VEGF [189].

Σε πολλές μελέτες που αναφέρονται στην διεθνή βιβλιογραφία έχει διερευνηθεί ο ρόλος των τριτερπενίων ως ισχυρών και επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), καθώς διαθέτουν δομική ομοιότητα με αυτά. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι διαθέτουν την ικανότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα, καθώς και της ενεργοποίησης της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας διαφόρων γονιδίων από τον GR, ενώ δεν επιδρούν ή επιδρούν ελάχιστα στην trans ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον GR [191]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων τριτερπενίων που έχουν μελετηθεί, χάρις της ικανότητας τους να συνδέονται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, να τον ενεργοποιούν και να ρυθμίζουν τις δράσεις τους είναι τα εξής: το εχνοκουστικό οξύ και το 3-O-γλυκοσυλιωμένο παράγωγο του [192], τα τετρακυκλικά τριτερπένια

πρωτοπαναξαδιόλη και πρωτοπαναξατριόλη [191], Avicin D [193], καθώς και τα μπουγουελικά οξέα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

1.7 Σκοπός

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην ομάδα των στεροειδών ορμονών και δρούν μέσω σύνδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Οι ορμόνες αυτές ρυθμίζουν ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως τον κυτταρικό μεταβολισμό, τις ανοσολογικές αποκρίσεις, την απόπτωση, καθώς και την κυτταρική ανάπτυξη. Εκτός από τη βιολογική τους σημασία, τα γλυκοκορτικοειδή κατέχουν εξέχουσα θέση στην ιατρική εξαιτίας των αντιφλεγμονωδών, αντιαλλεργικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων που διαθέτουν, οι οποίες τα καθιστούν ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα για την αντιμετώπιση νόσων του ανοσοποιητικού συστήματος και διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, η χρόνια χρήση τους επιφέρει δυσμενείς παρενέργειες για τον οργανισμό όπως η ανακατανομή του λίπους, η απώλεια μυϊκής μάζας, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση και η καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (άξονας HPA). Γι'αυτόν τον λόγο, κρίνεται αναγκαία η εύρεση αγωνιστών του GR με ικανότητα πρόσδεσης σε αυτόν (SEGRAs), και επιλεκτικής ενεργοποίησης των επιθυμητών φαρμακευτικών αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών δράσεων του, με περιορισμένες ή καθόλου παρενέργειες. Τα τριτερπένια είναι ενώσεις φυτικής προέλευσης, οι οποίες είναι δομικά όμοιες με τα γλυκοκορτικοειδή και είναι ευρέως γνωστό, από την βιβλιογραφία, ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως σκοπό τη σάρωση διαφόρων φυτικών και ημισυνθετικών τριτερπενίων ως προς την ικανότητα τους να ενεργοποιούν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, προκαλώντας την πυρηνική του μετατόπιση. Στη συνέχεια, τα ενεργά μόρια ελέγχθηκαν περαιτέρω, ως προς την ικανότητα ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα αλλά και της μεταγραφικής δραστηριότητας γονιδίων στόχων του GR, με έμφαση στη διερεύνηση της πιθανής αντιφλεγμονώδους και αντικαρκινικής δράσης των ενώσεων αυτών, μέσω της εμπλοκής τους στη GR σηματοδότηση.

Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί να δρά είτε ως μεταγραφικός παράγοντας, είτε ως μεμβρανικός υποδοχέας, καθώς και ότι υπάρχουν πολλές ισομορφές του υποδοχέα, εκ των οποίων η α ισομορφή μπορεί να εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο, κρίθηκε ενδιαφέρων ο χαρακτηρισμός των μορίων με τα οποία ο GR αλληλεπιδρά στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η ταυτοποίηση των μορίων αυτών συντελεί στη κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, καθώς και των μηχανισμών εισόδου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Τέλος, δεδομένου του σημαντικού ρόλου του μιτοχονδρίου στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού και της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του mtGR στην ανάπτυξη του καρκίνου σε in vivo πειράματα καρκινογένεσης.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Πίνακας 1: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή.

| Διαλύματα | Παρασκευή-Σύσταση |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων | Το διάλυμα αυτό αποτελείται από τα εξής: <ul style="list-style-type: none">• Tris 0.02 M, pH 7.5• EDTA, 0.003 M• NaCl, 0.25 M• Triton X-100, 0.5 % Αποθήκευση σε θερμοκρασία 4 °C. Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται: <ul style="list-style-type: none">• PMSF, 0.02 M• Proteases Inhibitors Roche 1/100• DTT, 1 M, το οποίο διαθέτει αναγωγικές ιδιότητες. |
| Διάλυμα που χρησιμοποιείται στη μέθοδο Bradford | <ul style="list-style-type: none">• Stock διάλυμα 5x• Αραίωση stock διαλύματος σε ddH₂O, ώστε C_{τελικό}: 1x• Δείγμα πρωτεϊνών/ όγκος διαλύματος Bradford: 1:1000. |
| Sample Buffer 4x | Αποτελείται από τα εξής: <ul style="list-style-type: none">• Tris pH 6.8, 1 M• SDS, 10 %• β-μερκαπταιθανόλη, 5% (ρόλος: αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών και κατάργηση της τριτοταγής δομής των πρωτεϊνών)• Γλυκερόλη, 10 %• 1 % μπλε της βρωμοφαινόλης Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20 °C. |
| Tris 0.02 M, pH 7.5 | Σε 980 μL ddH ₂ O προστίθενται 20 μL διαλύματος Tris pH 7.5, 1 M (4 °C). Αποθήκευση διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8 | 36,342 gr Tris-HCl διαλύονται σε dH ₂ O, για την παρασκευή διαλύματος τελικού όγκου 0.2 L. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται HCl 12 N, ώστε το pH να ρυθμιστεί στο 8.8 και ακολουθεί συμπλήρωση dH ₂ O, έως τα 0,2L. Αποθήκευση σε θερμοκρασία 4 °C. |
| 10 % APS | Σε 1 mL ddH ₂ O διαλύονται 100 mg APS και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20 °C. |
| TEMED | Διάλυμα έτοιμο προς χρήση. Αποθήκευση |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | σε θερμοκρασία 4 °C. |
| PMSF 200 mM | Η παρασκευή διαλύματος PMSF 200 mM πραγματοποιείται με την διάλυση σε ισοπροπανόλη, σε αραιώση 10% v/v. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10× | Για 1L διαλύματος ζυγίζονται: <ul style="list-style-type: none"> • Γλυκίνη, 144 gr • Tris base, 30.3 gr • Τελικός όγκος διαλύματος: 1 L, σε ddH₂O. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1× | <ul style="list-style-type: none"> • Σε 900 mL dH₂O προστίθενται 100 mL Running Buffer, 10× και 0.1 % SDS. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1× | Αποτελείται από: <ul style="list-style-type: none"> • Running Buffer 10×, 10 % • SDS, 0.05 % • Μεθανόλη, 20 % • Προσθήκη dH₂O, μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10× | Αποτελείται από: <ul style="list-style-type: none"> • Na₂HPO₄, 0.091 M • NaCl, 1.5 M. • NaH₂PO₄, 0.017 M Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1× | Αραιώση stock PBS buffer 10× σε dH ₂ O ή ddH ₂ O σε αναλογία 1/10 και προσθήκη 1 % Tween-20. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (TBS) 10× | Αποτελείται από: <ul style="list-style-type: none"> • NaCl, 1.5 M • Tris Base, 0.2 M Ρύθμιση του pH, με πυκνό HCl, στο 7,5 |
| Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1× | Αραιώση stock buffer TBS 10× σε dH ₂ O ή ddH ₂ O σε αναλογία 1/10 και προσθήκη 1 % Tween-20. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. |
| Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA-TAE 50X (Stock) | Για 1L διαλύματος ζυγίζονται: <ul style="list-style-type: none"> • Σε 600 ml dH₂O διαλύονται 242.2 gr Tris • EDTA: 0.1 L, 0.5 M, pH: 8 • 0.571 L οξικό οξύ Συμπλήρωση νερού μέχρι το 1L. |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | TAE 1X: Αραίωση με dH ₂ O |
| RIPA Buffer | <p>Αποτελείται από:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.4 • EDTA, 0.001 M • NP-40, 1% • NaCl, 0.15 M • Na-deoxycholate, 0.25% • Αποθήκευση σε θερμοκρασία 4 °C. <p>Πριν την χρήση, στο διάλυμα προστίθενται:</p> <ul style="list-style-type: none"> • PMSF, 0.02 M • 10 μl Proteases Inhibitors Roche 1/100 • DTT, 1 M |
| Loading Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης DNA σε πηκτική αгарόζης) | <p>Αποτελείται από:</p> <ul style="list-style-type: none"> • κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v • γλυκερόλη, 30% v/v - διάλυση σε ddH₂O • xylene cyanol, 0.25% w/v • Διατήρηση σε θερμοκρασία 4 °C. |
| Μάρτυρας μοριακών μεγεθών | <p>Μάρτυρας μοριακών μεγεθών με εύρος από 10 έως 170 kDa. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε διάλυμα που περιέχει:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tris-H₃PO₄, pH 7.5, 0.0625 M • NaN₃, 0.001 M • SDS, 2 % • EDTA, 0.001 M • Γλυκερόλη, 33 % • DTT, 0.01 M <p>[ThermoFisher Scientific Inc., 2013].</p> |
| Διαλύματα για εμφάνιση σήματος | <p>Εταιρεία παρασκευής: Kodak.</p> <p>Αποτελείται από:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Developer solution: Διάλυμα ανάπτυξης σήματος 2. Fixer solution: Διάλυμα μονιμοποίησης σήματος. <p>Η διάλυση των παραπάνω διαλυμάτων γίνεται σε dH₂O σε αναλογία 1 : 3,5 v/v.</p> |
| Διάλυμα φωσφορικού νατρίου: Sodium Phosphate buffer solution | <p>Για την παρασκευή του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.5, 0.1 M απαιτείται η ανάμειξη συγκεκριμένων όγκων από:</p> <ul style="list-style-type: none"> • stock διάλυμα 0.2 M Na₂HPO₄, διαλυμένο σε dH₂O • stock διάλυμα 0.2 M NaH₂PO₄, |

| | διαλυμένο σε dH ₂ O |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DEX | Διαλυτοποίηση σε absolute EtOH. Stock διάλυμα: 1 mM. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20 °C |
| Polyvinyl-Alcohol (PVA) | Σε 75 ml ddH ₂ O, το οποίο είναι θερμασμένο στους 80° C προστίθενται 5 ml διαλύματος Tris-PO ₄ , pH:9 και στη συνέχεια στο διάλυμα αυτό προστίθενται 100 mg χλωροβουτανόλης. Ακολουθεί ανάδευση και αργή προσθήκη 20 gr σκόνης PVA, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Έπειτα, εφόσον το διάλυμα έχει γίνει παχύρευστο, πραγματοποιείται η προσθήκη 50 μl rhenol red και το διάλυμα παίρνει κόκκινο-μπορντώ χρώμα. Τέλος, προστίθενται 20 ml γλυκερόλης στο διάλυμα και αφήνεται να κρυώσει, ώστε να μοιραστεί σε aliquots των 10 ml και να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία -20° C. |
| Sulforhodamine B (SRB) | <ul style="list-style-type: none"> • Διάλυση σε 1% acetic acid • Ζυγίζονται 0.4gr σκόνης SRB (Sigma) και διαλύονται σε 100 ml 1% acetic acid. |
| Sodium pyrophosphate decahydrate (Na₄P₂O₇ · 10H₂O) | <ul style="list-style-type: none"> • Διάλυση 0.446 gr σκόνης σε 1 ml ddH₂O. • Καρχικό: 200 mM, Cτελικό: 1mM • Άρα 5μl σε 1 ml lysis Buffer |
| Sodium orphovanadate (Na₃VO₄) | <ul style="list-style-type: none"> • Διάλυση 0.2 gr σκόνης σε 1 ml ddH₂O. • Καρχικό: 200 mM, Cτελικό: 1mM • Άρα χρησιμοποιούνται sodim orphovanadate 5μl σε 1 ml lysis Buffer |
| Sodium Fluoride (NaF) | <ul style="list-style-type: none"> • Διάλυση 0.419 gr σκόνης σε 1 ml ddH₂O. • Καρχικό: 1 M, Cτελικό: 10 mM • Άρα 10μl σε 1 ml lysis Buffer |

Πίνακας 2: Σύσταση καλλιεργητικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

| DMEM-Gibco (Dulbecco's modified eagle medium) | D-Γλυκόζη | L-Γλουταμίνη (2 mM) | Γλουταθει-όνη | Πυροσταφυλικό | Ερυθρό της φαινόλης | Εμβρυικός βόειος ορός (FBS) 10% | P/S (100 units/ml) |
|-----------------------------------------------|-----------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------------------------|--------------------|
| DMEM with High concentration of Glucose | 4,5 g/L | + | - | + | + | FBS | + |
| DMEM with High concentration of Glucose (cis) | 4,5 g/L | + | - | + | + | CIS (ορός ελεύθερος ορμονών) | + |
| RPMI | - | - | + | - | + | - | + |
| optiMEM | - | + | - | - | - | - | - |

Πίνακας 3: Κυτταρικές σειρές, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

| Κυτταρική Σειρά | Οργανισμός | Τύπος κυττάρων | Ιστός | Ασθένεια |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
| HeLa | Homo sapiens | Επιθηλιακά | Τράχηλος της μήτρας | Αδενοκαρκίνωμα |
| HEK293 | Homo sapiens | Εμβριονικά | Εμβριονικός νεφρός | - |
| HepG2 | Homo sapiens | Επιθηλιακά | Ήπαρ | Ηπατοκαρκίνωμα |
| HepG2mtGFP | Homo sapiens, υπερέκφραση της πρωτεΐνης GFP υπό μορφή υβριδικής πρωτεΐνης με μιτοχονδριακή στόχευση [65] | Επιθηλιακά | - | - |
| HepG2mtGFPGR | Homo sapiens, υπερέκφραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών υπό μορφή υβριδικής πρωτεΐνης με μιτοχονδριακή στόχευση [65] | Επιθηλιακά | - | - |
| Cos-7 | Cercopithecus aethiops | SV40 Μετασηματισμένα | Νεφρά | - |

Πίνακας 4: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην διδακτορική διατριβή.

| Αντίσωμα | Εταιρία | Κωδικός | Πηγή | kDa |
|----------------------------|----------------|----------------|-------------|------------|
| α-tubulin | Santa Cruz | SC-9104 | Rabbit | 55 |
| β actin | Sigma | - | Mouse | 45 |
| Bax | Cell Signaling | 2772 | Rabbit | 20 |
| BcL-xLs (D-3) | Santa Cruz | SC-271121 | Mouse | 18, 30 |
| Bcl-2 | Cell Signaling | 2876 | Rabbit | 28 |
| Casp.3 | Cell Signaling | 9662 | Rabbit | 17, 35 |
| Casp.9 | Cell Signaling | 9508 | Mouse | 47, 35 |
| GR-H300 | Santa Cruz | SC-8992 | Rabbit | 90-95 |
| GR (G-5) | Santa Cruz | SC-393232 | Mouse | 90-95 |
| GR (FiGR) | Santa Cruz | SC-12763 | Mouse | 90-95 |
| GR (3D5) | Santa Cruz | SC-56851 | Mouse | 90-95 |
| GR 2F8 | - | Homemade | Mouse | 90-95 |
| PEPCK | Santa Cruz | H300 | Rabbit | 64 |
| P53 | Dako | - | Mouse | 53 |
| PDH | Santa Cruz | SC-65242 | Mouse | 43 |
| SDH | Invitrogen | - | Mouse | 72 |
| COX2 (D5) | Santa Cruz | SC-514489 | Mouse | 21 |
| Citrate synthase | Santa Cruz | SC-390693 | Mouse | 52 |
| Grim 19 (F10) | Santa Cruz | SC-365978 | Mouse | 16 |
| NQO1 (H9) | Santa Cruz | SC-376023 | Mouse | 31 |
| COX 5b (C-5) | Santa Cruz | SC-374416 | Mouse | 14 |
| BECN1 (E-8) | Santa Cruz | SC-48341 | Mouse | 60 |
| GAPDH (G-9) | Santa Cruz | SC-365062 | Mouse | 37 |
| Lamin A/C (E-1) | Santa Cruz | SC-376248 | Mouse | 62-69 |
| COX 15 (G10) | Santa Cruz | SC-390987 | Mouse | 46 |
| Hsp70 (3A3) | Santa Cruz | SC-32239 | Mouse | 70 |
| Hsp90 (4F10) | Santa Cruz | SC-69703 | Mouse | 90 |
| VDAC 1 (B-6) | Santa Cruz | SC-390996 | Mouse | 30-35 |
| PPARα (H2) | Santa Cruz | Sc-398394 | Mouse | 55 |
| MDH2 (1G12) | Santa Cruz | SC-293474 | Mouse | 36 |
| Caspase-3 (31A1067) | Santa Cruz | SC-56053 | Mouse | 32 |
| mtTFA (C-9) | Santa Cruz | SC-376672 | Mouse | 25 |
| Anti-LC3B | Abcam | Ab48394 | Rabbit | 17 & 19 |
| BNIP3L/NIX (D4R4B) | Cell Signaling | 12396 | Rabbit | 38 & 76 |
| C23 (Nucleolin) | Santa Cruz | SC-8031 | Mouse | 110 |
| P65 | Santa Cruz | SC-109 | Rabbit | 65 |

| | | | | |
|-------------------|-------------------|-----------|--------|------|
| COX II | Invitrogen | A-6404 | Mouse | 25.6 |
| SDH | Invitrogen | - | Mouse | 70 |
| LDH | Santa Cruz | Sc-133123 | Mouse | 35 |
| P62/SQSTM1 | MBC | PM045 | Rabbit | 62 |
| NDUFS2 | Thermo scientific | PA5-19342 | Goat | 52.5 |
| COXIV | Abcam | Ab33985 | Mouse | 15 |

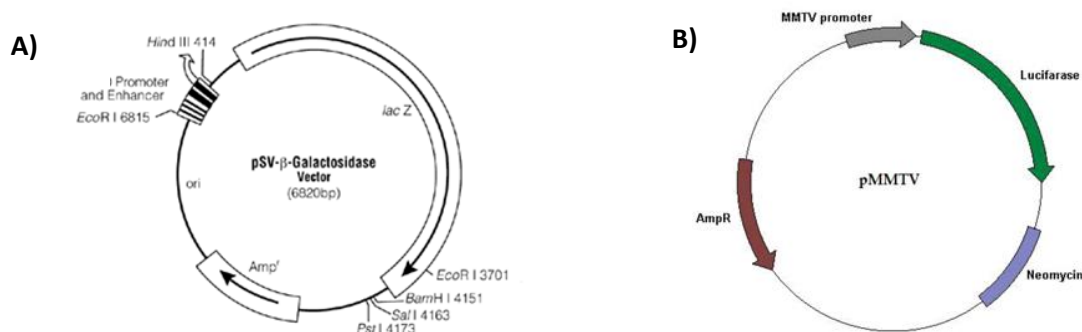
Πίνακας 5: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην διδακτορική διατριβή.

| Δευτερογενή αντισώματα | Εταιρία |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|
| Mouse IgG-HRP | Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific |
| Rabbit IgG-HRP | Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific |
| Mouse IgG-Alexa Fluor 555 | Invitrogen-Thermo Fisher Scientific |
| Mouse IgG, Light chain specific | Jackson Immunoresearch |
| Mouse IgG, Heavy chain specific | Jackson Immunoresearch |

Πίνακας 6: Οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

| Μύες | Κωδικός | Τύπος μετάλλαξης | Περιγραφή | Εταιρία |
|--------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| NOD.CB17Prkdc^{scid}/J ή NOD SCID | 001303 | Ομόζυγοι για την μετάλλαξη Prkdc ^{scid} -σοβαρή συνδυασμένη ανοσολογική ανεπάρκεια. Όπου Prkdc : protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide. | <ul style="list-style-type: none"> • Απουσία λειτουργικών T κυττάρων και B κυττάρων • Λεμφοπενία • Υπογαμμασφαιριναμία • Φυσιολογικό αιματοποιητικό μικροπεριβάλλον. | The Jackson Laboratory |
| NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Sz J | 005557 | 2 μεταλλάξεις: 1) Στο γενετικό τόπο NOD / | <ul style="list-style-type: none"> • Η μετάλλαξη scid είναι στην πρωτεΐνη Prkdc, μια πρωτεΐνη που | The Jackson Laboratory |

| | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <p>ή NOD-scid IL2Rgammanull</p> <p>ή NOD-scid IL2Rgnull</p> <p>ή NSG</p> <p>ή NOD scid gamma</p> | | <p>ShiLTJ.-σοβαρή συνδυασμένη ανοσολογική ανεπάρκεια (scid)</p> <p>2) Πλήρες μηδενικό αλληλόμορφο της κοινής γάμμα αλυσίδας του υποδοχέα IL2 (IL2rgnull).</p> | <p>συμμετέχει στην αποκατάσταση του DNA και γι' αυτό τον λόγο καθιστά τα ποντίκια ανεπαρκή στα Β και Τ λεμφοκύτταρα.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Η μετάλλαξη IL2rgnull εμποδίζει την σηματοδότηση των κυτοκινών, οδηγώντας σε ανεπάρκεια λειτουργικών NK κυττάρων (natural killers cells). | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|



Εικόνα 28: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. **A)** Ο πλασμιδιακός φορέας pSV40-β-Gal χρησιμοποιείται ως σύστημα αναφοράς κατά την διαμόλυνση των ευκαρυωτικών κυττάρων, καθώς είναι υπεύθυνος για την παραγωγή της γαλακτοσιδάσης. **B)** Τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pMMTV-NF-kB-Luc είναι υπεύθυνα για την έκφραση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης, υπό τον έλεγχο της σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών (στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης υπάρχουν επαναλήψεις GREs) ή του NF-kB (στον υποκινητή του γονιδίου της λουσιφεράσης υπάρχουν επαναλήψεις στοιχείων απόκρισης του NF-kB) αντίστοιχα.

2.1 Καλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών

Με σκοπό την σάρωση διαφόρων τριτερπενοειδών ενώσεων αλλά και για την διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές σειρές HeLa, HEK293, COS.7, HepG2 και οι καρκινικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, οι οποίες εκφράζουν μιτοχονδριακά τις πρωτεΐνες GFP και GFPGR αντίστοιχα [65] (όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**, στα Υλικά και Μέθοδοι). Για την καλλιέργεια όλων αυτών των

κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό DMEM 4,5 g/L γλυκόζης, εμπλουτισμένο με 10% FBS (Εμβρυικός βόειος ορός) και 1% L-γλουταμίνη.

Σε τακτά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν έλεγχοι καθαρότητας των κυττάρων από το μυκόπλασμα με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και την χρήση ειδικών εκκινητών έναντι του μυκοπλάσματος και έναντι της ακτίνης.

2.2 Διαδικασία δημιουργίας απενεργοποιημένου εμβρυικού βόειου ορού με την χρήση του ζωάνθρακα (Charcol inactivated serum-cis)

Για την μελέτη των δράσεων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, σε πολλές περιπτώσεις είναι αναγκαία η εξάλειψη των ορμονών από το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, απαραίτητη είναι η επεξεργασία του εμβρυικού βόειου ορού (FBS) με διάλυμα δεξτράνης-ζωάνθρακα, το οποίο έχει την ικανότητα να απομακρύνει τις λιπόφιλες ορμόνες από τον ορό. Πιο συγκεκριμένα, μετά την επώαση του ορού με το διάλυμα του ζωάνθρακα, το τελευταίο έχει την ικανότητα να συμπλοκοποιεί τα μη πολικά μόρια πχ. λιπόφιλα μόρια (αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες) που περιέχονται στον ορό, ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος και χωρίς να επηρεάζει την σύσταση του ορού σε θρεπτικά συστατικά.

Το διάλυμα του ζωάνθρακα αποτελείται από τα εξής συστατικά:

- Ζωάνθρακα 2,5% w/v
- Δεξτράνη (Dextran) 0,25% w/v
- Διάλυμα Tris-HCL, pH: 7,4, 10 mM

Αρχικά, V ml διαλύματος ορού επωάζονται με V/5 ml διαλύματος ζωάνθρακα στους 56° C, για 30 min, υπό ανάδευση (210 rpm). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται δεκάλεπτη φυγοκέντρηση του διαλύματος ορού-ζωάνθρακα, ώστε να καταστή δυνατή η καθίζηση και η απομάκρυνση του ζωάνθρακα μαζί με τα λιπόφιλα μόρια, τα οποία έχει δεσμεύσει. Για την πλήρη απομάκρυνση των μη πολικών μορίων πραγματοποιείται επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας, ο όγκος του ορού που προέκυψε φιλτράρεται με την χρήση φίλτρων 0,22 μm, σε αποστειρωμένες συνθήκες (Laminar Flow Hood).

2.3 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων-Transfection

Ο όρος διαμόλυνση ή transfection αναφέρεται στην εισαγωγή <<γυμνών>> ή απομονωμένων νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η διαμόλυνση επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούν μια ουσία ή κάποιο άλλο μηχανισμό για να καταστήσουν εφικτή την διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου στο πλασμιδιακό DNA. (πχ. άνοιγμα μικροσπών στην μεμβράνη). Η εισαγωγή των νουκλεϊνικών οξέων στα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή των ιδιοτήτων του κυττάρου,

επιτρέποντας έτσι την επιτυχή έκφραση του γονιδίου που φέρει ο φορέας αυτός, από το κύτταρο ξενιστή. Τέλος, μέσω της διαμόλυνσης μπορεί να επιτευχθεί είτε η παροδική εισαγωγή των νουκλεϊνικών οξέων στα κύτταρα, δηλαδή η έκφραση τους να πραγματοποιείται μόνο για περιορισμένο χρονικό διάστημα είτε σταθερή εισαγωγή των νουκλεϊνικών οξέων, καθώς αυτά ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του ξενιστή και μπορούν να αναδιπλασιάζονται.

2.3.1 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με την χρήση λιποσωμάτων (Λιποφεκταμίνη)

Η χρήση κατιονικών λιποσωμάτων ως μέθοδος διαμόλυνσης χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή είτε DNA είτε mRNA (RNA και siRNA) στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το εμπορικό παρασκεύασμα Lipofectamine 2000 που χρησιμοποιείται για την διαμόλυνση των κυττάρων με αυτό τον τρόπο, αποτελείται από κατιονικά λιποσώματα. Η δομή των λιποσωμάτων αυτών αποτελείται από την βασική κεφαλή που είναι θετικά φορτισμένη και από μια ή δύο αλυσίδες υδρογοναθράκων. Η θετικά φορτισμένη κεφαλή των κατιονικών λιποσωμάτων του σκευάσματος αυτού μπορεί να αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊνικά οξέα και συνεπώς να επιτρέπει την αλληλεπίδραση των νουκλεϊκών οξέων με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου <<ξενιστή>>. Έτσι, με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η σύντηξη του συμπλόκου λιποσώματος-νουκλεϊκού οξέος με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη και το σύμπλοκο μπορεί να εισαχθεί μέσα στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία της διαμόλυνσης, απαιτείται η 70% πληρότητα της επιφάνειας των κυττάρων που πρόκειται να διαμολυνθούν. Στα κύτταρα αυτά, 30 min, πριν την διαδικασία της διαμόλυνσης έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση του θρεπτικού στο οποίο επώάζονται με το θρεπτικό μέσο OptiMEM, το οποίο δεν περιέχει FBS και αντιβιοτικά. Στη συνέχεια, ακολουθεί η δημιουργία 2 διαλυμάτων που αποτελούνται από ίσο όγκο θρεπτικού OptiMEM. Στο πρώτο διάλυμα περιέχονται οι πλασμιδιακοί φορείς που πρόκειται να εισαχθούν στα κύτταρα, ενώ στο δεύτερο περιέχεται η Lipofectamine 2000. Η αναλογία μg DNA/λιποφεκταμίνη εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων. Για τα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1 μg DNA/ 1 μl λιποφεκταμίνη, για τα κύτταρα COS.7 η αναλογία ήταν 1 μg DNA/ 0,5 μl λιποφεκταμίνη, ενώ για τα κύτταρα HEK293 χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 1 μg DNA/ 0,3 μl λιποφεκταμίνη. Μετά την ανάμειξη των 2 διαλυμάτων, πραγματοποιείται επώαση του ενιαίου διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και έπειτα γίνεται η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα αυτό για 4 ώρες. Μετά το πέρας των 4 ωρών το διάλυμα αυτό αφαιρείται και τα κύτταρα επώάζονται με σύνθετο θρεπτικό μέσο.

2.3.2 Διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με την χρήση του χλωριούχου ασβεστίου

Εκτός από την χρήση της λιποφεκταμίνης, μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική μέθοδος διαμόλυνσης είναι αυτή που βασίζεται στην χρήση του χλωριούχου ασβεστίου, παρουσία φωσφορικών αλάτων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τόσο για την δημιουργία παροδικών όσο και σταθερών μετασχηματισμένων κυτταρικών σειρών. Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων αλλά και από διάφορες άλλες συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH αλλά και η συγκέντρωση των φωσφορικών αλάτων.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι παρουσία χλωριούχου ασβεστίου, διαλύματος φωσφορικών και DNA, δημιουργείται ένα ίζημα φωσφορικού ασβεστίου-DNA (συνκατακρήμνιση), το οποίο προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων και διευκολύνεται έτσι η είσοδος του DNA στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω ενδοκύτωσης.

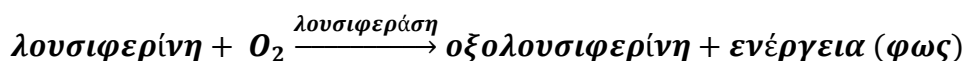
Όσον αφορά το πειραματικό μέρος, απαιτείται πληρότητα 30% της επιφάνειας των κυττάρων που πρόκειται να διαμολυνθούν. Στα κύτταρα αυτά, 4 ώρες, πριν την διαδικασία της διαμόλυνσης έχει πραγματοποιηθεί αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου στο οποίο επωάζονται με φρέσκο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια, ακολουθεί η δημιουργία 2 διαλυμάτων που αποτελούνται από ίσο όγκο. Το πρώτο διάλυμα αποτελείται από τους πλασμιδιακούς φορείς, από το χλωριούχο ασβέστιο (2M) και από ddH₂O, έως ότου συμπληρωθεί ο επιθυμητός όγκος. Το δεύτερο διάλυμα αποτελείται από το HBSX2 (Σύσταση: 1) διάλυμα Hepes 50mM, 2) διάλυμα Na₂HPO₄ 1,5mM, 3) διάλυμα NaCl 280mM). Η αναλογία μg DNA/ μl CaCl₂ διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Στα κύτταρα HEK293 η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε για την διαμόλυνση ήταν 1 μg DNA/ 5 μl CaCl₂. Τα 2 διαλύματα αναμείχθηκαν και μετά από 25 λεπτά το ενιαίο διάλυμα επώαστηκε με τα κύτταρα. Τέλος, μετά από 12-16 ώρες πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού στα κύτταρα, μετά την απομάκρυνση του παραπάνω διαλύματος.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν και στις 2 παραπάνω δοκιμασίες διαμόλυνσης προέκυψαν μετά από τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων E.coli στελέχους DH5aTM (Life Technologies- Invitrogen), την επίστρωση τους σε τριβλία που περιείχαν κατάλληλο αντιβιοτικό, την δημιουργία μικρών και μεγάλων καλλιεργειών και τέλος την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN (QIAGEN® 2012) κάνοντας χρήση του plasmid midi kit για την λήψη πλασμιδίων υψηλής καθαρότητας.

2.4 Δοκιμασία προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας Λουσιφεράσης-Γαλακτοσιδάσης

Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η λουσιφεράση είναι ένα ένζυμο, που βρίσκεται στις πυγολαμπίδες και το οποίο παρουσία ATP προσδίδει την χαρακτηριστική βιοφωταύγεια των σκαθαριών αυτών. Στο γεγονός αυτό στηρίζεται και η δοκιμασία της λουσιφεράσης. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική λουσιφερίνη οξειδώνεται παρουσία ATP και οξυγόνου, παράγοντας φώς και οξολουσιφερίνη. Η αντίδραση της χημειοφωταύγειας που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Το ένζυμο της λουσιφεράσης είναι αυτό που καταλύει την παραπάνω αντίδραση, παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή το Mg²⁺.

Το γονίδιο της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, καθώς βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή, ο οποίος φέρει αλληλουχίες του γονιδίου του οποίου η μεταγραφική ενεργότητα θέλει να ελεγχθεί πχ. μπορεί να φέρει επαναλαμβανόμενες GRE αλληλουχίες, και έτσι η έκφραση του να υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR. Γι' αυτό, τον λόγο, οι πλασμιδιακοί φορείς με τους οποίους διαμολύνονται τα κύτταρα φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση της λουσιφεράσης, αλλά και της γαλακτοσιδάσης. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης επιτυγχάνεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Πειραματική διαδικασία:

Κατά την δοκιμασία της λουσιφεράσης, αναμειγνύονται 10μl του υπό εξέταση δείγματος με 100μl διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα λουσιφεράσης είναι φωτοευαίσθητο και τα συστατικά από τα οποία αποτελείται φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

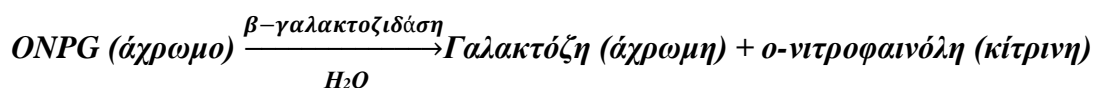
| | |
|-------------------------|--------------|
| Λουσιφερίνη | 470μM |
| Συνένζυμο-A | 270μM |
| Tris pH 8 | 20 mM |
| MgSO₄ | 2,67 mM |
| ATP | 530 μM |
| EDTA | 0,1 mM |
| DTT | 33,3 mM |
| ddH₂O | - |

Τέλος, το παραγόμενο φώς μετράται στο λουσιφερόμετρο (Berthold Technologies, LuBat 39508) και οι τιμές της λουσιφεράσης κανονικοποιούνται προς τις τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας της γαλακτοσιδάσης.

Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται τόσο για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης, όσο και για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της παροδικής διαμόλυνσης που πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα.

Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο-υδρολάση που διασπά τους γλυκοσιδικούς δεσμούς, μετατρέποντας τα β-γαλακτοσίδια σε μονοσακχαρίτες. Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιείται με την μελέτη της αντίδρασης υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG), όπως φαίνεται παρακάτω.



Με την προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 1 M (R.T.) μπορεί να πραγματοποιηθεί καταστολή της συγκεκριμένης αντίδρασης, καθώς το συγκεκριμένο διάλυμα μεταβάλλει τιμή του pH του διαλύματος στο 11, απενεργοποιώντας την β-γαλακτοσιδάση και σταθεροποιώντας την ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος της ο-νιτροφαινόλη. Με την φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε $\lambda=420$ nm, μπορεί να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίστηκε.

Πειραματική διαδικασία:

Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία διαλύματος ιόντων Mg^{2+} , το οποίο αποτελείται από 4,5 M β-μερκαπταιθανόλη, 0,1 M MgCl_2 και 58.5 % v/v ddH₂O, και παρουσία διαλύματος φωσφορικών (sodium phosphate 0,1 M pH:7,5).

Σε κάθε δείγμα προστίθενται τα εξής: 20 μl δείγματος, 3μl διαλύματος ιόντων Mg^{2+} , 201μl διαλύματος sodium phosphate και 66 μl ONPG (υπόστρωμα της αντίδρασης). Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C και μόλις αναπτυχθεί επαρκής ένταση κίτρινου χρώματος, προστίθενται 500 μl διαλύματος Na_2CO_3 1 M, ώστε να πραγματοποιηθεί ο τερματισμός της αντίδρασης. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνται σε $\lambda=420$ nm.

2.5 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας (Sulphorodamine B assay, SRB)

Η δοκιμασία σουλφουροδαμίνης Β (Sulphorodamine B, SRB) αποτελεί μια μέθοδο ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επαγόμενης από διάφορες ενώσεις κυτταροτοξικότητας. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της χρωστικής SRB να συνδέεται ηλεκτροστατικά και με βάση το pH σε βασικά αμινοξέα πρωτεϊνών, τα οποία έχουν υποστεί κατεργασία με τριχλωρο-οξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA). Σε όξινες συνθήκες, η χρωστική μπορεί να συνδέεται στα αμινοξέα αυτά, ενώ σε βασικές συνθήκες μπορεί να απομονώνεται από τα κύτταρα και να διαλυτοποιείται, καθιστώντας δυνατή την μέτρηση της.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, 1×10^4 , στρώνονται σε 96 well plate. Μετά από μια μέρα, στα κύτταρα προστίθενται σε τριπλέτες, οι επιθυμητές ενώσεις (σε διάφορες συγκεντρώσεις) ή η δεξαμεθαζόνη (DEX) 1 μ M σε DMEM medium, παρουσία 2 mM glutamine και 5% FBS και επωάζονται με αυτές για 48 ώρες. Μετά το πέρας του 48ωρου, τα κύτταρα υφίστανται επεξεργασία με 10% τριχλωρο-οξικού οξέος και αφήνονται για 1h επώαση σε θερμοκρασία 4° C. Έπειτα, πραγματοποιείται απομάκρυνση του TCA και πλύσεις με ddH₂O και το Plate αφήνεται να στεγνώσει. Στη συνέχεια, ακολουθεί η χρώση των κυττάρων με 0.4 % SRB σε 1% acetic acid, για 30 λεπτά. Περαιτέρω επώαση των κυττάρων για 10 min, με 10 mM Tris-Base, σε θερμοκρασία 37° C, και ανάδευση για 2 min, καθιστά την SRB διαλυτή, ώστε να μπορεί να μετρηθεί. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση της διαλυτής SRB στα 540 nm, σε φασματοφωτόμετρο της εταιρείας BIO
TEK Instruments (microplate reader: BIO TEK Instruments, EL 311, Winooski, Vermont, United States).

2.6 Ανοσοκυτταροχημεία

Η ανίχνευση βιολογικών μορίων (πρωτεϊνών, πεπτιδίων) σε μία κυτταρική καλλιέργεια πραγματοποιείται με την μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας (Immunocytochemistry, ICC). Η μέθοδος αυτή διαφέρει από την ανοσοϊστοχημεία, η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μορίων σε έναν ιστό, δηλαδή σε ένα μείγμα κυττάρων. Η ανοσοκυτταροχημεία βασίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση ενός αντιγόνου με το αντίστοιχο αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με ένα μόριο π.χ. μια φθορίζουσα χρωστική και κάτω από κατάλληλες συνθήκες θα δώσει σήμα, το οποίο θα είναι ανιχνεύσιμο με την χρήση ενός κατάλληλου μικροσκοπίου π.χ. μικροσκόπιο φθορισμού.

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία, πρώτο βήμα, το οποίο εφαρμόζεται είναι η τοποθέτηση και αποστείρωση ειδικών γυάλινων καλυπτρίδων (coverslips) διαμέτρου 13 ή 15 mm, εντός των φρεατίων (well plates) σε ένα 24 well plate. Στη συνέχεια, πάνω στις καλυπτρίδες τοποθετείται και καλλιεργείται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων και ακολουθεί σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων, με την χρήση κατάλληλων χρωστικών. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική Hoeschst 33258 (1 μ g/ml) χρησιμοποιείται για τη χρώση των πυρήνων με μπλε χρώμα, καθώς έχει την ικανότητα σύνδεσης στην μικρή αύλακα του DNA. Επίσης, η χρωστική Mito Tracker Red CMX (200 nm) σημαίνει με κόκκινο χρώμα μόνο τα βιολογικά ενεργά

μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Στο στάδιο αυτό προστίθενται και οι προς μελέτη ενώσεις (συγκέντρωσης 1 ή 10 μM), για τον έλεγχο της πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Τόσο οι ενώσεις, όσο και οι χρωστικές Hoeschst 33258 και CMX προστίθενται στο καλλιεργητικό υλικό των κυττάρων, το οποίο δεν περιέχει στεροειδείς ορμόνες.

Έπειτα, ακολουθεί η διαδικασία μονιμοποίησης των κυττάρων, η οποία θα εξασφαλίσει την διατήρηση της κυτταρικής μορφολογίας και την αποφυγή της προσβολής τους από πρωτεολυτικά ένζυμα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η μονιμοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την χρήση μεθανόλης και ακετόνης (οργανικοί διαλύτες), οι οποίοι εξασφαλίζουν καλύτερη πρόσβαση του αντισώματος στο αντιγόνο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση των καλυπτρίδων με μεθανόλη για 20 min, σε θερμοκρασία -20°C και μετά την αφαίρεσή της, και επώαση με ακετόνη για 2 min. Μετά την αφαίρεση της ακετόνης, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS 1x. και γίνεται προσθήκη του 1^ο αντισώματος, σε PBST σε αραιώση 1/50. Το Tween 20 που υπάρχει στο PBST, βοηθά στην διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών και αποτρέπει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 1h. Μετά το πέρας της 1h, οι καλυπτρίδες ξεπλένονται με PBS 1x και πραγματοποιείται προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος σε PBST, το οποίο είναι σημασμένο με μόριο αναφοράς, και διαθέτει την ικανότητα αναγνώρισης και σύνδεσης στο 1^ο αντίσωμα. Η διάρκεια επώασης με το 2^ο αντίσωμα είναι 1h σε RT απουσία φωτός. Τέλος, τα coverslips ξεπλένονται με PBS 1x και μονιμοποιούνται με την χρήση του διαλύματος πολυβινύλ-αλκοόλη (polyvinyl-alcohol, PVA) σε πλάκες μικροσκοπίου και έπειτα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4°C , σε ειδική κασετίνα, απουσία φωτός. Μετά την σταθεροποίηση του PVA, τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού και πραγματοποιείται λήψη και επεξεργασία φωτογραφιών με τα προγράμματα Image J και Q capture αντίστοιχα.

2.7 Μύες

2.7.1 Εμβολιασμός μυών με τις καρκινικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR

Στελέχη μυών NOD.CB17Prkdcscid/J και NOD-scid IL2Rgnull (τα οποία αναφέρονται στον πίνακα 6) εμβολιάστηκαν με τις καρκινικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Ο εμβολιασμός της κάθε κυτταρικής σειράς στους μύες πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο RPMI (όπως αναφέρεται στον πίνακα 2). Η ανάπτυξη των όγκων πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα από 3 βδομάδες έως 1 μήνα. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των όγκων, πραγματοποιούνταν μετρήσεις των διαστάσεων τους σε κάθε πόδι του μύ, με την χρήση ειδικού χάρακα (παχύμετρου).

2.7.2 Ομογενοποίηση όγκων αφαιρεθέντων από μύες

Μετά την αφαίρεση των όγκων από τους μύες, ακολουθεί ο τεμαχισμός τους σε πάγο. Κάθε τεμαχισμένος ιστός τοποθετείται στο γυάλινο δοχείο του ομογενοποιητή Potter Elvehjem και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (Lysis Buffer), η οποία εξαρτάται από το βάρος του κάθε ιστού (4 ml διαλύματος ανά 1 gr ιστού). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ομογενοποίηση του ιστού με την χρήση του μηχανικού ομογενοποιητή Potter Elvehjem και το ομογενοποίημα αφήνεται στον πάγο για 20-25 λεπτά.

Το διάλυμα λύσης περιέχει τα εξής:

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

Επίσης, για την αναστολή των πρωτεασών, σε 1ml του διαλύματος λύσης προστίθενται 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 10μl Coctail Protease Inhibitors (Roche) και 1 mM DTT (διθειοθρεϊτόλη). Επιπλέον, για την αναστολή της δράσης των φωσφατασών σε 1 ml του διαλύματος λύσης προστίθενται και 5 μl διαλύματος Sodium pyrophosphate decahydrate 1mM, 5 μl διαλύματος Sodium orthovanadate 1mM καθώς και 5μl διαλύματος Sodium Fluoride (NaF), 10 mM. Έπειτα, οι ιστοί ομογενοποιούνται περαιτέρω, με την χρήση υπερήχων, που έχει ως αποτέλεσμα και τον κατακερματισμό του DNA. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται έξι επαναλήψεις των 5 δευτερολέπτων, με απόσταση 1 min μεταξύ των επαναλήψεων, στον πάγο (4°C).

2.8 Απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων

Η μέθοδος της υποκυτταρικής κλασμάτωσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των διαφόρων οργανιδίων των κυττάρων και βασίζεται στο διαφορετικό μέγεθος, πυκνότητα και φορτίο που διαθέτουν τα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια. Αρχικά, η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει ομογενοποίηση των κυττάρων, ώστε να επιτευχθεί η ελεγχόμενη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και να καταστή εφικτή η περαιτέρω λήψη των υποκυτταρικών τους οργανιδίων. Στη συνέχεια με διαφορεική φυγοκέντρηση, σταδιακά λαμβάνονται με την σειρά: 1) οι πυρήνες και τα άσπαστα κύτταρα, 2) το μεταμιτοχονδριακό υπερκείμενο (Postmitochondrial fraction, PM), το οποίο περιέχει κυτταροπλασματικά συστατικά και 3) τα μιτοχόνδρια (Mitochondrial fraction, M).

Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι η ποσότητα των μιτοχονδρίων στο συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα είναι μικρή, για την λήψη ικανοποιητικής ποσότητας μιτοχονδριακού εκχυλίσματος, απαραίτητη είναι η καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλία 150 x 20 mm. Το πρωτόκολλο κλασμάτωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αναφέρεται αναλυτικά στην δημοσίευση Psarra et al., 2005. Για την αποφυγή της δράσης των πρωτεολυτικών ενζύμων, η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4° C. Αρχικά, η διαδικασία ξεκινά με την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα και

την έκπλυση των plates με PBS 1x (4° C). Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος κλασμάτωσης A, στο οποίο έχουν προστεθεί 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών της εταιρίας Roche, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Στη συνέχεια, το κυτταρικό εκχύλισμα που είναι διαλυμένο στο διάλυμα A συλλέγεται στο γυάλινο φιαλίδιο του μηχανικού ομογενοποιητή Potter Elvehjem, ώστε να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση του στα 2000 rpm. Έπειτα, απομακρύνονται οι κυτταρικές μεμβράνες, οι πυρήνες και τα άσπαστα κύτταρα, φυγοκεντρώντας το ομογενοποίημα για 5 λεπτά, στα 2500 rpm, σε θερμοκρασία 4° C. Το υπερκείμενο στο οποίο περιέχονται και τα μιτοχόνδρια φυγοκεντρείται ξανά για 20 λεπτά, στα 12000 rpm, σε θερμοκρασία 4° C. Το ίζημα που προκύπτει μετά την φυγοκέντρηση περιέχει τα μιτοχόνδρια, επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα κλασμάτωσης B και φυγοκεντρείται εκ νέου για 20 λεπτά, στα 12000 rpm, σε θερμοκρασία 4° C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές, δηλαδή το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται εκ νέου σε διάλυμα B και φυγοκεντρείται για 20 λεπτά, στα 12000 rpm, σε θερμοκρασία 4° C. Τέλος, το ίζημα το οποίο προκύπτει μετά την τελευταία φυγοκέντρηση περιέχει το μιτοχονδριακό κλάσμα (mitochondrial fraction - MITO) και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80° C.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι μετά την ομογενοποίηση αποθηκεύεται μια ποσότητα ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (Total extract), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για οποιαδήποτε πειραματική διαδικασία πραγματοποιηθεί. Επίσης, ως μάρτυρας στις πειραματικές διαδικασίες μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την 2^η φυγοκέντρηση στα 12000, καθώς περιέχει το κυτταρόπλασμα, την πλασματική μεμβράνη και διάφορα μικροσωμάτια. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο συλλέγεται και το συγκεκριμένο υπερκείμενο.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται και για την απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων από ιστούς, με την μόνη διαφορά ότι παραλείπονται τα στάδια της καλλιέργειας των κυττάρων σε plates, καθώς και η έκπλυση τους με PBS 1X. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι για την απομόνωση μιτοχονδρίων από ιστούς απαιτείται οι ιστοί να είναι <<φρέσκοι>>, δηλαδή να έχουν απομονωθεί από το ζώο, λίγο πριν πραγματοποιηθεί η κλασμάτωση των μιτοχονδρίων, χωρίς να έχουν καταψυχθεί, καθώς και να παραμένουν σε πάγο καθ'όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Πριν την διαλυτοποίηση τους σε διάλυμα A, οι ιστοί τεμαχίζονται, έτσι ώστε να καταστή πιο εύκολη η διαδικασία της ομογενοποίησης τους.

Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά από τα οποία αποτελούνται τα διαλύματα της κλασμάτωσης:

| Διάλυμα A | Σύσταση | Διάλυμα B | Σύσταση |
|----------------------|---------|---------------------|---------|
| Hepes-KOH, pH=7,5 | 20 mM | Tris-HCl, pH=7,5 | 20 mM |
| KCl | 10 mM | Μαννιτόλη | 210 mM |
| EDTA | 1 mM | EDTA | 2,5 mM |
| EGTA | 1 mM | Σουκρόζη | 70 mM |
| MgCl ₂ | 1,5 mM | | |
| Σουκρόζη | 250 mM | | |

2.9 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP)

Η ανοσοκατακρήμνιση είναι μια μέθοδος κατά την οποία ένα συγκεκριμένο αντιγόνο κατακρημνίζεται από ένα διάλυμα, με την χρήση ενός ειδικού για το συγκεκριμένο αντιγόνο αντισώματος. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας, κατά την οποία σφαιρίδια από αгарόζη ή κάποιο άλλο υλικό χρησιμοποιούνται ως στερεό υπόστρωμα για την σύζευξη του αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, πρωτεΐνες A ή πρωτεΐνες G, οι οποίες προέρχονται από βακτήρια είναι ομοιοπολικά δεσμευμένες πάνω στα σφαιρίδια έχοντας την ικανότητα δέσμευσης της Fc περιοχής ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται μεταξύ των σφαιριδίων, των πρωτεϊνών A/G και των αντισωμάτων κατακρημνίζουν το επιθυμητό αντιγόνο, αφού συνδεθούν επιλεκτικά σε αυτό και μαζί κατακρημνίζονται και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με αυτό. Η ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους πχ. φασματοφωτομετρία μάζας, πρωτεομικές αναλύσεις, για την εύρεση του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης, για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος, καθώς και για την μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης σε μιτοχονδριακά κλάσματα, τα οποία προέκυψαν ύστερα από την κλασμάτωση κυττάρων HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, καθώς και σε ολικό εκχύλισμα των ίδιων κυττάρων. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση ήταν έναντι του GR και έναντι της PDH. Το αντίσωμα έναντι της PDH ήταν μόνιμα ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια, εμπορικά διαθέσιμο από την εταιρία Invitrogen.

Επιγραμματικά, το πρωτόκολλο περιλαμβάνει: 1) την ανάμειξη των δεσμευμένων στα σφαιρίδια A και G πρωτεϊνών με τα αντισώματα 2) την λύση των κυτταρικών εκχυλισμάτων, 3) την επώαση του κυτταρικού εκχυλίσματος με το σύμπλοκο πρωτεϊνών A/G-αντισώματος και 4) την συλλογή των κατακρημνισθέντων πρωτεϊνών.

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

Προετοιμασία αντισωμάτων

Σφαιρίδια σεφαρόζης (sepharose) που φέρουν την πρωτεΐνη A και σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνη G, αναμειγνύονται σε ίσους όγκους, ώστε ο τελικός όγκος σφαιριδίων ανά δείγμα να είναι 50 μl. Τα σφαιρίδια αποθηκεύονται σε έναν όγκο 70 % αιθανόλης. Αρχικά, η απομάκρυνση της αιθανόλης από τα σφαιρίδια πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση των σφαιριδίων για 3 min στα 2000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C. Έπειτα, ακολουθούν μια έκπλυση των σφαιριδίων με 1 ml RIPA buffer, υπό ανάδευση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία 4 °C και φυγοκέντρηση αυτών για 5 λεπτά στα 2000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C. Το στάδιο αυτό (έκπλυσης-φυγοκέντρησης) επαναλαμβάνεται δύο φορές ακόμη. Στη συνέχεια, ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για την ανοσοκατακρήμνιση, καθώς και ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών κλασμάτων πραγματοποιείται ο ισομοιρασμός των σφαιριδίων σε *n* ίσα μέρη. Επίσης, σφαιρίδια κρατώνται και για το στάδιο του pre-clearance που θα αναλυθεί παρακάτω. Τέλος, τα σφαιρίδια επώάζονται με 2 μg αντισώματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε RIPA buffer και αφήνονται για ανάδευση για 4 ώρες, σε θερμοκρασία 4 °C, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός των επιθυμητών συμπλόκων.

Προετοιμασία μιτοχονδριακού ή ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος

Η προετοιμασία του μιτοχονδριακού ή του ολικού εκχυλίσματος κυττάρων πραγματοποιείται παράλληλα με την επώαση των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια. Αρχικά, τα μιτοχονδρικά ή ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα επαναδιαλυτοποιούνται σε RIPA buffer. Σε κάθε 1 ml RIPA buffer, έχουν προστεθεί 10 μl Cocktail Protease Inhibitors (Roche), 2 μl DTT και 0,5 μl PMSF, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Έπειτα, ακολουθεί η ομογενοποίηση του μιτοχονδριακού ή κυτταρικού εκχυλίσματος με τη χρήση υπερήχων, πραγματοποιώντας 3 σετ των 10 δευτερολέπτων με μεσοδιάστημα ενός λεπτού, σε θερμοκρασία 4° C. Στη συνέχεια, PBS 1x, το οποίο περιέχει κι αυτό τις ίδιες αναλογίες αναστολέων πρωτεασών με το RIPA buffer, προστίθεται στο εκχύλισμα των κυττάρων, σε αναλογία 4:1, σε σχέση με τον όγκο του RIPA buffer. Ακολούθως, το διάλυμα που έχει προκύψει, φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στα 13000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C και το υπερκείμενο επώάζεται με σφαιρίδια, για 1 ώρα, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C. Το βήμα αυτό ονομάζεται προ-καθαρισμός (pre-clearance) και πραγματοποιείται με σκοπό την απομάκρυνση από το εκχύλισμα, πρωτεϊνών που μπορεί να δημιουργήσουν μη ειδική σύνδεση με τα αντισώματα.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας του προκαθορισμού, και εφόσον έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της επώασης των σφαιριδίων με τα αντισώματα, το μιτοχονδριακό ή κυτταρικό εκχύλισμα ισομοιράζεται σε κάθε eppendorf με διαφορετικό αντίσωμα κι αφήνεται προς επώαση για 16 ώρες υπό ανάδευση, στους 4 °C. Στη συνέχεια, μετά το πέρας των 16 ωρών, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 4 λεπτά στα 3000 rpm, σε θερμοκρασία 4 °C, για την απομάκρυνση των μη κατακρημνισθέντων συστατικών (unbound). Το ίζημα εκπλένεται 4 φορές με PBS 1x και ακολουθούν προσθήκη sample buffer 2x στα

σφαιρίδια, ανάδευση τους και θέρμανσή τους σε θερμοκρασία 95 °C για 2 λεπτά. Έπειτα, τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνονται για 2 λεπτά στα 2000 rpm, σε θερμοκρασία 20 °C και γίνεται συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο περιέχει όλη την ποσότητα των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν σε νέο erpendorf. Το βήμα με το sample buffer επαναλαμβάνεται και μετά την συλλογή του 2^{ου} υπερκείμενου, πραγματοποιείται μια τελευταία φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 2000 rpm, σε θερμοκρασία 20 °C, για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων σφαιριδίων εντός του υπερκείμενου που συλλέχθηκε.

Τέλος, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή ακρυλαμιδίου περιεκτικότητας 9% ή 10% W/V και ακολουθεί ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και χρήση ειδικών αντισωμάτων για την ανίχνευση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν.

2.10 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

2.10.1 Συλλογή, Λύση, ομογενοποίηση ευκαρυωτικών κυττάρων και Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο της Bradford

Μετά την καλλιέργεια των κυττάρων στις επιθυμητές συνθήκες, ακολουθεί η συλλογή τους σε θερμοκρασία 4° C. Πιο συγκεκριμένα, το θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλένονται και συλλέγονται σε παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x, με τη χρήση ειδικού scraper σε erpendorf των 1.5 mL. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 5 min στα 1000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C και το ίζημα των κυττάρων φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80 °C.

Λύση των κυττάρων και ομογένευσή τους με την χρήση υπερήχων

Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (Lysis Buffer), ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος, το οποίο αποτελείται από:

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

Σε ένα 1ml του διαλύματος λύσης προστίθενται 10μl Coctail Protease Inhibitors (Roche) και 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), τα οποία αναστέλουν τις πρωτεάσες σερίνης, καθώς και 1 mM DTT (διθειοθρεϊτόλη), το οποίο είναι ένας αναγωγικός παράγοντας, που εμποδίζει την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα λύσης για χρονικό διάστημα 20-25 λεπτών, στον πάγο. Ακολουθεί, περαιτέρω ομογενοποίηση των κυττάρων και κατακερματισμός του DNA με την χρήση υπερήχων (sonication). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται 4 σετ του ενός sec με μεσοδιάστημα 1 min μεταξύ των σετ, στον πάγο (4°C).

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο της Bradford

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων γίνεται με τη μέθοδο Bradford, με την χρήση του αντιδραστηρίου Bradford protein assay της Bio-Rad. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος συγκεντρώσεως από 1 µg/mL έως 1500 µg/mL. Η Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος, η οποία στηρίζεται στη χρωστική Coomassie® Brilliant Blue G-250, η οποία μπορεί να υπάρξει σε 3 μορφές, την ανιονική (μπλέ), την ουδέτερη (πράσινη) και την κατιονική (κόκκινη). Υπό όξινες συνθήκες, η χρωστική Coomassie® Brilliant Blue G-250 αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, δημιουργώντας ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής και μετατρέποντας το χρώμα της χρωστικής αυτής από κόκκινο σε μπλέ. Εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε $\lambda=595$ nm. Η μεταβολή της απορρόφησης της χρωστικής μετράται στα 595 nm και δηλώνει αύξηση της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Πειραματικά, η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1x, σε erpendorf στο οποίο έχει προστεθεί 1 µl από το υπό εξέταση δείγμα. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι, για 20min και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος με φωτομέτρηση στα 595nm. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων σε πρωτεΐνη υπολογίζονται με βάση την εξίσωση από μια πρότυπη καμπύλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA. Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων στο excel, μας δίνει την ακριβή ποσότητα της πρωτεΐνης που απαιτείται για να ηλεκτροφορηθεί.

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

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από ένα κυτταρικό εκχύλισμα πραγματοποιείται σε πηκτή ηλεκτροφόρησης. Οι πρωτεΐνες στην πηκτή διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, το ηλεκτρικό τους φορτίο, το ισοηλεκτρικό σημείο ή συνδυασμό αυτών. Ο πιο κοινός τύπος ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού είναι αυτός σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulphate, SDS).

Το SDS μετενώσει τις πρωτεΐνες, προσδίδοντας τους αρνητικό φορτίο και ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων τους. Στην προκειμένη περίπτωση ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος τους καθώς αυτές μετακινούνται, υπό την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, οι πρωτεΐνες με μεγάλο μέγεθος μετακινούνται πιο αργά εντός της πηκτής. Επιπλέον, ο διαχωρισμός της πηκτής εξαρτάται από την συγκέντρωση αυτής σε ακρυλαμίδη. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη, τόσο καλύτερη είναι η μελέτη των πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ όσο μικρότερη είναι η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη τόσο καλύτερη είναι η μελέτη των πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους.

Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδιου: Η πηκτική αποτελείται από δύο πηκτώματα: 1) το πηκτώμα επιστοιίβαξης (stacking gel) και 2) το πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel). Το πηκτώμα επιστοιίβαξης έχει ως στόχο την συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μια μικρή ζώνη, ώστε οι τελευταίες να περάσουν ταυτόχρονα στο πηκτώμα διαχωρισμού κατά την ηλεκτροφόρηση.

Το πηκτώμα επιστοιίβαξης αποτελείται από 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Το πηκτώμα διαχωρισμού (separating gel), αποτελείται από 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 10 ή 12 % (w/v) ακρυλαμίδης. Ο πολυμερισμός των πηκτών επιτυγχάνεται με την προσθήκη 1% (w/v) APS (Ammonium persulfite) και 0,04% v/v Temed (καταλύτης του πολυμερισμού).

Προετοιμασία δειγμάτων που θα ηλεκτροφορηθούν: 50 mg πρωτεΐνης από την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, η οποία μετρήθηκε στα προς εξέταση δείγματα με την μέθοδο της Bradford θα ηλεκτροφορηθούν, μετά την προσθήκη σε αυτά της κατάλληλης ποσότητας Sample Buffer 4x και Tris HCl pH 7,5, ώστε η τελική συγκέντρωση του Sample buffer στο δείγμα να είναι 1x.

Στη συνέχεια, τα δείγματα, τα οποία πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν υπόκεινται σε θέρμανση (95 °C, για 5 min) σε θερμαντική πλάκα για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και του DNA. Πιο συγκεκριμένα, το SDS κατά τον βρασμό καταργεί τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και την τριτοταγή δομή τους. Επίσης, η β-μερκαπταιθανόλη που περιέχεται στα δείγματα ανάγει τους ομοιοπολικούς δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί και αυτή με την σειρά της την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Τέλος, γίνεται χρήση και ενός ειδικού μάρτυρα μοριακών μεγεθών, ο οποίος αποτελείται από ένα μείγμα πρωτεϊνών διαφόρων γνωστών μοριακών μεγεθών.

Ηλεκτροφόρηση: Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1x, το οποίο περιέχει 0,1 % w/v SDS) υπό την παροχή σταθερής έντασης ηλεκτρικού ρεύματος 0.02 A.

2.11 Western Blot (Ανοσοαποτύπωση)

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών εντός ενός βιολογικού δείγματος, με την χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι αυτών των πρωτεϊνών. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε ολικό ή μιτοχονδριακό εκχύλισμα τόσο κυττάρων, όσο και ιστών.

2.11.1 Μεταφορά των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Κατά την ανοσοαποτύπωση, οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορήθηκαν, μεταφέρονται είτε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης είτε σε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF), εντός διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) και ύπο την εφαρμογή κάθετου σταθερού ηλεκτρικού πεδίου.

Το Transfer Buffer αποτελείται από 10% SDS (αύξηση της ικανότητας μεταφοράς των πρωτεϊνών) και μεθανόλη (αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης των πρωτεϊνών στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης). Εντός του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς, οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά και μετακινούνται προς τον θετικό πόλο.

Αρχικά, μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, πραγματοποιείται εξισορρόπηση του πηκτώματος ακρυλαμίδης εντός του διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς. Στο ίδιο διάλυμα τοποθετούνται και απορροφητικά χαρτιά Whatmann, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και δύο απορροφητικά σφουγγαράκια ίδιων διαστάσεων.

Μετά την εξισορρόπηση, ετοιμάζεται η ειδική κασέττα, στην οποία τοποθετούνται με την σειρά: ένα σφουγγαράκι, δυο χαρτιά Whatmann, η πηκτική πολυακρυλαμίδου, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, δυο ακόμη χαρτιά Whatmann και ένα σφουγγαράκι σε μια διάταξη τύπου sandwich. Η κασετίνα πρέπει να τοποθετηθεί με κατάλληλο προσανατολισμό εντός της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, με την μαύρη πλευρά της κασετίνας τοποθετημένη προς την πλευρά όπου θα εφαρμοστεί ο αρνητικός πόλος της συσκευής.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται, υπό την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 0,35 A για χρονικό διάστημα 70 min. Έπειτα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται σε διάλυμα PBST και μπορεί να πραγματοποιηθεί αποθήκευση της μεμβράνης σε θερμοκρασία -20° C.

2.11.2 Αποκλεισμός μη ειδικών θέσεων (Blocking)

Για τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων στην μεμβράνη, πραγματοποιείται επώαση αυτής σε διάλυμα 10 % αποβουτυρωμένου γάλακτος ή σε 3-5% διαλύματος αλβουμίνης βοοειδούς ορού (BSA) σε PBST ή TBST.

2.11.3 Ανίχνευση πρωτεϊνών με την χρήση αντισωμάτων

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία του Blocking, η μεμβράνη εκπλένεται με PBST ή TBST και ακολουθεί επώαση της για 16 ώρες, σε θερμοκρασία 4° C, με κατάλληλο αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης, το οποίο είναι διαλυμένο κι αυτό σε PBST ή TBST που περιέχει 2% άπαχο γάλα.

Μετά το πέρας της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται πλύσεις στην μεμβράνη, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η μη δεσμευμένη ποσότητα

αντισώματος και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με ένα δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα.

Το δευτερογενές αντίσωμα είναι χημικά προσδεμένο είτε με βιοτίνη είτε με ένα ένζυμο όπως η αλκαλική φωσφατάση ή η υπεροξειδάση ραπανίδος (horseradish peroxidase-HRP), έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή του. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα δευτερογενή αντισώματα είναι σημασμένα με HRP και η ανίχνευσή τους επιτυγχάνεται μόνο μετά την προσθήκη ενός κατάλληλου υποστρώματος (Enhanced ChemiLuminescence, ECL), η δράση του οποίου βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει σε κάθε δείγμα.

Μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται πλύσεις της μεμβράνης σε PBST ή TBST και προστίθεται στην μεμβράνη μείγμα των διαλυμάτων ECLA και ECLB σε αναλογία 1:1, για 3 min, στο σκοτάδι, R.T. Ακολούθως, στην μεμβράνη τοποθετείται ένα φύλλο φωτογραφικού φιλμ και τα << αποτυπώματα >> τα οποία δημιουργούνται πάνω σε αυτό από την αντίδραση της χημειοφωταύγειας, αντιπροσωπεύουν τον εντοπισμό των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Η εμφάνιση του σήματος στο φωτογραφικό φιλμ επιτυγχάνεται μετά την επώαση του τελευταίου για 1 min σε διάλυμα εμφάνισης (Developer), ενδιάμεση έκπλυση σε νερό, και έπειτα μονιμοποίηση του φιλμ σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 1 min. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται σε νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Χαρακτηρισμός τριτερπενοειδών ενώσεων ως εν δυνάμει SEGRA

3.1.1 Σάρωσης μιας σειράς τριτερπενοειδών ενώσεων για πιθανή επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφόρων τριτερπενοειδών ενώσεων, οι οποίες χορηγήθηκαν είτε από την εταιρία Extrasynthese είτε από τον Giovanni Appendino, καθηγητή οργανικής χημείας στο πανεπιστήμιο Βερτσέλλι της Ιταλίας, ως προς την πιθανή ικανότητά τους να προκαλούν ενεργοποίηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μέσω επαγωγής της πυρηνικής του μετατόπιση, με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοϊστοχημείας.

Τα πειράματα διεξήχθησαν σε κύτταρα HeLa, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών (DMEM-Cis). Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με τις υπό μελέτη τριτερπενοειδείς ενώσεις σε συγκέντρωση 10μM ή με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, δεξαμεθαζόνη (DEX) σε συγκέντρωση 1 μM, τα οποία ήταν διαλυμένα σε DMSO ή σε EtOH, αντίστοιχα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για δύο ώρες, σε θερμοκρασία 37°C, παρουσία 5% CO₂. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ανοσοϊστοχημείας και την παρακολούθηση μορίων ενδιαφέροντος, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, καθώς και οι φθορίζουσες χρωστικές Hoechst 33342 και CMXRos (CMX), για την χρώση του πυρήνα και των μιτοχονδρίων αντίστοιχα.

Οι κωδικές ονομασίες των ενώσεων, οι οποίες εξετάστηκαν φαίνονται στον **πίνακα 7**. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι κάποιες από τις παρακάτω ενώσεις ήταν αποτελεσματικές στο να επάγουν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, σε ποσοστό από 10-35%, σε σύγκριση με την τιμή αναφοράς (**Control**) και γι' αυτό τον λόγο εξετάστηκαν περαιτέρω. Η παρατήρηση αυτή αφορά τις ενώσεις αυτές με κωδικές ονομασίες **FR381, PCUPO4, PCUPO12, TFC₁₀38, TFC₁₀39, TFC₁₀40, TFC039, TFC040, TFC01, TFC02, TFC010, TFC011, TFC012, TFC013**. Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν προκάλεσαν την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα και γι' αυτό δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Πίνακας 7: Υπό μελέτη τριτερπενοειδείς ενώσεις. Με έντονη γραφή αναφέρονται οι ενώσεις που προκαλούσαν ενεργοποίηση της πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε ποσοστό από 10-35% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Υπό μελέτη τριτερπενοειδή φυτικής και συνθετικής προέλευσης

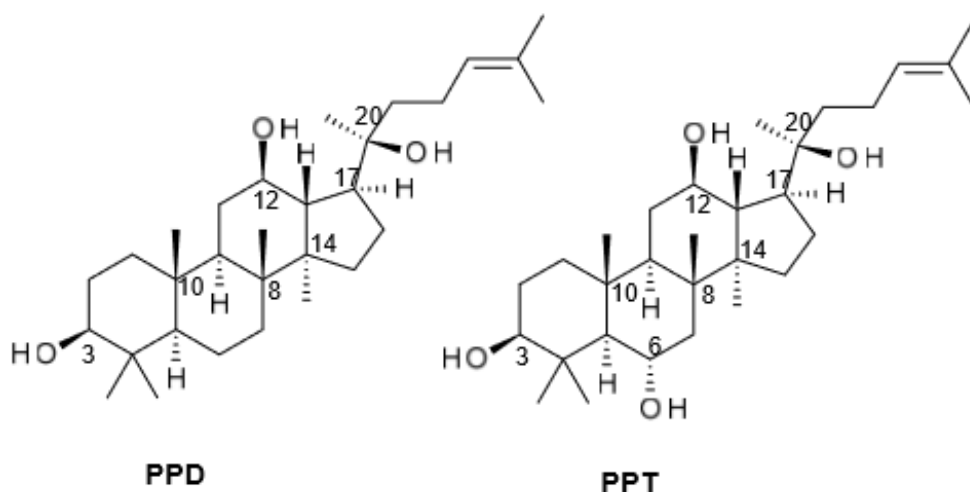
| | | |
|---------------------------|----------------------|---------|
| TFC01 | TFC31 | PCUPO7 |
| TFC02 | TFC32 | PCUPO9 |
| TFC010 | TFC ₂ 50b | PCUPO10 |
| TFC011 | TFC ₂ 50c | PCUPO13 |
| TFC012 | TFC ₂ 46G | PCUPO15 |
| TFC013 | TFC ₇₈ 1 | PCUPO16 |
| TFC039 | TFC ₇₈ 2 | PCUPO17 |
| TFC040 | TFC ₇₈ 3 | PCUPO18 |
| FR381 | TFC ₇₈ 4 | PCUPO19 |
| PCUPO4 | TFC ₇₈ 5 | PCUPO20 |
| PCUPO12 | TFC ₇₈ 6 | PCUPO21 |
| TFC₁₀38 | TFC ₇₈ 7 | PCUPO22 |
| TFC₁₀39 | TFC ₇₈ 8 | PCUPO23 |
| TFC₁₀40 | PCUPO2 | PCUPO24 |
| TFC22 | PCUPO3 | PCUPO25 |
| TFC25 | PCUPO5 | PCUPO26 |
| TFC28 | PCUPO6 | PCUPO27 |
| | | PCUPO28 |

3.1.2 Πρωτοπαναξαδιόλη (PPD) και Πρωτοπαναξατριόλη (PPT) ως εν δυνάμει SEGRA

Η πρωτοπαναξαδιόλη (Protoranaxadiol, PPD) και η πρωτοπαναξατριόλη (Protoranaxatriol, PPT), με κωδική ονομασία TFC039 και TFC040, αντίστοιχα, όπως αναφέρονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι τετρακυκλικά τριτερπένια, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των σαπωνινών (ginsenosides). Τα ginsenosides διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση και στους υποκαταστάτες των σακχάρων, αλλά και στον αριθμό των γλυκοσιδικών δεσμών. Οι PPD και PPT, δεν διαθέτουν γλυκοσιδικούς δεσμούς και ο άνθρακας στη θέση 20 (20C) διαθέτει στερεοδιαμόρφωση τύπου S [194]. Από την βιβλιογραφία έχει προταθεί ότι οι

ενώσεις αυτές πιθανόν να ασκούν τις δράσεις τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, καθώς διαθέτουν δομική ομοιότητα με τα γλυκοκορτικοειδή [195]. Επίσης, πρωταρχικές παρατηρήσεις μας, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας μου υποδείκνυαν την πιθανή εμπλοκή των PPD και PPT στην GR σηματοδότηση. Εκτενέστερη μελέτη πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρουσας διδακτορικής διατριβής. Οι PPD και PPT διαθέτουν επιπλέον, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αποπρωτικές, καθώς και καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς [194,196].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε η ικανότητα πιθανής πρόσδεσης των PPD και PPT στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, η ικανότητα ενεργοποίησης του υποδοχέα μέσω μετακίνησης του στον πυρήνα, η δυνατότητα ενεργοποίησης ή καταστολής γονιδίων στόχων του GR καθώς και η πιθανή αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών.



Εικόνα 29: Η χημική δομή των ενώσεων PPD και PPT, οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

3.1.2.1 In Silico μελέτες πρόσδεσης (Docking) των ενώσεων PPD και PPT στην περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Σε συνεργασία με τον Δρ. Joseph M Hayes (Επίκουρου καθηγητή του τμήματος Φαρμακευτικής και Βιοϊατρικών επιστημών του Πανεπιστημίου Central Lancashire), εφαρμόστηκαν πειράματα επαγόμενης πρόσδεσης (Induced-Fit Docking, IFD) για τον έλεγχο της πιθανής σύνδεσης των ενώσεων PPD και PPT στην περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (LBD) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Για να είναι

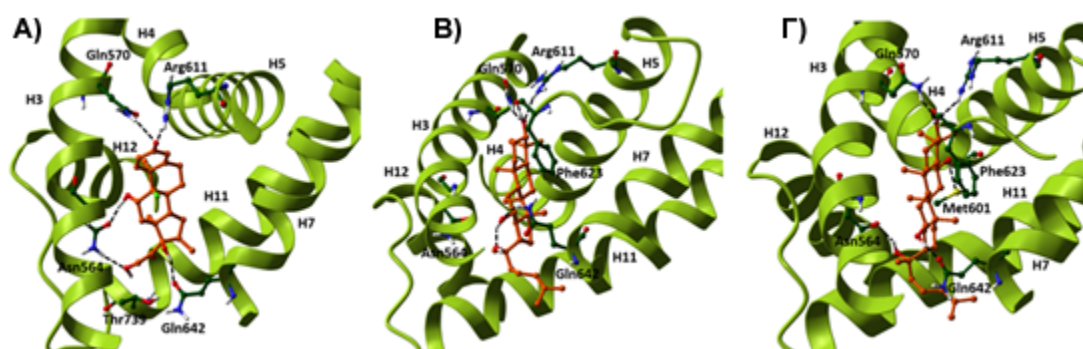
συγκρίσιμα τα αποτελέσματα, μελέτες πρόσδεσης εφαρμόστηκαν και για το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX). Τα IFD και τα Glides score τόσο για τις ενώσεις, όσο και για την DEX φαίνονται στον παρακάτω **πίνακα 8**. Τα Glides score των ενώσεων που προέκυψαν από την ανάλυση docking έχουν τιμή -15, η οποία είναι πολύ κοντά σε αυτή της DEX. Το ίδιο συμβαίνει και για τιμές IFD, οι οποίες λαμβάνουν υπόψιν και την ενέργεια διαμόρφωσης της πρωτεΐνης και μάλιστα είναι ελάχιστα καλύτερες για τις ενώσεις PPD και PPT σε σύγκριση με την DEX.

Πίνακας 8: Οι τιμές των GlideScore και των IFDScore για τις ενώσεις PPD και PPT, καθώς και για την DEX.

| Ligand | GlideScore | IFDScore |
|--------|------------|----------|
| DEX | -15.59 | -551.7 |
| PPD | -14.93 | -557.7 |
| PPT | -15.23 | -560.8 |

Από τις παραπάνω τιμές, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι PPD και PPT συνδέονται αρκετά καλά στον υποδοχέα, με την PPT να παρουσιάζει καλύτερες τιμές σύνδεσης, σε σύγκριση πάντα με την DEX. Στην **εικόνα 30** απεικονίζεται ο πιθανός τρόπος σύνδεσης των ενώσεων PPD και PPT, καθώς και της DEX, στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Όπως, διακρίνεται στην εικόνα, και οι δύο ενώσεις προσδένονται στο ίδιο σημείο με την δεξαμεθαζόνη στην LBD του GR, αλλά σε επίπεδο, όχι παράλληλο με αυτό της DEX. Οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι σχηματίζουν οι PPD και PPT διαφέρουν, τόσο μεταξύ των ενώσεων, όσο και μεταξύ της DEX. Το υδροξύλιο στον άνθρακα C-3, τόσο για την PPD όσο και για την PPT, εμφανίζει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με αυτό του C-3, της κετονομάδας της DEX, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Gln570 (H3) και Arg611 (H5). Ωστόσο, οι ενώσεις, φαίνεται να σχηματίζουν έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο του σκελετού του αμινοξέος Phe623 (Phe623 backbone O) (β έλικα μεταξύ των H5 και H6 ελικών). Το υδροξύλιο στον άνθρακα C12, τόσο για την PPD όσο και για την PPT συμμετέχει στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το αμινοξύ Gln642 στην πλευρική αλυσίδα H7. Όσον αφορά την PPT, ο δεσμός υδρογόνου είναι μεταξύ της ομάδας C=O και της προαναφερθείσας πλευρικής αλυσίδας, παρόμοιος με αυτόν που σχηματίζει η DEX με το υδροξύλιο του άνθρακα C-17. Ωστόσο, για την PPD, υπάρχει μια αναστροφή της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος Gln642, έτσι δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της ομάδας NH₂ του υδροξυλίου και του οξυγόνου του υδροξυλίου του άνθρακα C-12 (C-12 hydroxyl O atom). Το γεγονός αυτό απελευθερώνει το οξυγόνο του υδροξυλίου του άνθρακα C-12 για να σχηματίσει έναν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το υδροξύλιο του άνθρακα C-20 αλλά επίσης βοηθά τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το καρβονύλιο της πλευρικής αλυσίδας του Asn564 (H3), μειώνοντας την απόσταση μεταξύ τους (αλληλεπίδραση που παρουσιάζεται και στο σύμπλοκο GR-DEX μεταξύ του υδροξυλίου και του άνθρακα C-11). Για την ουσία PPT, αυτή η αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου με την ομάδα C = O του αμινοξέος Asn56 πραγματοποιείται μέσω της υδροξυλομάδας στον άνθρακα C-20. Ωστόσο το υδροξύλιο στον άνθρακα C-20 της PPD δεν εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου. Τέλος, το

υδροξύλιο του άνθρακα C-6 της PPT, το οποίο απουσιάζει για την PPD, σχηματίζει ασθενή δεσμό υδρογόνου με το άτομο S της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος Met601 (H5). Η ομάδα $-CH_2CH_2CH_3$ (CH₃) 2 τόσο της PPD όσο και της PPT προσανατολίζεται μεταξύ των ελίκων H7 και H11, αλλά δεν έχει καλή επαφή μεταξύ τους. Ωστόσο, η διαμόρφωση της έλικας H3, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την πυρηνική μετατόπιση του GR, δεν μεταβάλλεται μετά την πρόσδεση καμίας από τις δύο ενώσεις, ενώ παραμένει ίδια με αυτή της DEX. Επιπροσθέτως, έχουν δημιουργηθεί νέοι δεσμοί υδρογόνου στα κατάλοιπα Arg611 και Gln642 των ελίκων H5 και H7, αντίστοιχα. Τέλος, όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, το RU486 (mifepristone), το οποίο είναι ανταγωνιστής του GR συνδέεται με διαφορετικό τρόπο στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, όπως συμβαίνει και με τις ενώσεις PPD και PPT, χωρίς όμως και αυτό να επηρεάζει την ικανότητα μετακίνησης του υποδοχέα στον πυρήνα. Αυτό συμβαίνει διότι ότι η διαμόρφωση των ελίκων H3 και H4 φαίνεται να είναι σημαντικότερη από αυτή της H12, για την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα [197].

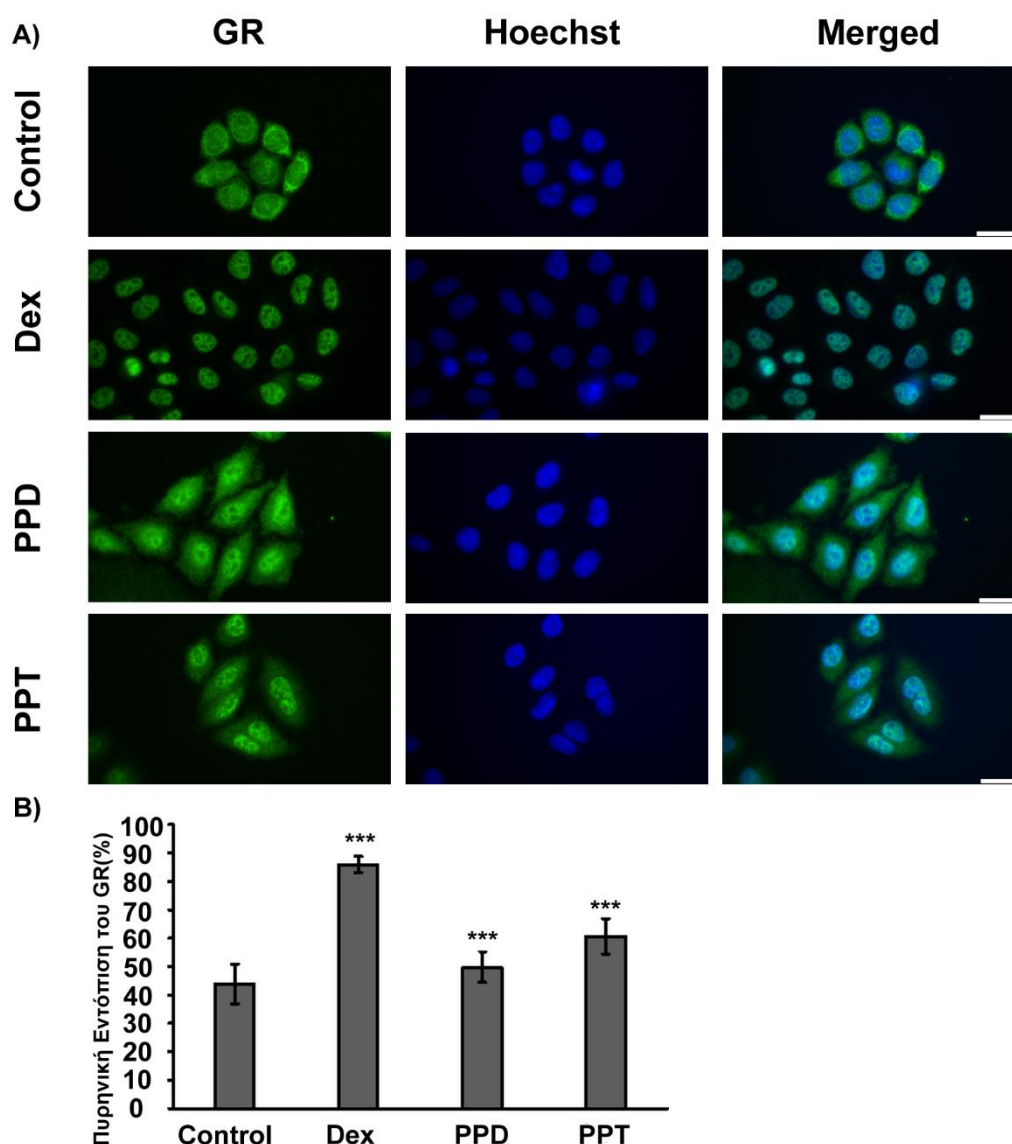


Εικόνα 30: **A)** Δομική απεικόνιση της σύνδεσης της DEX στην LBD περιοχή του GR, όπως αυτή δίνεται στην βάση δεδομένων PDB. Πιθανός τρόπος σύνδεσης **B)** της PPD και **Γ)** της PPT στον GR που προκύπτει από την ανάλυση πρόσδεσης (docking). Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, ενώ με πορτοκαλί χρώμα, ο προσδέτης.

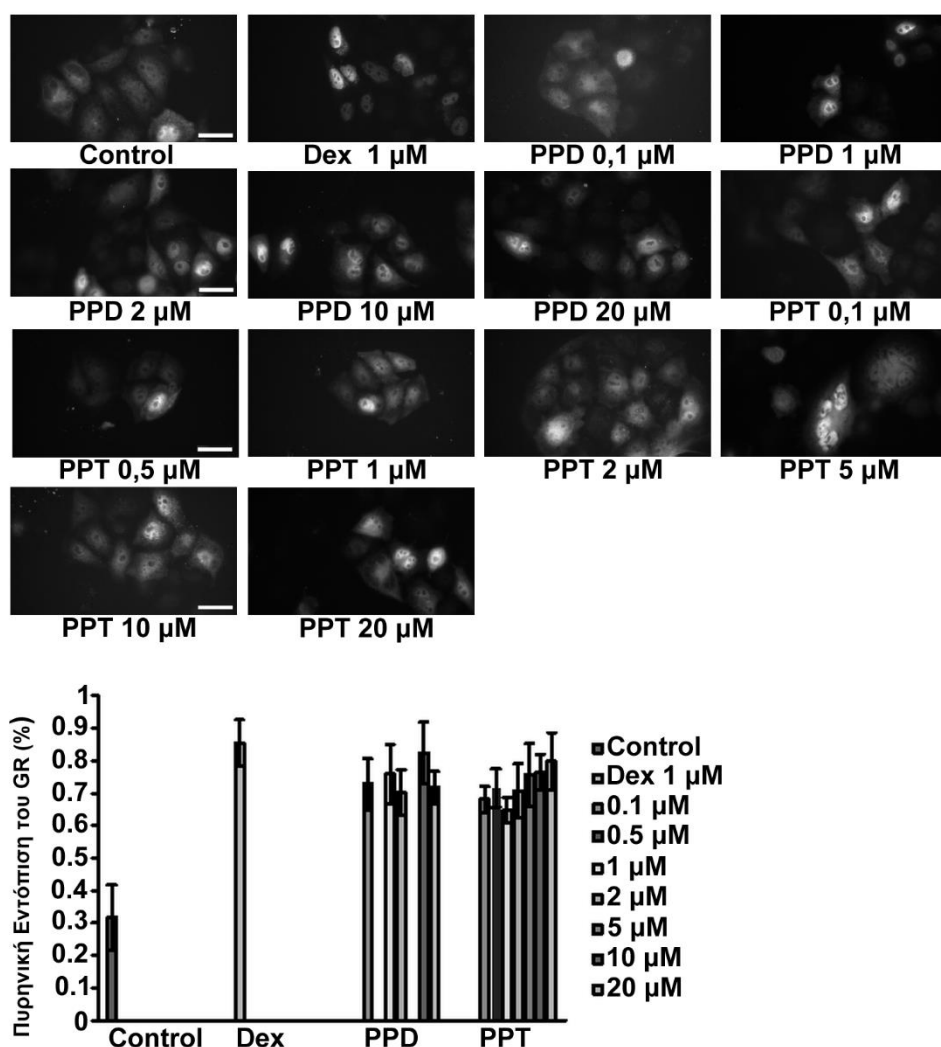
3.1.2.2 Επαγωγή πυρηνικής μετατόπισης του GR από τις PPD και PPT

Οι PPD και PPT έχουν την ικανότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του GR, όπως φαίνεται στην **εικόνα 31**, κατά την εφαρμογή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HeLa, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό, το οποίο δεν περιείχε στεροειδείς ορμόνες. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 1μM DEX ή με 10 μM από τις PPD και PPT για 2 ώρες και ακολούθησε η διαδικασία του ανοσοφθορισμού με την χρήση των φθορίζουσων χρωστικών Hoechst και CMX, για την χρώση του πυρήνα και των μιτοχονδρίων αντίστοιχα, καθώς και αντισώματος έναντι του GR. Από την ποσοτικοποίηση του ανοσοφθορισμού προέκυψε ότι η PPD προκαλεί αύξηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR σε ποσοστό περίπου 10%, ενώ η PPT σε

ποσοστό περίπου 20%, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (control), ενώ παρουσία DEX, η πυρηνική μετατόπιση του GR αυξάνεται κατά 45%. Για να ελεγχθεί εάν η πυρηνική μετατόπιση που προκαλείται από τις ενώσεις είναι δόσοεξαρτώμενη, κύτταρα τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο rEGFPC2GR [65] και στη συνέχεια επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις των ενώσεων PPD και PPT, οι οποίες κυμαίνονται από 0.1 μ M έως 20 μ M (**Εικόνα 32**). Ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων και παρατήρησή τους με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού. Ανάλυση των αποτελεσμάτων με χρήση λογισμικού Image J έδειξε ότι συγκεντρώσεις των ενώσεων μεγαλύτερες από 0.1 μ M έχουν την δυνατότητα να επάγουν πυρηνική μετατόπιση του GR. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έδειξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR, όταν τα κύτταρα επωάζονται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις από την ουσία PPT.



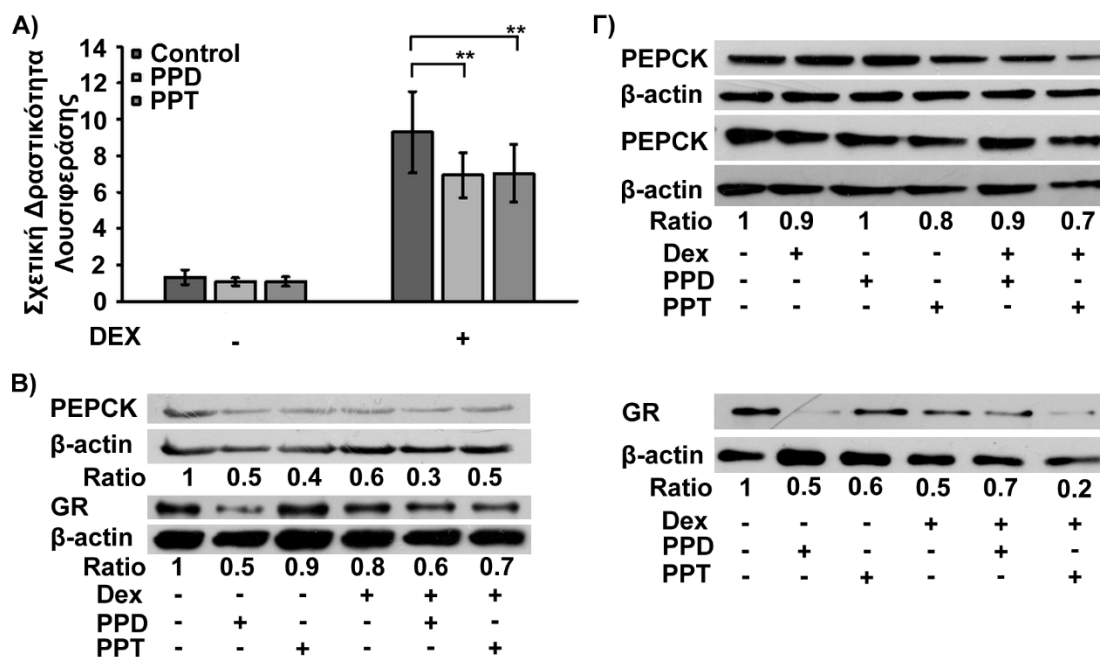
Εικόνα 31: Επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR από τις PPD και PPT. **A)** Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες, απουσία στεροειδών ορμονών και επώαστηκαν για 2 ώρες, με 10 μM από τις ενώσεις PPD και PPT ή 1 μM από την DEX. Τα κύτταρα μάρτυρες (Control) επώαστηκαν με DMSO (Dimethyl Sulfoxide) και EtOH, στα οποία είναι διαλυμένες οι ενώσεις και η DEX αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (Phosphate-Buffered Saline), μονιμοποιήθηκαν με την χρήση μεθανόλης-ακετόνης και ακολούθησε ανοσοϊστοχημεία με την χρήση των αντισωμάτων GR-H300 (αντίσωμα έναντι του GR, Santa Cruz) και του δεύτερου αντισώματος anti-rabbit Alexa Fluor®488 (πράσινο), καθώς και των χρωστικών Hoechst (μπλε) και CMX (κόκκινο). Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 30 μm . **B)** Ποσοτικοποίηση του ανοσοφθορισμού. Το ποσοστό της πυρηνικής εντόπισης του GR για κάθε συνθήκη προκύπτει ως ο λόγος του φθορισμού του GR στον πυρήνα ως προς τον φθορισμό του GR σε όλο το κύτταρο. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα κύτταρα μάρτυρες και εκφάζονται ως ο μέσος όρος \pm S.D. ($n > 20$), *** $p < 0.001$.



Εικόνα 32: Α) Δοσοεξαρτώμενη πυρηνική μετατόπιση του GR που επάγεται από τις ενώσεις PPD και PPT. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν, για 72 ώρες, σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pEGFPC2GR [65]. Μετά από μια μέρα, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις των ενώσεων PPD και PPT, οι οποίες κυμαίνονται από 0.1 μM έως 20 μM ή με DEX 1μM. Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (Phosphate-Buffered Saline) και μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη. Τέλος, ακολούθησε ο έλεγχος τους με μικροσκόπιο φθορισμού. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 30 μm. **Β)** Ποσοτικοποίηση της επαγόμενης από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων PPD και PPT, καθώς και της DEX πυρηνικής μετατόπισης του GR. Παρατηρείται μια στατιστικά σημαντική επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR, τόσο παρουσία των ενώσεων, όσο και της DEX, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα κύτταρα μάρτυρες και εκφάζονται ως ο μέσος όρος \pm S.D. ($n > 10$), *** $p < 0.001$.

3.1.2.3 Καταστολή της από DEX επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τις ενώσεις PPD και PPT

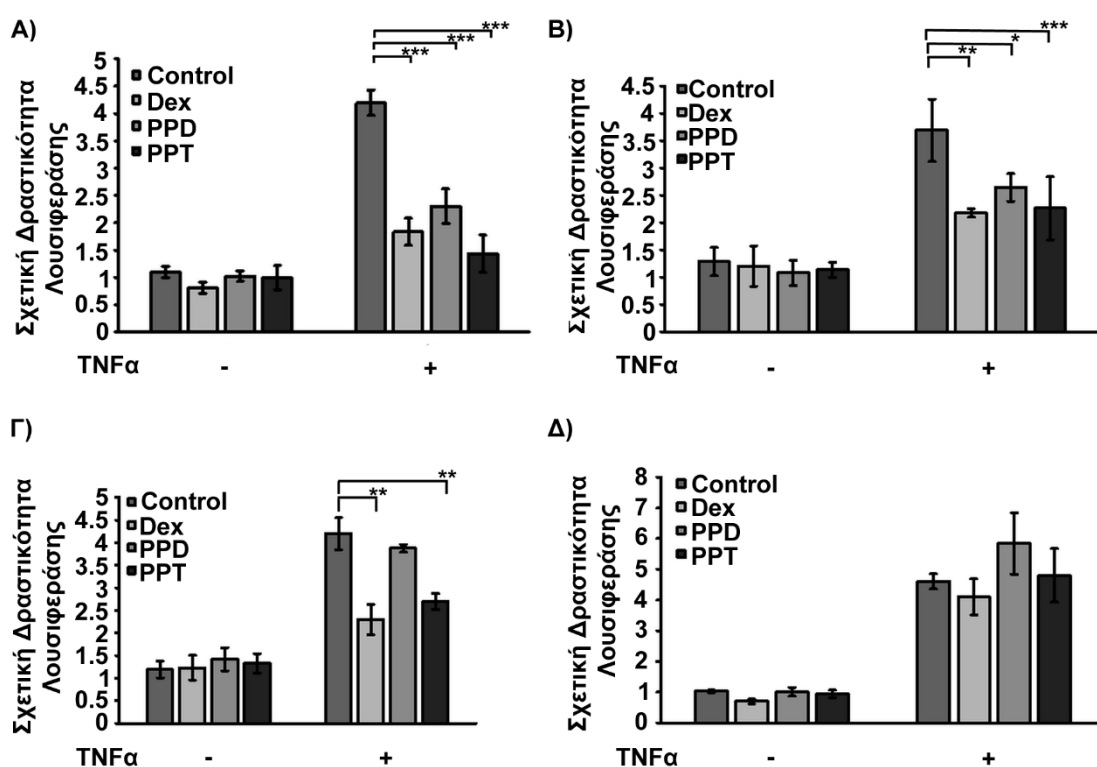
Για τον έλεγχο της επίδρασης των ενώσεων PPD και PPT στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR πραγματοποιήθηκε δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης. Κατά την δοκιμασία αυτή, HeLa κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pMMTV-GRE-Luc που φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο υποκινητή με στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή και ένα πλασμίδιο αναφοράς που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 μM από τις ενώσεις, παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 0.1 μM. Η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, κατά 4-5 φορές σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπως και αναμενόταν (**Εικόνα 33Α**). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι οι ενώσεις PPD και PPT, παρουσία δεξαμεθαζόνης, προκαλούσαν μείωση της από DEX-επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR σε ένα ποσοστό της τάξεως του 20%. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων ελέγχθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), ενός γονιδίου στόχου του GR, τόσο σε κύτταρα HeLa (**Εικόνα 33Β: Επίπεδα του GR: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία μου**) όσο και σε κύτταρα HepG2, τα οποία επώαστηκαν με 10 μM από τις ενώσεις, παρουσία ή απουσία DEX, σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών. Και στις 2 περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK (στα HepG2 μικρότερη, περίπου 20-30%), η οποία όμως πιθανότατα να οφείλεται στην από τις ενώσεις επαγόμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, και όχι σε πιθανή ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ενώσεων και της DEX.



Εικόνα 33: Οι PPD και PPT δεν επάγουν την μεταγραφική δραστηριότητα του GR. **A)** Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών και έπειτα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με 10 μM από τις PPD και PPT, παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 0.1 μM. Τα κύτταρα μάρτυρες επωάστηκαν με DMSO και EtOH, σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές που περιέχονται στις ενώσεις και στην DEX αντίστοιχα. Η επαγόμενη δραστηριότητα της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκε ως προς την αντίστοιχη δραστηριότητα της γαλακτοσιδάσης και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με τη δραστηριότητα λουσιφεράσης στα κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο \pm S.D., (n=3), ** p< 0.01. **B,Γ)** Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), GR και β-ακτίνης, όπως προέκυψαν από δοκιμασία Western Blot. Κύτταρα HeLa (**B**) και HepG2 (**Γ**) καλλιεργήθηκαν απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες και ακολούθησε η προσθήκη 10 μM από τις ενώσεις ή και 1 μM από την DEX. Αφού εφαρμόστηκε η δοκιμασία Western Blot, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αντισώματα έναντι των παραπάνω υπό μελέτη μορίων, για την ανίχνευσή τους. Οι τιμές (Ratio) προέκυψαν μετά από την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων GR και PEPCK, με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης κάθε συνθήκης και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σχέση με αυτές των κυττάρων αναφοράς. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του GR στα κύτταρα HeLa και HepG2, προέκυψαν από 2 ανεξάρτητα πειράματα.

3.1.2.4 Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τις ενώσεις PPD και PPT

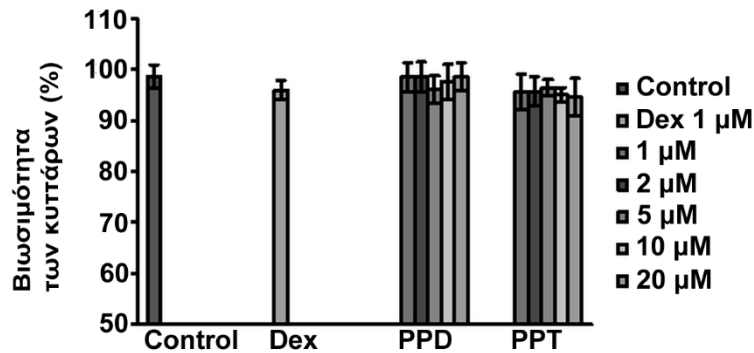
Ο έλεγχος της επίδρασης των ενώσεων PPD και PPT στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ και συνεπώς η πιθανή αντιφλεγμονώδης δράση των ενώσεων αυτών, ελέγχθηκε μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα κύτταρα HeLa (**Εικόνα 34A,B**), και HEK293 (**Εικόνα 34Γ**), τα οποία εκφράζουν υψηλά και μέτρια επίπεδα του GR, αντίστοιχα, και κύτταρα COS-7 (**Εικόνα 34Δ**: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία μου), τα οποία εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα του GR, τέθηκαν σε καλλιέργεια παρουσία θρεπτικού μέσου, ελεύθερου από στεροειδείς ορμόνες, για 24 ώρες και ακολούθησε διαμόλυνση τους με τους πλασμιδιακούς φορείς PMMTV-NF-κΒ-Luc και pSV40-β-Gal. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν με 1 μΜ (**Εικόνα 34A**) ή 10 μΜ (**Εικόνα 34B,Γ,Δ**) PPD ή PPT ή παρουσία 1 μΜ DEX, παρουσία ή απουσία 10 ng/ml TNF-α (Tumor Necrosis Factor α). Τα κύτταρα μάρτυρες επώαστηκαν με DMSO, EtOH και ddH₂O, στο οποίο είναι διαλυμένος ο TNF-α, σε ανάλογες συγκεντρώσεις. Στα κύτταρα HeLa (**Εικόνα 34A,B**), HEK293 (**Εικόνα 34Γ**) παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, παρουσία δεξαμεθαζόνης, της τάξεως του 40 με 50%. Αντίστοιχη μείωση φαίνεται και παρουσία των ενώσεων PPD και PPT. Συγκεκριμένα, παρουσία PPD παρατηρείται μείωση της τάξεως του 29-46%, ενώ παρουσία PPT παρατηρείται μείωση της τάξεως του 39-66%. Επίσης, από τα παρακάτω διαγράμματα συμπεραίνουμε ότι η μείωση είναι ανεξάρτητη από την συγκέντρωση της ουσίας που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση (1 ή 10 μΜ). Τέλος, όσον αφορά, τη δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης που πραγματοποιήθηκε στα COS-7 κύτταρα, τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα GR (**Εικόνα 34Δ**), παρουσία των ενώσεων δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενώσεις PPD και PPT, ασκούν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ενεργοποίησης των ανοσοκατασταλτικών δράσεων του GR.



Εικόνα 34: Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τις ενώσεις PPD και PPT μέσω ενεργοποίησης των ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων του GR. Δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης εφαρμόστηκε σε κύτταρα HeLa (**A,B**), τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε στεροειδείς ορμόνες. Τα κύτταρα αυτά διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια PMMTV-NF-κΒ-Luc και pSV40-β-Gal και στη συνέχεια επώαστηκαν με ή χωρίς TNF-α, Cτελ: 10 nM και με 1 μM DEX ή 1 μM (**A**) ή 10 μM (**B**) PPD και PPT. Τα επίπεδα της δραστηριότητας της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Ομοίως δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα HEK293 (**Γ**) και σε κύτταρα COS-7 (**Δ**) (τα οποία εκφράζουν χαμηλά επίπεδα του GR), παρουσία 10 μM PPD και PPT. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με αυτήν σε κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο +-S.D.(n=3-5), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

3.1.2.5 Έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των ενώσεων PPD και PPT (Sulphorodamine B assay, SRB)

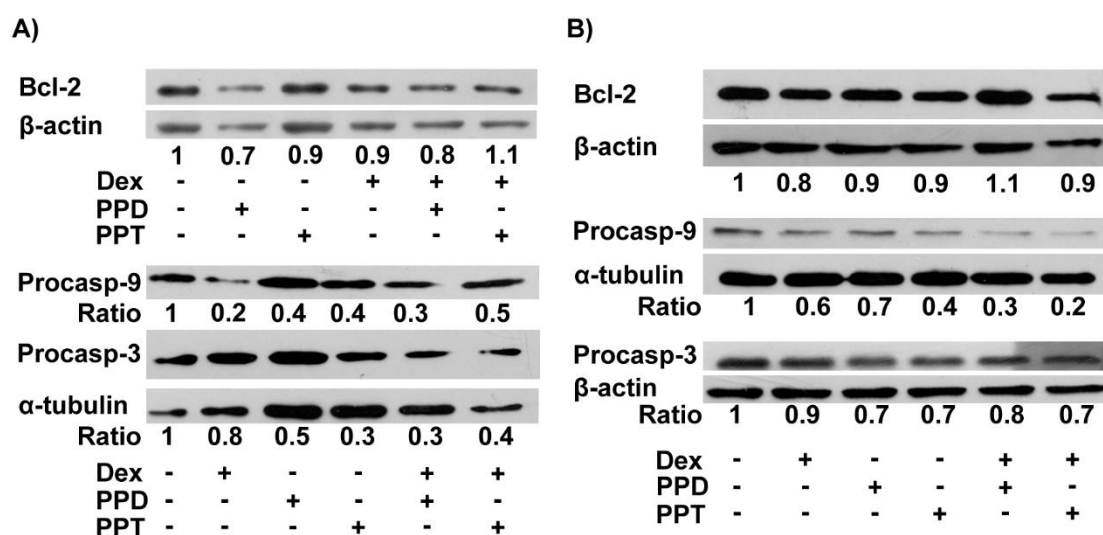
Για τον έλεγχο της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των ενώσεων PPD και PPT εφαρμόστηκε η μέθοδος της σουλφοροδαμίνης B (SRB). HeLa κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96 θέσεων (96 well plate) με αρχική πυκνότητα 10.000 κύτταρα/well. Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων πραγματοποιήθηκε προσθήκη ανά τριπλέτες, αυξανόμενων συγκεντρώσεων των ενώσεων PPD και PPT, που κυμαίνονταν από 1-20 μM, καθώς και 1 μM DEX, σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 5% FBS και 2% L γλουταμίνη. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως control επώαστηκαν με DMSO (1/1000) και EtOH (1/1000). Μετά το πέρας 2 ημερών, οι ενώσεις αφαιρέθηκαν και στα κύτταρα προστέθηκε 10% TCA (Τριχλωροξικό οξύ, Trichloroacetic Acid), για 1 ώρα, σε θερμοκρασία 4° C. Ακολουθούν 4 πλύσεις με ddH₂O και προσθήκη 4% SRB, η οποία είναι διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ. Η επώαση με την SRB πραγματοποιείται για 30 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται 4 φορές με 1% οξικό οξύ και αφήνονται να στεγνώσουν. Τέλος, προστίθεται 10 mM Tris-Base, το οποίο καθιστά διαλυτή την χρωστική SRB και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C, για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, το τρυβλίο αναδεύεται και προσδιορίζεται η απορρόφηση ανά βοθρίο (διακεκριμένη θέση) στα 540 nm, με χρήση φασματοφωτόμετρου της εταιρείας BIO TEK Instruments. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 35**, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων που επώαστηκαν με τις ενώσεις PPD και PPT.



Εικόνα 35: Επίδραση των ενώσεων PPD και PPT στη βιωσιμότητα κυττάρων HeLa με εφαρμογή της μεθόδου SRB. Η βιωσιμότητα των κυττάρων αναφοράς ορίζεται ως 100 % και η αντίστοιχη βιωσιμότητα των κυττάρων ανά συνθήκη εκφράζεται ως % αυτής. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο \pm S.D. ($n > 3$). Όπως φαίνεται και στην εικόνα, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων που επώαστηκαν με τις ενώσεις PPD και PPT.

3.1.2.6 Επαγωγή μιτοχονδριακά-επαγόμενης απόπτωσης από τις ενώσεις PPD και PPT

Για τη διερεύνηση του κατά πόσο οι ενώσεις PPD και PPT ασκούν αποπτωτική δράση, εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα διαφόρων αποπτωτικών μορίων π.χ προκασπάση-9 και προκασπάση-3, αλλά και κάποιων αντιαποπτωτικών μορίων π.χ Bcl-2, τόσο σε κύτταρα HeLa (**Εικόνα 36A: *procasp-9***: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Κωνσταντίνου Μαρίας) όσο και σε κύτταρα HepG2 (**Εικόνα 36B: *Bcl-2* και *procasp-9***: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της φοιτήτριας Κωνσταντίνου Μαρίας). Επίσης, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα β-ακτίνης ή α-τουμπουλίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Και οι δύο κυτταρικές σειρές επώαστηκαν με τις ενώσεις σε συγκέντρωση 10 μM ή με 1 μM DEX, για 48 ώρες. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 36**, παρουσία των ενώσεων και απουσία ή παρουσία DEX, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μεταβολή, τόσο στα κύτταρα HeLa όσο και στα HepG2. Επιπλέον, και στις 2 κυτταρικές σειρές παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ανενεργών κασπασών προκασπάση-9 και προκασπάση-3, τόσο παρουσία των ενώσεων, όσο και κατά την συγχορήγηση των ενώσεων με την DEX. Συμπερασματικά, οι ενώσεις PPD και PPT έχουν την ικανότητα επαγωγής μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης.



Εικόνα 36: Επαγωγή μιτοχondριακά επαγόμενης απόπτωσης από τις ενώσεις PPD και PPT. Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Western blot, για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων προκασπάση-3, προκασπάση-9, Bcl-2, β ακτίνης και τουμπουλίνης τόσο σε κύτταρα (A) HeLa όσο και σε (B) κύτταρα HepG2, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών, παρουσία των PPD και PPT σε συγκέντρωση 10 μΜ, παρουσία ή απουσία 1 μΜ DEX, για 48 ώρες. Εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα έναντι των παραπάνω μορίων χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευσή τους. Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό μελέτη μορίων προσδιορίστηκε με χρήση προγράμματος Image J. Οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων ενδιαφέροντος εκφράζονται μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τις αντίστοιχες μεταβολές των επιπέδων β-ακτίνης ή α-τουμπουλίνης. Οι τιμές (ratio) αναπαριστούν την σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη μορίου σε σχέση με αυτήν στις συνθήκες αναφοράς (control).

3.1.3. Μποσγουελλικά οξέα και παράγωγα τους (Boswellic Acid: KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA, β-ABA) ως εν δυνάμει SEGRA

Τα μποσγουελλικά οξέα (boswellic acid) κατηγοριοποιούνται στα πεντακυκλικά τριτερπένια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, (*παραγραφος 1.5.3*) τα μποσγουελλικά οξέα και τα παράγωγα τους, όμοια με τα γλυκοκορτικοειδή, παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητες και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς [190]. Επίσης, πρωταρχικές μελέτες πρόσδεσης υποδεικνύουν τη δυνατότητα σύνδεσης ορισμένων παραγώγων μποσγουελλικού οξέος, όπως το 11-κετο β-μποσγουελλικό οξύ, το 3-O-Ακέτυλο-11 κετο β-μποσγουελλικό οξύ και το α-μποσγουελλικό οξύ, στην LBD περιοχή του GR [198]. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε εκτενής βιοχημική μελέτη της δυνατότητας επιλεκτικής ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από μποσγουελλικά οξέα και παράγωγά τους. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα των παραπάνω ενώσεων να ενεργοποιούν την πυρηνική μετακίνηση του

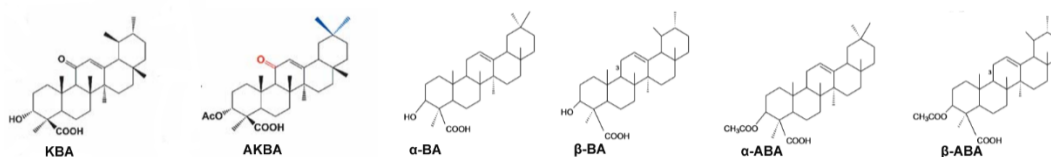
υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, η δυνατότητα επιλεκτικής ενεργοποίησης ανοσοκατασταλτικής δράσης του GR, η δυνατότητα τους να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη GR σηματοδότηση, καθώς και η πιθανή δράση τους στην επαγωγή της απόπτωσης.

Τα παράγωγα του μποσγουελλικού οξέος που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή φαίνονται στον **Πίνακα 9**.

Πίνακας 9: Παράγωγα των μποσγουελλικών οξέων που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και οι συντομογραφίες τους.

Παράγωγα μποσγουελλικού οξέος (Boswellic Acid) **Κωδικό όνομα: Συντομογραφία όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία**

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 11-κετο β-μποσγουελλικό οξύ (11-keto beta Boswellic acid) | TFC01: KBA |
| 3-O-Ακέτυλο-11-κετο β-μποσγουελλικό οξύ (3-O-Acetyl-11-ketobeta Boswellic acid) | TFC02: AKBA |
| α-μποσγουελλικό οξύ (Boswellic Acid alpha) | TFC010: α-BA |
| β-μποσγουελλικό οξύ (Boswellic Acid beta) | TFC011: β-BA |
| Ακέτυλο α-μποσγουελλικό οξύ (Acetyl alpha-boswellic acid) | TFC012: α-ABA |
| Ακέτυλο β-μποσγουελλικό οξύ (Acetyl beta-boswellic acid) | TFC013: β-ABA |



Εικόνα 37: Η χημική δομή ορισμένων παραγώγων του μποσγουελλικού οξέος.

3.1.3.1 In Silico μελέτες πρόσδεσης (Docking) των παραγώγων του Μποσγουελλικού οξέος στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του Επίκουρου Καθηγητή Βιοφυσικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Γεώργιου Παπαδόπουλου, πραγματοποιήθηκαν in Silico μελέτες επαγόμενης πρόσδεσης, για τον έλεγχο της πιθανής πρόσδεσης των παραγώγων του μποσγουελλικού οξέος (ΚΒΑ, ΑΚΒΑ, α-ΒΑ, β-ΒΑ, α-ΑΒΑ, β-ΑΒΑ) στην περιοχή πρόσδεσης συνδέτη (Ligand Binding Domain, LBD) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

- ***Docking του ΑΚΒΑ στη θέση πρόσδεσης της δεξαμεθαζόνης στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών***

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες εύκαμπτης πρόσδεσης για το παράγωγο του μποσγουελλικού οξέος ΑΚΒΑ. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AutoDock vina [199] για τον έλεγχο της πιθανής πρόσδεσης του ΑΚΒΑ, στη θέση όπου προσδέεται η δεξαμεθαζόνη στον GR. Το Docking πραγματοποιήθηκε με βάση τη δομή της περιοχής πρόσδεσης προσδέτη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, στην οποία είναι προσδεμένη η DEX, όπως προκύπτει από κρυσταλλογραφικά δεδομένα (PDB: 1P93). Οι 3D δομές των παραγώγων του “μποσγουελλικού οξέος” σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος ArgusLab 4.01 [200]. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το ΑΚΒΑ είναι ένα ογκώδες μόριο, δεν ήταν δυνατή η σύνδεση του στη θέση όπου προσδέεται η DEX στον GR. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στη δομή 1P93, ώστε να προκύψουν πιο <<ανοιχτές>> διαμορφώσεις της συγκεκριμένης δομής, σε θερμοκρασία 300K. Καταρχάς, πριν από την προετοιμασία του κελιού προσομοίωσης, σχεδιάστηκε με τη δημιουργία των προσομοιώσεων, με τη βοήθεια του προγράμματος SpdbViewer [201] και ενσωματώθηκε στη δομή 1P93 η δομή της αλληλουχίας Glu705-Gly706-Asn707, η οποία απουσίαζε. Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής έγιναν με αρχεία τοπολογίας και παραμέτρους του force field Charmm27 για πρωτεΐνες. Προς τούτο δημιουργήθηκαν τα αρχεία pdb και psf για την πρωτεΐνη και ακολούθως προστέθηκαν 12.939 μόρια νερού του μοντέλου TIP3 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα VMD [202]. Προκειμένου να ακολουθήσουν προσομοιώσεις σε περιοδικές οριακές συνθήκες και ηλεκτροστατικοί υπολογισμοί με το μοντέλο PME, έπρεπε να προστεθούν 41 ιόντα Na⁺ και 37 Cl⁻ για να προκύψει ένα ηλεκτρικά ουδέτερο σύστημα και συγκέντρωση άλατος 0.15 mol/L. Ακολούθησε ελαχιστοποίηση της ενέργειας και μετά προσομοίωση NPT, κατά την οποία ρυθμίστηκαν οι συνθήκες της πίεσης και της θερμοκρασίας σε 1 Atm και 300 K, αντίστοιχα. Συνέπεια όλων αυτών ήταν η σταθεροποίηση των διαστάσεων του κελιού της προσομοίωσης σε 75.385Å × 87.284Å × 67.956Å. Το πρόγραμμα NAMD [203], χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση όλων των προσομοιώσεων. Την προσομοίωση σε NPT ακολούθησε η προσομοίωση NVT για 30 ns, στα 300 K και στη συνέχεια ακολούθησε NPT προσομοίωση, οδηγώντας (υπό σταθερό όγκο και θερμοκρασία) σε 30000 διαφορετικές διαμορφώσεις της περιοχής πρόσδεσης προσδέτη του GR. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες πρόσδεσης για το ΑΚΒΑ στις 10000 από τις

30000 διαφορετικές διαμορφώσεις της περιοχής πρόσδεσης του GR, αλλά δεν κατέστη δυνατή η σύνδεση του σε καμία από αυτές.

Λόγω του προηγούμενου αρνητικού αποτελέσματος ακολούθησαν προσπάθειες επαγόμενης πρόσδεσης στη περιοχή πρόσδεσης της δεακυλκορτιβαζόλης (DAC) στην LBD περιοχή του GR (PDB: 3BQD), καθώς το μόριο αυτό διαθέτει μια ομάδα φαινυλπυραζολίου, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους της περιοχής πρόσδεσης στον GR [204].

- **Docking των KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA, β -ABA στη θέση πρόσδεσης της δεακυλκορτιβαζόλης στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών**

Το πρόγραμμα AutoDock vina χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη μελετών εύκαμπτης (με άκαμπτο σκελετό) πρόσδεσης των KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA, β -ABA στη θέση όπου προσδέεται η DAC στην LBD του GR. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν με βάση τη δομή της περιοχής πρόσδεσης προσδέτη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, στην οποία είναι προσδεμένη η DAC, όπως προκύπτει από κρυσταλλογραφικά δεδομένα (PDB: 3BQD). Ωστόσο, επειδή η δομή αυτή περιείχε μια μετάλλαξη (Phe602Ser) κοντά στην περιοχή πρόσδεσης, πραγματοποιήθηκε αλλαγή του αμινοξέος Ser, στο αρχικό αμινοξύ Phe. Το πρόγραμμα Vina κατατάσσει τις διατάξεις του προσδέτη στον θύλακα πρόσδεσης, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας docking, με βάση ένα μέτρο της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης. Στην **εικόνα 38** παρουσιάζονται μόνο οι καλύτερες (χαμηλότερου ΔG) διατάξεις πρόσδεσης των παραγώγων των μποςγουελλικών οξέων στη θέση πρόσδεσης του GR.

Όλα τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA, β -ABA έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στη θέση όπου προσδέεται η DAC στον GR. Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης των παραγώγων του μποςγουελλικού οξέος είναι κοντά σε αυτή της DAC (-14.5 kcal/mol) και κυμαίνεται μεταξύ -10.7 και -13.8 kcal/mol. Ο προσανατολισμός με τον οποίο συνδέονται τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος στον GR <<ακολουθεί>> τον προσανατολισμό των πολικών και μη πολικών αμινοξέων του θύλακα σύνδεσης. Πιο συγκεκριμένα, οι πολικές ομάδες (καρβοξύλιο, υδροξύλιο, κετονομάδα) των παραγώγων του μποςγουελλικού οξέος είναι συγκεντρωμένες στο ένα άκρο του ικρίωματος δακτυλίων. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι τα παράγωγα KBA και AKBA διαθέτουν μια κετονομάδα στον άνθρακα C-11, όμοια με την κορτιζόνη. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η ικανότητα ενεργοποίησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από τα κορτικοειδή αλλά και από τα τριτερπενοειδή [191] έγκειται στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ του αμινοξέος N564 της έλικας 2 και της υδροξυλομάδας του άνθρακα C-11 (ή C-12, στην περίπτωση των PPD και PPT, που εξετάστηκαν παραπάνω) αλλά και μεταξύ του αμινοξέος Q642 και της υδροξυλομάδας του άνθρακα C-3. Οι ίδιοι δεσμοί υδρογόνου φαίνεται ότι παίζουν ρόλο και στην περίπτωση ενεργοποίησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα αμινοξέα R611 στην 4η έλικα και Q570 στην 2^η έλικα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την κετονομάδα του άνθρακα C3 και του αζώτου της πυραζόλης, στη δεξαμεθαζόνη και στην DAC αντίστοιχα, πράγμα το οποίο δεν συμβαίνει στη περίπτωση των

παραγώγων του μπισγουελλικού οξέος, με εξαίρεση το παράγωγο α -ABA. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η έλικα 11 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς η διαμόρφωση της καθορίζει εάν ένα μόριο μπορεί να δράσει ως συνενεργοποιητής ή συγκαταστολέας του GR [205]. Ωστόσο, επειδή στην παρούσα εργασία, οι μελέτες πρόσδεσης δεν επιτρέπουν την ευελιξία του σκελετού του GR, δεν είναι δυνατή η αλλαγή της διαμόρφωσης της συγκεκριμένης έλικας.

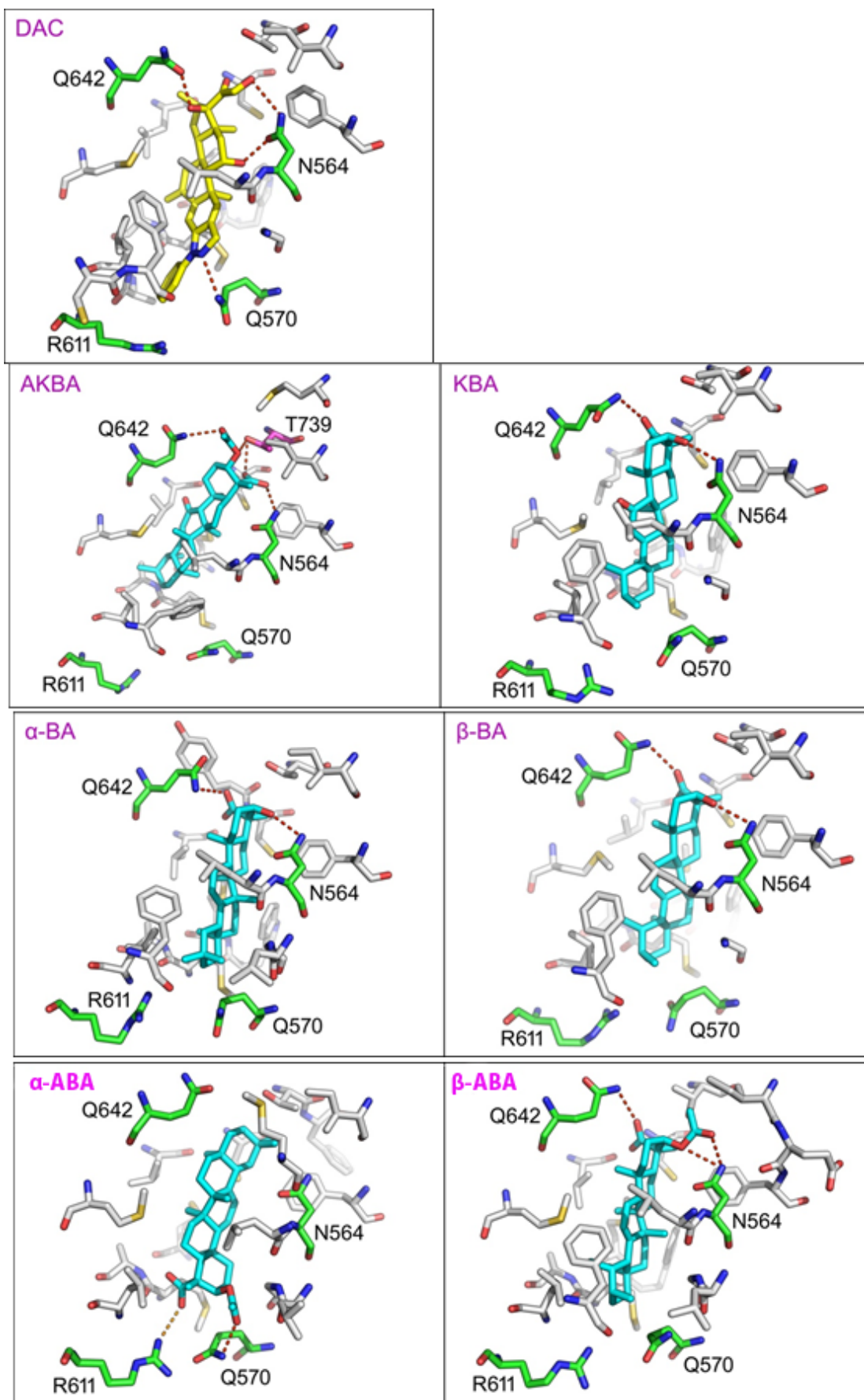
Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι όλα τα παράγωγα του μπισγουελλικού οξέος έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στην LBD περιοχή του GR. Την σταθερότερη πρόσδεση εμφανίζουν τα β -BA, KBA και α -ABA. Η ταξινόμηση αυτή γίνεται με βάση τη συγγένεια δέσμευσης, αλλά και με την ικανότητα των συγκεκριμένων παραγώγων να αλληλεπιδρούν με αμινοξέα κλειδιά που βρίσκονται εντός της περιοχής πρόσδεσης.

Πίνακας 10: Κατάταξη των των ευσταθέστερων διατάξεων πρόσδεσης των παραγώγων του μπισγουελλικού οξέος με το LBD του GR με βάση τις τιμές ΔG και K_d του προγράμματος Autodock vina. Επίσης παρουσιάζεται το προφίλ των πολικών αλληλεπιδράσεων των παραγώγων του μπισγουελλικού οξέος με GR.

*HB: Hydrogen Bond

*SB: Salt bridge

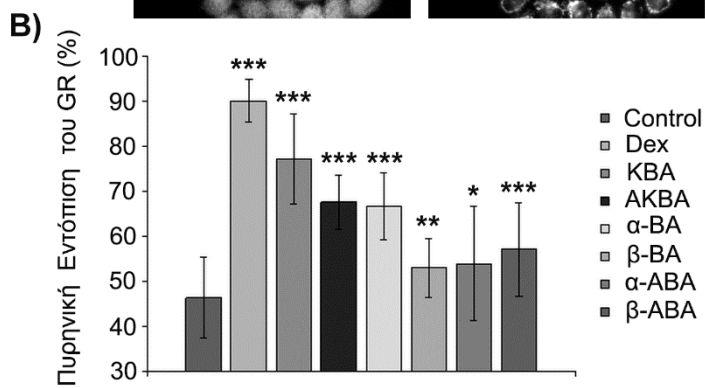
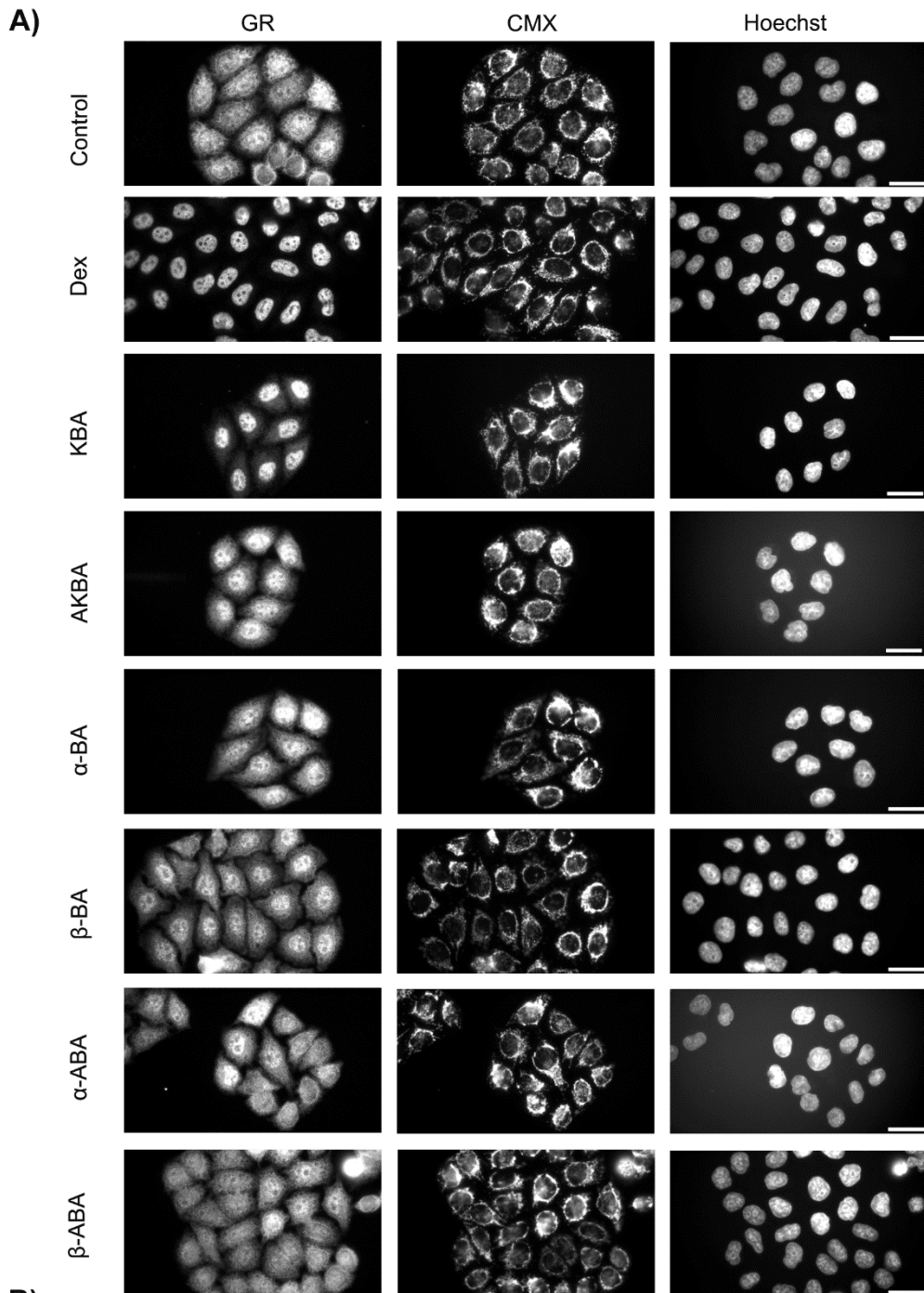
| BA | ΔG [kcal/mol] | K_d [nM] | HB* N563 | HB N564 | HB Q570 | HB R611 | HB Q642 | HB T739 | SB* R611 |
|---------------|--------------------------|---------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| β -BA | -13.8 | 0.076 | | 1 | | | 1 | | |
| KBA | -13.5 | 0.126 | | 1 | | | 1 | | |
| α -BA | -13.5 | 0.126 | | 1 | | | 1 | | |
| α -ABA | -13.2 | 0.209 | | | | | | | |
| β -ABA | -12.6 | 0.575 | | 2 | | | 1 | 2 | |
| AKBA | -10.7 | 14.22 | | 1 | | | 1 | | |
| DAC | -14.5 | 0.023 | 1 | 2 | 1 | | | | |



Εικόνα 38: Μελέτες πρόσδεσης των παραγώγων του μποσγουελλικού οξέος, α-BA, β-BA, AKBA, KBA, Aα-BA, Aβ-BA (απεικονίζονται με κυανό χρώμα) στη θέση πρόσδεσης της DAC στην LBD περιοχή του GR. Ο προσανατολισμός της περιοχής πρόσδεσης παραμένει ο ίδιος με αυτόν στη περίπτωση της DAC, για τη διευκόλυνση των συγκρίσεων. Για λόγους σαφήνειας, έχει γίνει παράλειψη κάποιων αμινοξέων. Τα σχετιζόμενα αμινοξέα του GR εμφανίζονται με πράσινο χρώμα. Οι κόκκινες παύλες αντιπροσωπεύουν δεσμούς υδρογόνου, ενώ οι κίτρινες παύλες αντιπροσωπεύουν γέφυρες άλατος (ιοντικές ελκτικές αλληλεπιδράσεις).

3.1.3.2 Τα παράγωγα του μποσγουελλικού οξέος επάγουν την πυρηνική μετατόπιση του GR

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε σε κύτταρα HeLa, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης των ενώσεων KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA στην ενεργοποίηση της πυρηνικής μετακίνησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με 10 μM από τις KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA και 1μM DEX, για 2 ώρες (**Εικόνα 39**). Οι φθορίζουσες χρωστικές CMX και Hoechst χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των μιτοχονδρίων και του πυρήνα αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα GR-300 έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και δεύτερο αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor®488 (πράσινο). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού έδειξε ότι η DEX, όπως αναμενόταν, επάγει τη μέγιστη πυρηνική μετατόπιση του GR (44%), ακολούθησε η KBA σε ποσοστό περίπου 31%, οι AKBA και α-BA σε ποσοστό περίπου 21%, ενώ μικρότερη επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης παρατηρείται παρουσία των β-BA, α-ABA και β-ABA σε ποσοστά που κυμαίνονταν από 6-11%, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.



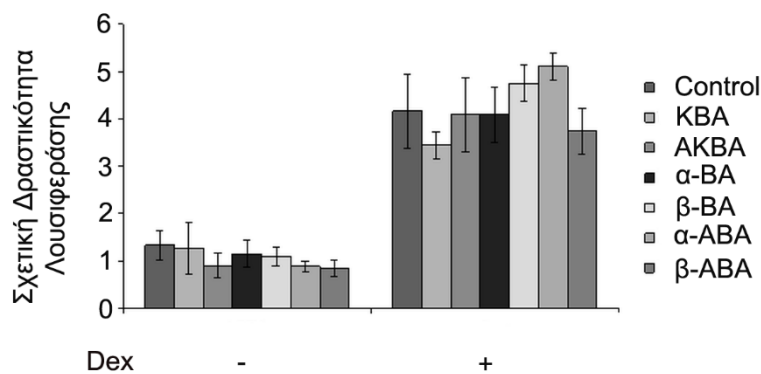
Εικόνα 39: Επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR από τις KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA. **A)** Σε θρεπτικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών αναπτύσσονται κύτταρα HeLa για 48 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των κυττάρων με τις ενώσεις KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA (10 μM) ή με DEX (1μM). Στα κύτταρα Control προστέθηκε EtOH και DMSO σε συγκέντρωση ίση με των υπολοίπων συνθηκών. Ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων με την χρήση μεθανόλης-ακετόνης και περαιτέρω επεξεργασία Hoechst και CMX, αλλά και με αντίσωμα έναντι του GR (GR-H300). Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 30 μm. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας. Ο λόγος του φθορισμού του GR στον πυρήνα ως προς τον φθορισμό του GR όλου του κυττάρου αντιστοιχεί στο ποσοστό της πυρηνικής εντόπισης του GR. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα κύτταρα μάρτυρες και εκφάζονται ως ο μέσος όρος \pm S.D. ($n > 20$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.1.3.3 Επίδραση των παραγώνων του μποςγουελλικού οξέος στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR

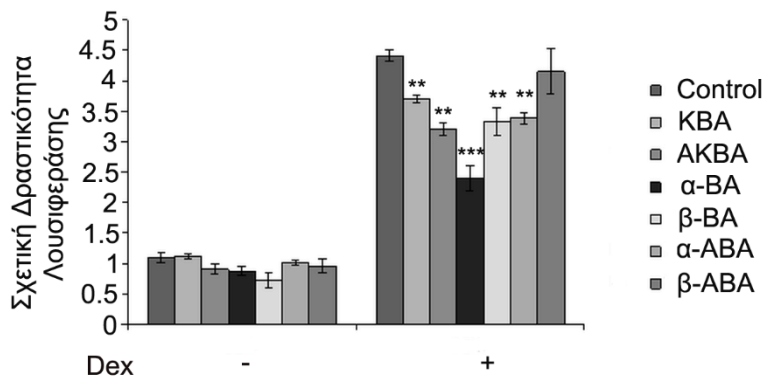
Δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης πραγματοποιήθηκε με σκοπό να ελεγχθεί το κατά πόσο, οι ενώσεις KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA επιδρούν στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Κατά την διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια κυττάρων HeLa και HEK293 σε θρεπτικό υλικό, χωρίς στεροειδείς ορμόνες και ακολούθησε διαμόλυνση τους με τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal. Έπειτα, έγινε προσθήκη των ενώσεων KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA (10 μM), παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 0.1 μM, για 6 ώρες. Η μεταγραφική δραστηριότητα του GR, παρουσία δεξαμεθαζόνης αυξήθηκε κατά 4.5-5.5 φορές στα κύτταρα HeLa, σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς και περίπου κατά 4.5 φορές (**Εικόνα 40A**) στα κύτταρα HEK293 (**Εικόνα 40B**: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Τζιόρτζιου Μαρίας), σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, τα οποία δεν είχαν επεξεργαστεί με δεξαμεθαζόνη. Στα κύτταρα HeLa, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, παρουσία των ενώσεων, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης. Αντίθετα, στα κύτταρα HEK293 παρουσία δεξαμεθαζόνης και παρουσία των ενώσεων KBA, AKBA, β-BA, α-ABA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της από δεξαμεθαζόνης επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR σε ένα ποσοστό της τάξεως του 10-20%. Αξιοσημείωτη είναι η αντίστοιχη μείωση που προκλήθηκε από την ουσία α-BA, που φτάνει περίπου στο 50%, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (control). Τέλος, η ουσία β-ABA δεν φαίνεται να επηρεάζει τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, στα κύτταρα HEK293. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι υπό μελέτη ενώσεις δεν προκαλούν ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, με την ουσία α-BA να παρουσιάζει μία πιθανή ανταγωνιστική έναντι της DEX δράση. Η επιβεβαίωση και αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε μέσω Western blot ανάλυσης των πρωτεϊνικών επιπέδων της καρβοξυκινάσης του

φωσφοενολοπιρροσταφυλικού οξέος (PEPCK), ενός γονιδίου στόχου του GR, και του ίδιου του GR (**Εικόνα 40Γ: Επίπεδα GR**: μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Τζιόρτζιου Μαρίας) σε κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα επωάστηκαν με τις υπό μελέτη ενώσεις σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία ή απουσία DEX 10^{-8} M ή 10^{-9} M, απουσία στεροειδών ορμονών. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK δε μεταβλήθηκαν σημαντικά, παρουσία των ενώσεων. Παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή μείωση της τάξεως του 10-20 %, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Παρ'όλα αυτά, η ουσία α -BA παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων PEPCK, η οποία πιθανότατα να οφείλεται στα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR, και όχι σε πιθανή ανταγωνιστική δράση της ουσίας αυτής έναντι της DEX.

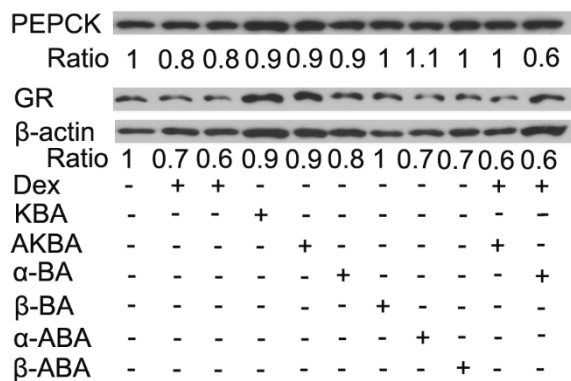
A)



B)



Γ)

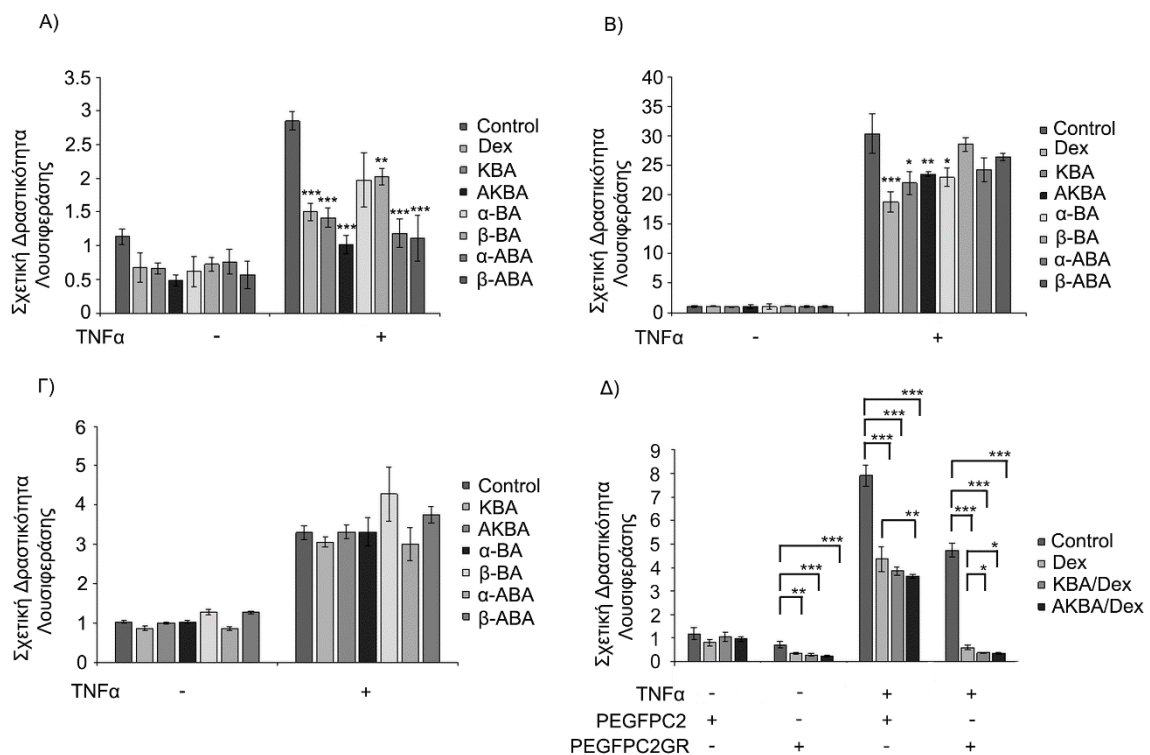


Εικόνα 40: Η επίδραση των KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη κυττάρων HeLa (**A**) και HEK293 (**B**), απουσία στεροειδών ορμονών, η οποία ακολουθήθηκε με διαμόλυνση τους με τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pSV40- β -Gal. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε προσθήκη των ενώσεων KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA (10 μ M) και της DEX (10^{-8} ή 10^{-9} M: 2^ο ή 3^ο δείγμα αντίστοιχα) για 6 ώρες. Τα επίπεδα της δραστηριότητας της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα δραστηριότητας της β -γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με αυτήν στα κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο \pm S.D. (n=3) ** p< 0.01, *** p< 0.001. **Γ)** Western Blot ανάλυση για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων της PERCK, του GR και της β -ακτίνης. Σε κύτταρα HeLa που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες, ακολουθεί προσθήκη 10 μ M από τις KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA (10 μ M) ή και 0.1 μ M από την DEX, για 48 ώρες. Ειδικά εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των παραπάνω μορίων. Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό μελέτη μορίων προσδιορίστηκε με χρήση προγράμματος Image J. Οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων ενδιαφέροντος εκφράζονται μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τις αντίστοιχες μεταβολές των επιπέδων β -ακτίνης ή α -τουμπουλίνης. Οι τιμές (ratio) αναπαριστούν τη σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη μορίου σε σχέση με αυτήν στις συνθήκες αναφοράς (control).

3.1.3.4 Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B από τα παράγωγα του μωσγουελλικού οξέος μέσω GR σηματοδότησης

Για τον έλεγχο της πιθανής αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA μέσω της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B εφαρμόστηκε η δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα HeLa (**Εικόνα 41A**) και HEK293 (**Εικόνα 41B**), τα οποία εκφράζουν υψηλά και μέτρια επίπεδα του GR, αντίστοιχα, αλλά και κύτταρα COS-7, τα οποία εκφράζει πολύ χαμηλά επίπεδα του GR (**Εικόνα 41Γ**), τέθηκαν σε καλλιέργεια παρουσία θρεπτικού μέσου, ελεύθερου στεροειδών ορμονών, για 24 ώρες και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pMMTV-NF- κ B-Luc και pSV40- β -Gal. Έπειτα, ακολούθησε η επώαση όλων των κυτταρικών σειρών με 10 μ M KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA ή 1 μ M DEX, παρουσία ή απουσία 10 nM TNF- α . Τα κύτταρα control επωάστηκαν με ddH₂O, DMSO και EtOH σε συγκέντρωση ίδια με αυτήν των υπόλοιπων συνθηκών. Στα κύτταρα HeLa (**Εικόνα 41A**), παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της από TNF- α επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B, τόσο παρουσία δεξαμεθαζόνης όσο και παρουσία των ενώσεων KBA, AKBA, α -ABA και β -ABA, της τάξεως του 40 με 50%, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ μικρότερη μείωση της τάξεως του 20-30% παρατηρήθηκε, παρουσία των ενώσεων α -BA και β -BA. Όσο αφορά την αντίστοιχη μελέτη σε κύτταρα HEK293, παρατηρούμε ότι με εξαίρεση την DEX, οι ενώσεις

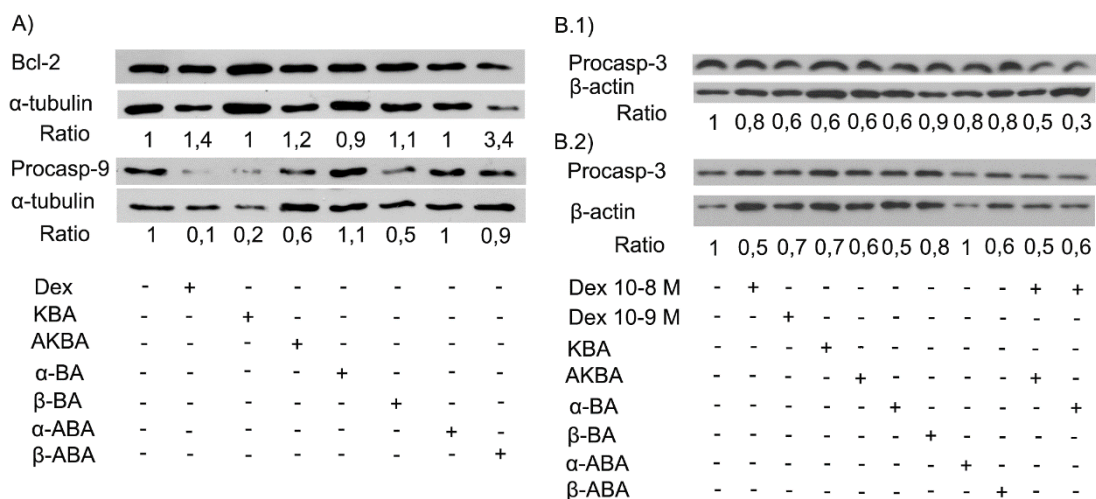
προκαλούν μικρότερη μείωση της από TNF-α επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, της τάξεως του 10-20%. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών πιθανόν να οφείλεται σε ιστοειδική δράση των ενώσεων, λόγω πιθανώς της διαφορικής έκφρασης συμπαραγόντων κρίσιμων για την έκφραση της δραστηριότητας GR και NF-κB, αλλά και λόγω της διαφορικής έκφρασης των επιπέδων του ίδιου του GR. Σε συμφωνία με τα παραπάνω σε κύτταρα COS-7 (**Εικόνα 41Γ**), παρουσία των ενώσεων δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην από TNF-α επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντιφλεγμονώδης δράση των ενώσεων επιτυγχάνεται εν μέρει, μέσω ρύθμισης της σηματοδότησης του GR. Τέλος, για τον έλεγχο της επίδρασης των ενώσεων στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, κατά την συγχρόνηση τους με DEX, μέσω GR σηματοδότησης, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης σε κύτταρα HEK293, τα οποία αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε διαμόλυνση με τα πλασμίδια PMMTV-NF-κB-Luc, pSV40-β-Gal και PEGFPC2 ή PEGFPC2GR. Ακολούθησε η προσθήκη 10 μM από τις ενώσεις KBA και AKBA ή 1 μM DEX, παρουσία ή απουσία 10 nM TNF-α, για 6 ώρες (**Εικόνα 41Δ**). Στα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PEGFPC2, παρουσία TNF-α, τόσο παρουσία DEX, όσο και μετά από ταυτόχρονη παρουσία DEX και ενώσεων παρατηρείται μια μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB της τάξεως του 50%, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Μάλιστα κατά την ταυτόχρονη συγχρόνηση DEX και ενώσεων παρατηρείται μία τάση ενίσχυσης της κατασταλτικής δράσης της DEX, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ομοίως στα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PEGFPC2GR, παρουσία TNF-α και DEX παρατηρείται μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB της τάξεως του 90%, η οποία μάλιστα αυξάνεται στατιστικά σημαντικά, μετά από συγχρόνηση ενώσεων και DEX. Επίσης, στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PEGFPC2GR, σε σύγκριση με τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PEGFPC2, παρουσία DEX ή μετά από συγχρόνηση ενώσεων και DEX, παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, τόσο απουσία, όσο και παρουσία TNF-α. Μάλιστα, παρουσία TNF-α, στα διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο PEGFPC2GR παρατηρείται 40% επιπλέον μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB σε σχέση με αυτή των διαμολυσμένων κυττάρων με το πλασμίδιο PEGFPC2. Συμπερασματικά, οι ενώσεις KBA και AKBA ασκούν αθροιστική δράση σε αυτή της DEX, η οποία επιτελείται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα 41: Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ από τις ενώσεις KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA μέσω GR σηματοδότησης. Κύτταρα HeLa (A), HEK293 (B) και COS-7 (Γ) αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο, ελεύθερου στεροειδών ορμονών. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια PMMTV-NF-κΒ-Luc και pSV40-β-Gal και στη συνέχεια επώασή τους με με 1 μM DEX ή 10 μM από τις ενώσεις, παρουσία ή απουσία 10 nM TNF-α, για 6 ώρες. Επίσης, δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης εφαρμόστηκε και σε κύτταρα HEK293 (Δ), τα οποία διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια NF-κΒ-LUC, β γαλακτοσιδάση και PEGFPC2 ή PEGFPC2GR. Ακολούθησε η προσθήκη 10 μM από τις ενώσεις KBA και AKBA ή και 1 μM DEX, παρουσία ή απουσία 10 nM TNF-α. Τα επίπεδα της δραστηριότητας της λουσιφεράσης κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β-γαλακτοσιδάσης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με αυτήν στα κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσος όρος +S.D.(n>3), * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

3.1.3.5 Η επαγωγή μιτοχονδριακά-επαγόμενης απόπτωσης από τα παράγωγα του μπουσγουελλικού οξέος

Για τη διερεύνηση της πιθανής αποπτωτικής δράσης των ενώσεων KBA, AKBA, α-BA, β-BA, α-ABA και β-ABA, εφαρμόστηκε Western blot ανάλυση για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 αλλά και των αποπτωτικών μορίων προκασπάση-9 και προκασπάση-3 σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία υποβλήθηκαν σε κατεργασία με τα υπό μελέτη μόρια (**Εικόνα 42A, 42B.1**) αλλά και τα επίπεδα της προκασπάσης-3 σε εκχυλίσματα κυττάρων HepG2 (**Εικόνα 42B.2** μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Τζιόρτζιου Μαρίας). Κύτταρα και από τους δύο κυτταρικές σειρές επώαστηκαν με 10 μΜ από τις ενώσεις ή, και με 10^{-8} M ή 10^{-9} M DEX, για 48 ώρες. Στα κύτταρα HeLa, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 δεν μεταβλήθηκαν. Ωστόσο, παρατηρείται μείωση των επιπέδων της ανενεργής κασπάσης 9 (**Εικόνα 42A**) παρουσία των ενώσεων KBA, AKBA, β-BA και β-ABA, ενώ παρουσία των ενώσεων, α-BA και α-ABA δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή των επιπέδων του συγκεκριμένου μορίου, στα κύτταρα HeLa. Μείωση παρουσία όλων των ενώσεων, παρατηρείται και στα επίπεδα της προκασπάσης-3 (**Εικόνα 42B.1**), η οποία μάλιστα αυξάνεται, κατά την συγχορήγηση των ενώσεων AKBA και α-BA, με DEX, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενώσεις ασκούν αθροιστική δράση σε αυτή της DEX. Επίσης, μείωση των επιπέδων της προκασπάσης-3, παρουσία όλων των ενώσεων, εκτός της α-ABA, παρατηρείται και στα κύτταρα HepG2 (**Εικόνα 42B.2**). Συμπερασματικά, οι ενώσεις KBA, AKBA, α-BA, β-BA και β-ABA έχουν την ικανότητα επαγωγής μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HepG2.



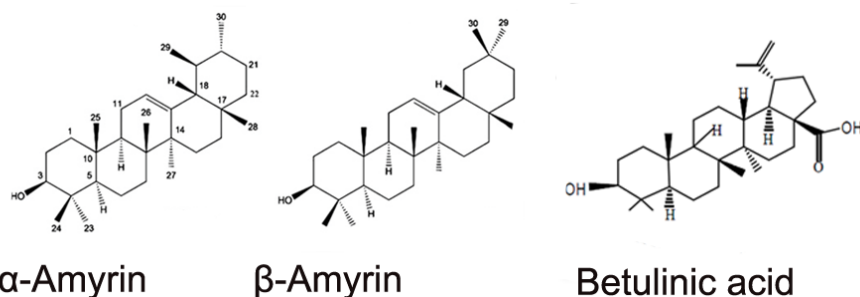
Εικόνα 42: Έλεγχος της αποπτωτικής δράσης των ενώσεων KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA. Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων προκάσπαση-9, Bcl-2 και α τουμπουλίνης (A) σε κύτταρα HeLa και των επιπέδων της προκάσπαση-3 και β ακτίνης (B.1, B.2) σε κύτταρα HeLa και HepG2, τα οποία αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών, παρουσία των ενώσεων KBA, AKBA, α -BA, β -BA, α -ABA και β -ABA, ή και 10⁻⁸ M ή 10⁻⁹ M DEX, για 48 ώρες. Για την ανίχνευση των παραπάνω μορίων εφαρμόστηκε η μέθοδος Western blot με χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό μελέτη μορίων προσδιορίστηκε με χρήση προγράμματος Image J. Οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων ενδιαφέροντος εκφράζονται μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τις αντίστοιχες μεταβολές των επιπέδων β -ακτίνης ή α -τουμπουλίνης. Οι τιμές (ratio) αναπαριστούν τη σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη μορίου σε σχέση με αυτήν στις συνθήκες αναφοράς (control).

3.1.4 Παράγωγα των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος

Οι αμυρίνες ανήκουν στην ομάδα των πεντακυκλικών τριτερπενίων και χωρίζονται στις α και στις β αμυρίνες. Οι α αμυρίνες προέρχονται από την ουρσάλη ενώ οι β αμυρίνες από την ολεανάνη. Το 2-3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται από τη συνθετάση της β αμυρίνης και από το εποξειδίο, με σκοπό την παραγωγή της β και της α αμυρίνης αντίστοιχα. Η μετανάστευση ενός μεθυλενίου κατά την διαδικασία της κυκλοποίησης είναι αυτή που διαφοροποιεί τα 2 είδη αμυρινών. Η ρητίνη αποτελεί πηγή πλούσια σε α και β αμυρίνες [206,207]. Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι αμυρίνες χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, καθώς διαθέτουν αντιοξειδωτικές, ηπατοπροστατευτικές, γαστροπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις καθώς και αντιπυρετικές ιδιότητες [208].

Το μπετουλινικό οξύ ανήκει και αυτό στην κατηγορία των πεντακυκλικών τριτερπενίων. Αυτού του είδους τα τριτερπένια προέρχονται από τη λουπάνη και είναι γνωστό ότι διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντι-ιικές καθώς και αντιδιαβητικές ιδιότητες. Επίσης, έχει αναφερθεί και η αντικαρκινική τους δράση, η οποία βέβαια

εξαρτάται από το είδος της κυτταρικής σειράς, αλλά και από τις συγκεντρώσεις στις οποίες χορηγούνται [209,210].



Εικόνα 43: Η χημική δομή της α και β αμυρίνης, καθώς και του Μπετουλινικού οξέος.

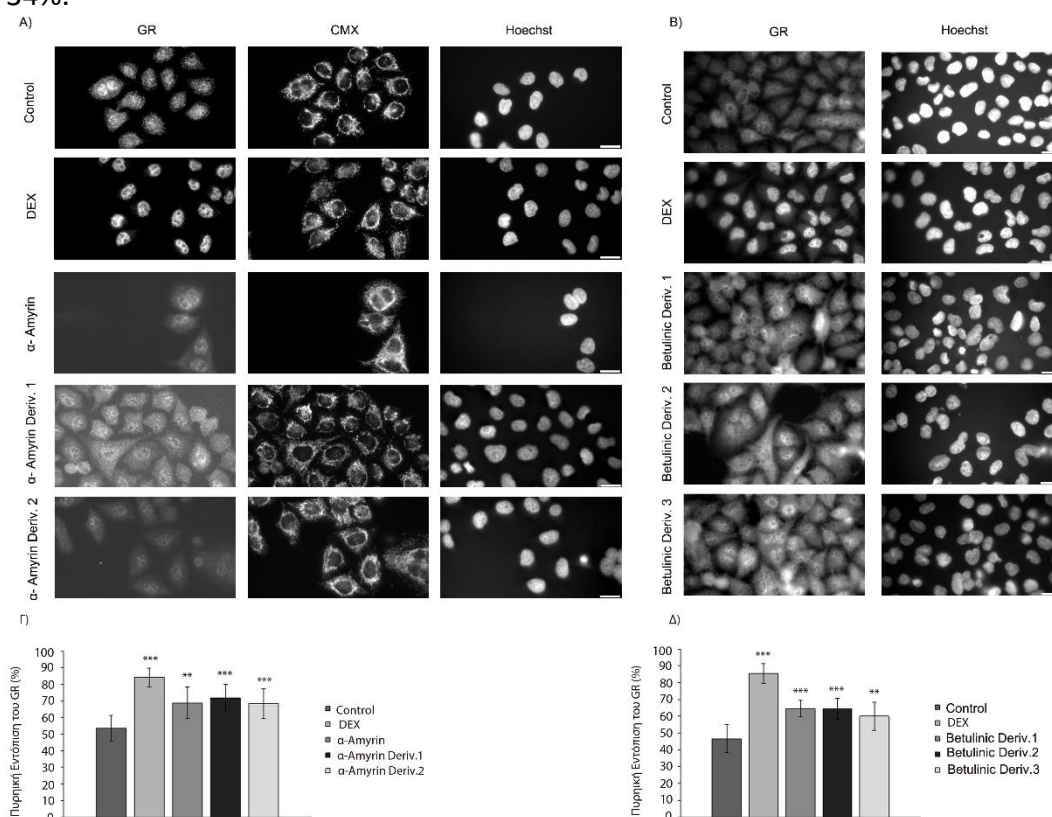
Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκαν τα παράγωγα των α -αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος, με τα κωδικά ονόματα που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11: Κωδικές ονομασίες των παραγώγων της αμυρίνης και του μπετουλινικού οξέος και ονόματα με τα οποία αναφέρονται στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

| Κωδικό όνομα ενώσεων | Όνομα αναφοράς στην παρούσα διδακτορική διατριβή |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|
| TFC₁₀₃₈ | α - Αμυρίνη (α -Amyrin) |
| TFC₁₀₃₉ | Παράγωγο α -Αμυρίνης 1 (α -Amyrin Deriv. 1) |
| TFC₁₀₄₀ | Παράγωγο α -Αμυρίνης 2 (α -Amyrin Deriv. 2) |
| PCUPO4 | Παράγωγο μπετουλινικού οξέος 1 (Betulinic Deriv. 1) |
| PCUPO12 | Παράγωγο μπετουλινικού οξέος 2 (Betulinic Deriv. 2) |
| FR381 | Παράγωγο μπετουλινικού οξέος 3 (Betulinic Deriv. 3) |

3.1.4.1 Επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR από τα παράγωγα των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος

Με σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος να επάγουν τη μετακίνηση του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (**Εικόνα 44**) εφαρμόστηκε η μέθοδος του ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HeLa, τα οποία αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών. Η προσθήκη των ενώσεων πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες σε συγκέντρωση 10 μ M. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση 1 μ M DEX. Κατά τη διαδικασία του ανοσοφθορισμού έγινε χρήση των ενώσεων Hoechst και CMX, καθώς και αντισώματος έναντι του GR. Από τις εικόνες του ανοσοφθορισμού προκύπτει το συμπέρασμα ότι τόσο τα παράγωγα των αμυρινών όσο και τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος έχουν την δυνατότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του GR, σε μικρό ποσοστό όμως, όταν συγκρίνονται με τα κύτταρα αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, η α -αμυρίνη και τα παράγωγα της (α -Amyrin Deriv. 1, α -Amyrin Deriv. 2) είχαν την ικανότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του GR, σε ποσοστό περίπου 15%, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ η DEX επάγει την πυρηνική μετατόπιση του GR σε ποσοστό 29%. Επιπρόσθετα, παρουσία των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος παρατηρείται επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR, σε ποσοστό της τάξεως του 14-19%, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ η DEX επάγει την πυρηνική μετατόπιση του GR σε ποσοστό 34%.

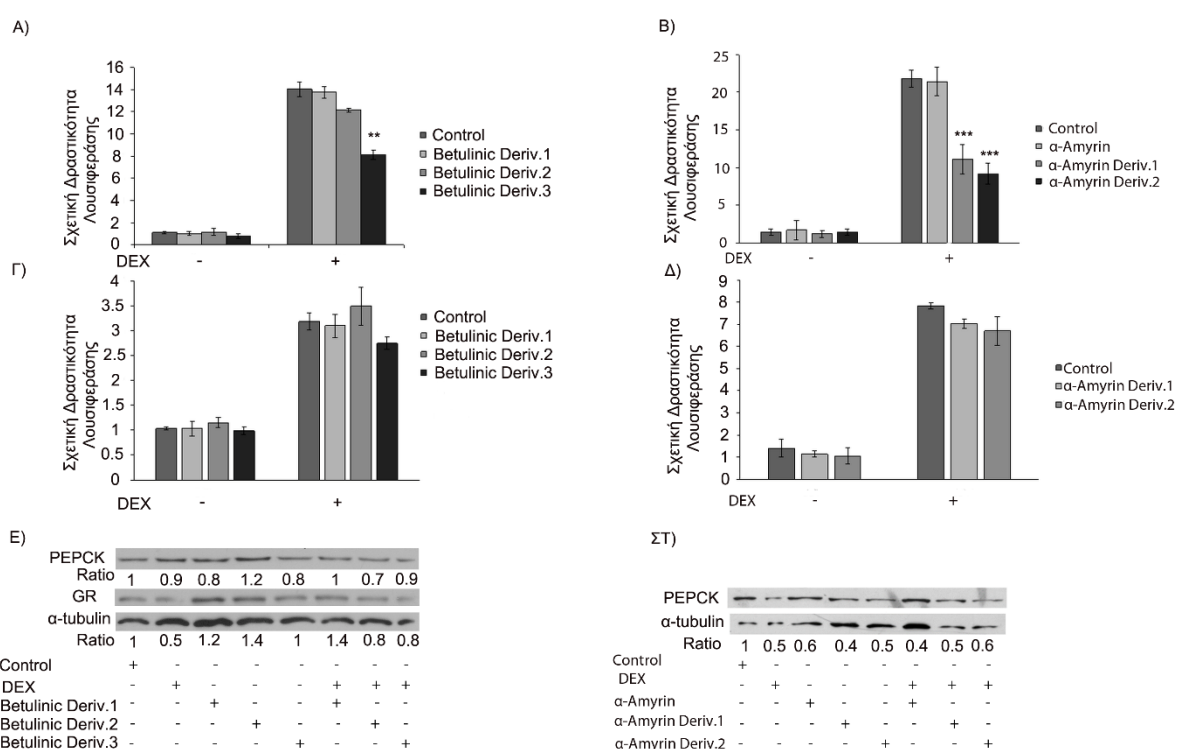


Εικόνα 44: Επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR μετά την προσθήκη της αμυρίνης και των παραγώγων της (**A**) αλλά και των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος (**B**). Σε θρεπτικό μέσο ελεύθερο στεροειδών ορμονών, πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια κυττάρων HeLa για 48 ώρες, και έπειτα έγινε προσθήκη της α-Αμυρίνης και των παραγώγων της 1 και 2 (**A**) καθώς και των παραγώγων του Μπετουλινικού οξέος 1-3 (**B**) (10 μM) ή DEX (1μM) για δύο ώρες. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη-ακετόνη και επεξεργάστηκαν περαιτέρω με Hoechst, CMX, και με αντίσωμα έναντι του GR. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 30 μM. Ο λόγος του φθορισμού του GR στον πυρήνα ως προς τον φθορισμό του GR όλου του κυττάρου αντιστοιχεί στο ποσοστό της πυρηνικής εντόπισης του GR. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα κύτταρα μάρτυρες και εκφάζονται ως ο μέσος όρος \pm S.D. ($n > 10$), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.1.4.2 Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος στην από DEX επαγόμενη μεταγραφική δραστηριότητα του GR

Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR ελέγχθηκε με δοκιμασία λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης στις κυτταρικές σειρές HeLa (**Εικόνα 45A:** μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Τζιόρτζιου Μαρίας, **45B**) και HEK293 (**Εικόνα 45Γ, 45Δ**). Τα κύτταρα μετά την ανάπτυξή τους σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal. Ακολούθησε η κατεργασία τους με τις ενώσεις σε συγκέντρωση 10 μM παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 0.1 μM. Σε κύτταρα HeLa, παρουσία δεξαμεθαζόνης, πραγματοποιήθηκε αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR κατά 15-20 φορές σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (**Εικόνα 45A, 45B**) και αντίστοιχα περίπου 3.5-7.5 φορές στα κύτταρα HEK293 (**Εικόνα 45Γ, 45Δ**), σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, τα οποία είχαν επωαστεί με το μέσο διαλυτοποίησης DEX και ενώσεων. Στα κύτταρα HEK293, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, παρουσία των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος, είτε παρουσία είτε απουσία DEX σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς. Αντίθετα, στα κύτταρα HeLa, κατά την συν-χορήγηση δεξαμεθαζόνης και συγκεκριμένων ενώσεων όπως το παράγωγο του μπετουλινικού οξέος 3 (Betulinic Deriv. 3), το παράγωγο της α-Αμυρίνης 1 (α-Amyrin Deriv. 1) και το παράγωγο της α-Αμυρίνης 2 (α-Amyrin Deriv.2) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της από DEX επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε ποσοστό της τάξεως του 45, 50 και 60%, αντίστοιχα. Με κατάλληλη κατεργασία των κυττάρων και εφαρμογή Western Blot ανάλυσης, ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), ενός γονιδίου στόχου του GR, σε κύτταρα HeLa, τα οποία επώαστηκαν με 10 μM από τις ενώσεις, παρουσία ή απουσία 1μM (**Εικόνα 45ΣΤ**) ή 10^{-8} M (**Εικόνα 45Ε:** μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Τζιόρτζιου Μαρίας) DEX. Όσον αφορά τα

επίπεδα της PEPCK, παρουσία των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά. Η ίδια παρατήρηση ισχύει όσο αφορά και τα επίπεδα του GR. Ωστόσο, τα μειωμένα επίπεδα της PEPCK που παρατηρούνται παρουσία δεξαμεθαζόνης, πιθανόν οφείλονται στα μειωμένα επίπεδα του GR που προκαλούνται από την δεξαμεθαζόνη. Όσον αφορά την επίδραση αμυρίνης και των παραγώγων της, παρατηρούμε ότι τόσο παρουσία όσο και απουσία DEX παρατηρείται μια αξιοσημείωτη μείωση των επιπέδων PEPCK. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το αποτέλεσμα που προέκυψε από την δοκιμασία της λουσιφεράσης για τα παράγωγα της της α-Αμυρίνης 1 και 3 καταδεικνύουν μια ανταγωνιστική δράση των ενώσεων έναντι της DEX, που οδηγεί σε αρνητική επίδραση στα επίπεδα της PEPCK και κατά συνέπεια πιθανή αντιδιαβητική δράση.

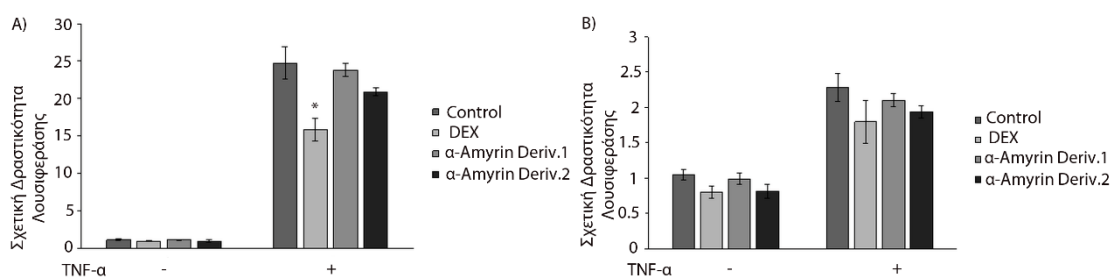


Εικόνα 45: Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών και του μπετουλινικού οξέος στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε κύτταρα HeLa (**A, B**) και HEK293 (**Γ, Δ**). Η διαμόλυνση κυττάρων HeLa και HEK293 έγινε με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal. Οι ενώσεις προστέθηκαν σε συγκέντρωση 1 μM ενώ η DEX σε 0.1 μM. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με αυτήν σε κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο \pm S.D. (n=3), ** p < 0.01, *** p < 0.001. **E, ΣΤ**) Western Blot ανάλυση για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, του GR και της β-ακτίνης. Σε κύτταρα HeLa που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο, απουσία στεροειδών ορμονών για 48 ώρες, ακολουθεί προσθήκη 10 μM από τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος (1, 2 και 3: **E**) και από τα παράγωγα των αμυρινών (1,2 : **ΣΤ**) ή και 1 μM από την DEX, για 48 ώρες. Ειδικά εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των παραπάνω μορίων. Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό

μελέτη μορίων προσδιορίστηκε με χρήση προγράμματος Image J. Οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων ενδιαφέροντος εκφράζονται μετά από κανονικοποίηση τους ως προς τις αντίστοιχες μεταβολές των επιπέδων α-τουμπουλίνης. Οι τιμές (ratio) αναπαριστούν τη σχετική μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης του εκάστοτε υπό μελέτη μορίου σε σχέση με αυτήν στις συνθήκες αναφοράς (control).

3.1.4.3 Η επίδραση των παραγώγων των αμυρινών στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ

Κύτταρα των κυτταρικών σειρών HEK293 (A) και COS-7 (B) υπέστησαν κατεργασία με 10 μM από τις ενώσεις: παράγωγο αμυρίνης 1 και 2, με σκοπό τον έλεγχο της αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων, μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης. Τα πλασμίδια PMMTV-NF-κB-Luc και pSV40-β-Gal. χρησιμοποιήθηκαν για τη διαμόλυνση των κυττάρων. Η προσθήκη των ενώσεων (10 μM) και DEX (1 μM) πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία 10 ng/ ml TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), Τα κύτταρα αναφοράς επώαστηκαν με ddH₂O, EtoH και DMSO. Παρουσία των παραγώγων της α-Αμυρίνης δεν παρουσιάστηκε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ ούτε στα κύτταρα HEK293 (**Εικόνα 46A**), ούτε στα COS.7 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (**Εικόνα 46B**). Συνεπώς, οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν ασκούν αντιφλεγμονώδεις δράσεις.



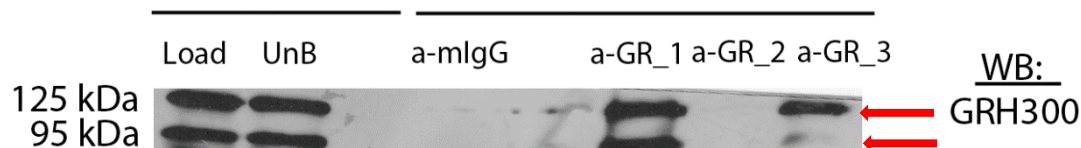
Εικόνα 46: Η επίδραση των παραγώγων της α-Αμυρίνης 1 και 2 στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κΒ. Διαμόλυνση των κυττάρων HEK293 (A) και COS-7 (B) πραγματοποιήθηκε με τα πλασμίδια PMMTV-NF-κB-Luc και pSV40-β-Gal. και ακολούθησε η επώαση με τις ενώσεις (10 μM) και DEX (1 μM), παρουσία ή απουσία 10 ng/ ml TNF-α. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε σχέση με αυτήν σε κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ±S.D.(n=3), * p< 0.05.

3.2 Χαρακτηρισμός των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια (mtGR)

3.2.1 Έλεγχος αποτελεσματικής ανοσοκατακρήμνισης GR με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων

Ο έλεγχος αποτελεσματικότητας διαφόρων εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης (IP) πραγματοποιήθηκε σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [65]. Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του GR, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης ήταν τα εξής: G5 (SC-393232) ή **GR_1**, 3D5 (SC-56851) ή **GR_2** και FIGR (SC-12763) ή **GR_3**. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και ανοσοσφαιρίνες από μη ανοσοποιημένο ζώο (**mlgG**) για την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Η τελική συγκέντρωση όλων των αντισωμάτων ήταν 1μg. Ακολούθησε δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης (Western blot, WB), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του GR (GRH300, SC-8992) (**Εικόνα 47**). Κατά τη διαδικασία αυτή, σήμα ανιχνεύθηκε στη διαδρομή ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν με τα αντισώματα G5 (SC-393232) και FIGR (SC-12763), όχι όμως με το αντίσωμα 3D5 (SC-56851), γεγονός που υποδηλώνει την αναποτελεσματικότητα του τελευταίου αντισώματος για χρήση του σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, σε αντίθεση με τα άλλα 2 αντισώματα.

Κυτταρικό εκχύλισμα Ανοσοκατακρημνισθέν
HepG2mtGFPGR σύμπλοκο (IP)



Εικόνα 47: Ανοσοκατακρήμνιση του ενδογενούς (95 kDa) και εξωγενούς (μιτοχονδριακού) (125 kDa) υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ολικό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR, τα οποία υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών υπό μορφή υβριδικής πρωτεΐνης με μιτοχονδριακή στόχευση (mtGFPGR), ανοσοκατακρημνίστηκε με την χρήση των αντισωμάτων **mlgG**, **GR_1**, **GR_2** και **GR_3**. Η ποσότητα του ολικού εκχυλίσματος των κυττάρων HepG2mtGFPGR, πριν την ανοσοκατακρήμνιση (**Load**), το εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR που δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια A/G, μετά την ανοσοκατακρήμνιση (**UnB** : Unbound), καθώς και τα σύμπλοκα που ανοσοκατακρημνίστηκαν με την χρήση των αντισωμάτων mlgG, GR_1, GR_2 και GR_3 αναλύθηκαν σε δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης WB). Κατά την ανάλυση WB, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του GR (**GR-H300**, Santa Cruz, Biotechnology).

3.2.2 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες και άλλα ρυθμιστικά μόρια σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου και των μηχανισμών δράσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και στον έλεγχο του μιτοχονδριακού μεταβολισμού.

Προηγούμενες μη δημοσιευμένες μελέτες του εργαστηρίου μας αποκαλύπτουν την αλληλεπίδραση του mtGR με την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate dehydrogenase, PDH), ενός ενζύμου κλειδί, το οποίο συνδέει τον κύκλο του κιτρικού οξέος και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με τις μεταβολικές διεργασίες της γλυκόλυσης, της γλυκονογένεσης αλλά και με τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων, καταλύοντας την αντίδραση μετατροπής πυροσταφυλικού σε ακέτυλο συνένζυμο Α. Δεδομένης μάλιστα της σημαντικότητας του ενζύμου στον έλεγχο του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού, που λαμβάνει χώρα κατά το φαινόμενο Warburg και την καρκινογένεση, που παρατηρείται σε διάφορους τύπους κυττάρων [211], η επαλήθευση και περαιτέρω διερεύνηση των επιπτώσεων αυτής της αλληλεπίδρασης αποτέλεσε πρωταρχικό στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης με βάση τα παραπάνω αλλά και με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, αλλά και άλλων ερευνητικών ομάδων [49-53,212], που αποδεικνύουν είσοδο του GR στα μιτοχόνδρια και εμπλοκή του στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και απόπτωσης, μόρια που ελέγχθησαν ως προς την πιθανή αλληλεπίδραση τους με τον mtGR ήταν :

A) Μόρια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαμόρφωσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, στην ενεργή και ανενεργή του μορφή, καθώς και στη μεταφορά πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο [213,214], όπως οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακά βάρη 70 και 90 (70, 90 kDa heat shock proteins)

B) Μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο μεταγραφικός παράγοντας MtfA (Mitochondrial transcription factor A) καθώς και **Γ)** ο μεταγραφικός παράγοντας (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) που αποτελεί υποδοχέα που ενεργοποιείται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων, ελέγχει μέσω ορμονικής ρύθμισης την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του MtfA και ρυθμίζει το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα σε συνθήκες έλλειψης ενέργειας ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, επιταχύνοντας τον καταβολισμό τους, την β-οξείδωση τους στα μιτοχόνδρια και την κετογένεση [215,216].

Δ) Ο τασιοεξαρτώμενος ανιοντικός διάυλος (Voltage-dependent anion channel, VDAC), ο οποίος αποτελεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων που σχηματίζει ένα κανάλι, το οποίο επιτρέπει τη διάχυση μικρών υδροφιλικών μορίων και ιόντων από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια και αντίθετα. Ο VDAC αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες μεταξύ αυτών πρωτεΐνες αποπτωτικές και αντιαποπτωτικές όπως η Bcl2 καθώς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με ενεργειακό μεταβολισμό όπως η πρωτεΐνη-μεταφορέας νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (adenosine nucleotide transporter, ANT) και η εξοκίνηση II [217-221].

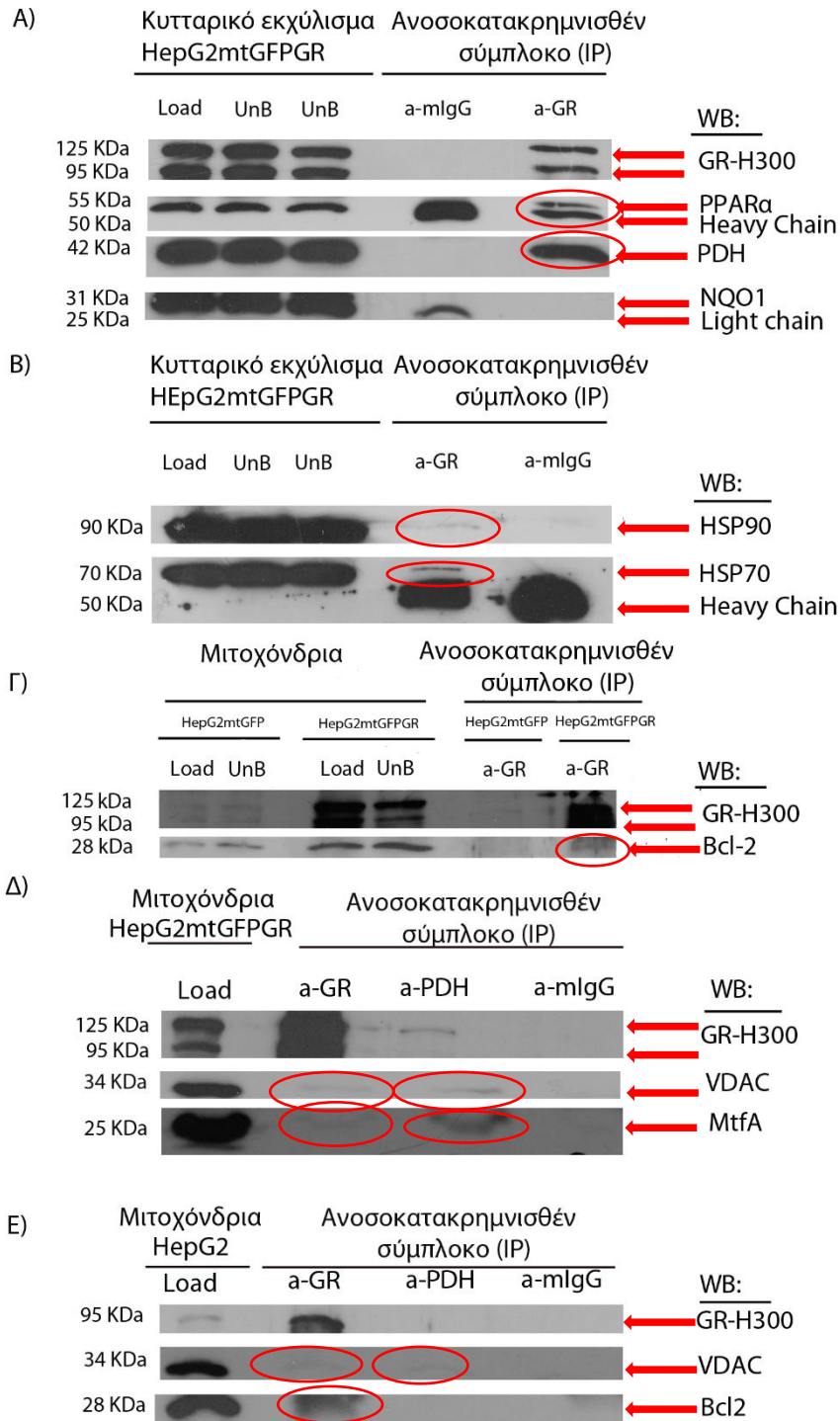
Ε) Η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), η οποία βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και απόπτωση. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και αποτρέπουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και των ROS, σημαντικών σημάτων για την έναρξη του αποπτωτικού μονοπατιού [222].

ΣΤ) Η κυτταροπλασματική NADPH οξειδοαναγωγή κινονών (NAD[P]H [quinone] oxidoreductase 1, NQO1), η οποία ανήκει στην οικογένεια των φλαβοπρωτεϊνών και μπορεί να έχει και μιτοχονδριακή εντόπιση [223]. Δεδομένης της συμμετοχής της στη μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων η οξειδοαναγωγή κινονών NAD[P]H έχει την ικανότητα να προστατεύει τα κύτταρα από την κυτταροτοξικότητα, το οξειδωτικό στρες αλλά και την μεταλλαξιγένεση [224].

Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τα παραπάνω μόρια πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης (IP), είτε σε ολικό (**Εικόνα 48A, 48B**) ή μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR (**Εικόνα 48Γ, 48Δ**) καθώς και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFP (**Εικόνα 48Γ**) και HepG2 (**Εικόνα 48E**). Για την ανοσοκατακρήμνιση του GR χρησιμοποιήθηκε είτε το μονοκλωνικό αντίσωμα GR-2F8 (**Εικόνα 48A, 48B**), είτε το αντίσωμα GR-G5 (SC-393232, Santa Cruz) (**Εικόνα 48Γ, 48Δ, 48E**) έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Η αποτελεσματικότητα του αντισώματος GR-2F8, σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, είχε ελεγχθεί στο παρελθόν από μέλη του εργαστηρίου μας [65]. Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και αντίσωμα mIgG, για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων (control). Η τελική συγκέντρωση όλων των αντισωμάτων ήταν 1 μg. Στη συνέχεια, με σκοπό την ανίχνευση της παρουσίας των προαναφερθέντων μορίων στα ανοσοκατακρημνισθέντα σύμπλοκα, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης (WB) με την χρήση ειδικών αντισωμάτων, έναντι των υπό διερεύνηση μορίων. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western φαίνονται στην **εικόνα 48**. Οι πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να αποτελούν μέρος του συμπλόκου που ανοσοκατακρημνίστηκε και συνεπώς αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών είναι οι εξής: οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακά βάρη 70 KDa (70 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP70) και 90 KDa (90 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP90) (**Εικόνα 48B**), ο μεταγραφικός παράγοντας PPARα

(**Εικόνα 48Α**), η PDH (**Εικόνα 48Α**), η πρωτεΐνη VDAC (**Εικόνα 48Δ, 48Ε**), ο μεταγραφικός παράγοντας MtfA (**Εικόνα 48Δ**), καθώς και η αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2 (**Εικόνα 48Δ, 48Ε**). Μεταξύ αυτών ισχυρή αλληλεπίδραση παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες PDH, HSP70 και PPARα. Οι Bcl2 και VDAC ανιχνεύθηκαν τόσο στο μιτοχονδριακό κλάσμα των κυττάρων HepG2, όσο και στο μιτοχονδριακό κλάσμα των κυττάρων HepG2mtGFPGR, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα εν λόγω μόρια αλληλεπιδρούν τόσο με τον ενδογενή μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών όσο και με τον υπερεκφρασμένο μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (mtGFPGR).

Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι η χρήση αντισώματος έναντι της NQO1 δεν οδήγησε σε ανίχνευση σήματος στην διαδρομή ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν (**Εικόνα 48Α**), γεγονός που υποδηλώνει είτε τη μη δυνατότητα αλληλεπίδρασης του GR με την υπό μελέτη πρωτεΐνη, στις συνθήκες του πειράματος, είτε τη μειωμένη ευαισθησία του συγκεκριμένου αντισώματος για την ανίχνευση της ποσότητας των πρωτεϊνών που ανοσοκατακρημνίστηκαν.



Εικόνα 48: Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με τους παράγοντες PPARα, PDH, NQO1 (**A**) HSP90, HSP70, (**B**), Bcl2 (**Γ, E**), VDAC (**Δ,E**) και MtfA (**E**). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε ολικό (**A, B**) ή μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR (**Γ, Δ**), καθώς και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFP (**Γ**), και HepG2 (**Δ**) με ανοσοκατακρήμνιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, με την χρήση των αντισωμάτων mIgG (**A,B,Γ,Δ,E**), GR-2F8 (**A,B**), GR-G5 (SC-393232)(**Γ,Δ,E**). Όπου: **Load:** Ποσότητα ολικού (**A,B**) και μιτοχονδριακού (**Γ,Δ**) εκχυλίσματος κυττάρων HepG2mtGFPGR, κυττάρων HepG2mtGFP (**Γ**) και κυττάρων HepG2 (**E**), πριν την ανοσοκατακρήμνιση. Όπου: **UnB:** εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR (**A,B,Γ**) και HepG2mtGFP (**Γ**) που δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια A/G. Κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα όπως υποδεικνύεται στο σχήμα και περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και μέθοδοι.

3.2.3 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την PDH

Όπως προαναφέρθηκε η επαλήθευση και περαιτέρω διερεύνηση των επιπτώσεων της αλληλεπίδρασης GR με PDH αποτέλεσε πρωταρχικό στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

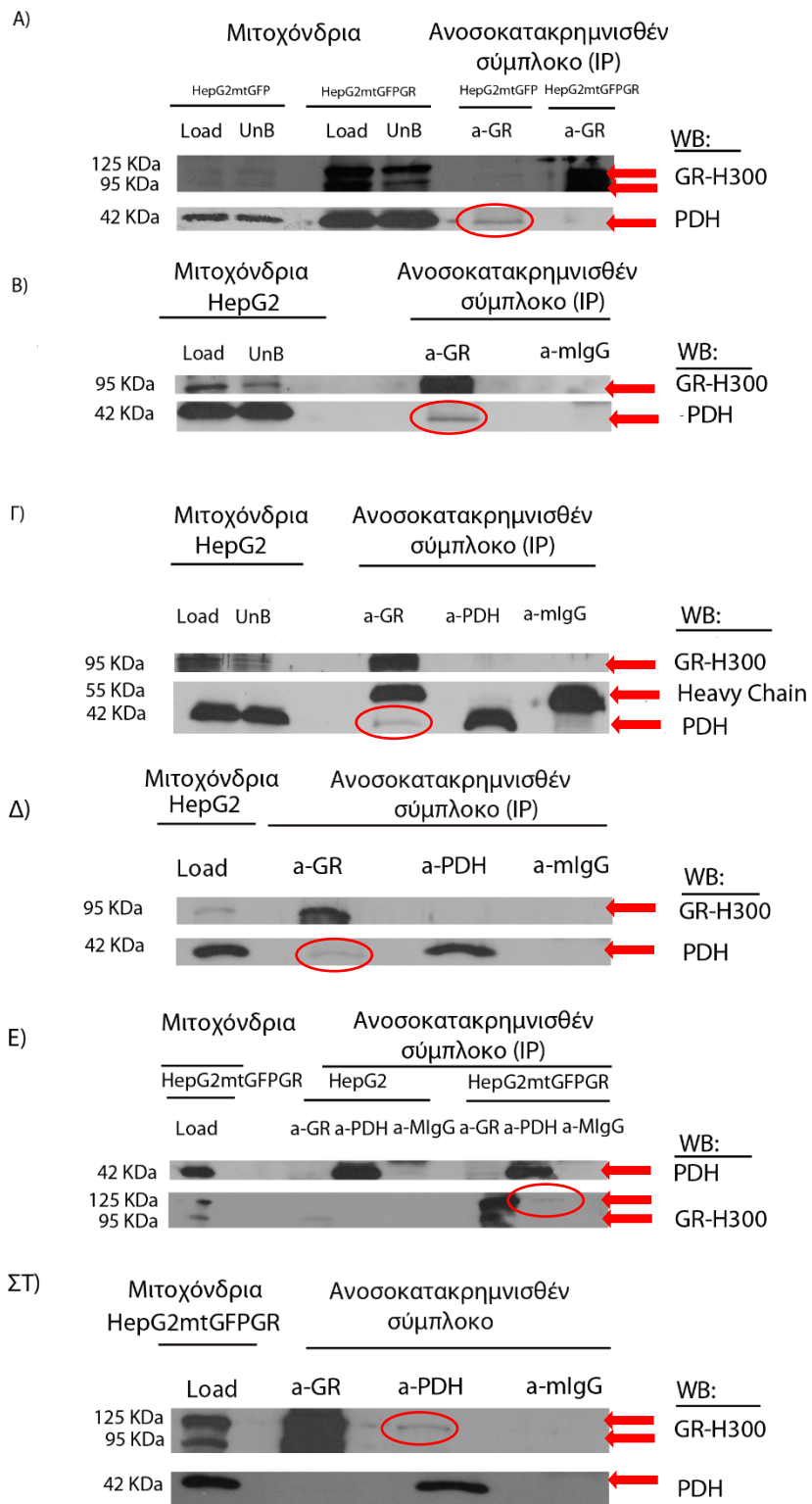
Έτσι, για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης αυτής πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης-ανοσοαποτύπωσης με την χρήση εναλλακτικού αντισώματος έναντι του GR (GR-G5 SC-393232) (**Εικόνα 49A-49ΣΤ**), αλλά και με τη χρήση αντισώματος έναντι της PDH, το οποίο ήταν μόνιμα ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια (διαθέσιμο από την εταιρεία Invitrogen) (**Εικόνα 49Γ, 49Δ, 49Ε, 49ΣΤ**), σε εκχύλισμα απομονωμένων μιτοχονδρίων κυττάρων HepG2mtGFP (**Εικόνα 49A**), HepG2 (**Εικόνα 49B, 49Γ, 49Δ, 49Ε**), και HepG2mtGFPGR (**Εικόνα 49A, 49Ε, 49ΣΤ**). Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε και ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών μιτοχονδριακού εκχυλίσματος από τις παραπάνω κυτταρικές σειρές, με τη χρήση αντισώματος mIgG, ως συνθήκη αναφοράς. Η τελική συγκέντρωση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση ήταν 1 μg. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση (Western blot), με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι των παραπάνω μορίων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευσή τους.

Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αντισώματος έναντι του GR (GR-G5 SC-393232) επέτρεψαν την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης GR με PDH τόσο στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFP (**Εικόνα 49A**), όσο και κυττάρων HepG2 (**Εικόνα 49B, 49Γ, 49Δ, 49Ε**), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση PDH με GR λαμβάνει χώρα και υπό συνθήκες ύπαρξης ενδογενών επιπέδων έκφρασης του mtGR.

Επίσης, με την χρήση του αντισώματος 2F8 έναντι του GR (**Εικόνα 49A**), αλλά όχι με την χρήση του αντισώματος GR-G5 (SC-393232) (**Εικόνα 49A, 49Ε, 49ΣΤ**) κατέστη δυνατή η ανίχνευση και επαλήθευση της αλληλεπίδρασης PDH στο σύμπλοκο που ανοσοκατακρήμνιστηκε από μιτοχονδριακό εκχύλισμα της κυτταρικής σειράς

HepG2mtGFPGR, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαφοροποίηση στην θέση του αντιγονικού επιτόπου, που αναγνωρίζεται από τα δύο διαφορετικά αντισώματα έναντι του GR, προκαλεί διαφορετική διαμόρφωση στην χιμαιρική πρωτεΐνη GFPGR, κατά την ανοσοκατακρήμνισή της, η οποία επιτρέπει την αλληλεπίδραση GR – PDH στην περίπτωση της χρήσης του 2F8 αντισώματος αλλά όχι με την χρήση του GR-G5 αντισώματος. Σε καμία περίπτωση, δεν ανιχνεύθηκε σήμα στο ανοσοκατακρημισθέν σύμπλοκο με τη χρήση του αντισώματος mIgG, γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση αντισώματος έναντι της PDH, παρατηρήθηκε η συν-κατακρήμνιση της PDH με τον GR στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα των κυττάρων HepG2mtGFPGR (**Εικόνα 49E, 49ΣΤ**) αλλά όχι σε αυτό των κυττάρων HepG2 (**Εικόνα 49Γ, 49Δ, 49Ε**). Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η υπερέκφραση του mtGR είναι απαραίτητη για την ανίχνευση της GR-PDH αλληλεπίδρασης με χρήση αντισώματος ανοσοκατακρήμνισης έναντι PDH. Παρόλα αυτά, με βάση τα παραπάνω, η επαλήθευση της αλληλεπίδρασης GR-PDH τόσο με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων ανοσοκατακρήμνισης έναντι του GR όσο και με χρήση αντισώματος έναντι PDH, αποτελεί επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των δύο αυτών μορίων.



Εικόνα 49: Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με το μιτοχονδριακό ένζυμο, αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFP (**A**), HepG2 (**B, Γ, Δ, E**) και HepG2mtGFPGR (**A, E, ΣΤ**), με ανοσοκατακρήμνιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, με την χρήση των αντισωμάτων, GR-G5 (SC-393232) και mIgG (**A-ΣΤ**). Επίσης δοκιμασία ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα τόσο κυττάρων HepG2 (**Γ, Δ, E**) όσο και HepG2mtGFPGR (**E, ΣΤ**), με χρήση αντισώματος έναντι της PDH. Όπου: **Load**: ποσότητα μιτοχονδριακού εκχυλίσματος κυττάρων HepG2mtGFP (**A**), HepG2 (**B,Γ,Δ**), και HepG2mtGFPGR (**A, E, ΣΤ**), πριν την ανοσοκατακρήμνιση Όπου: **UnB**: εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFP (**A**), κυττάρων HepG2 (**B,Γ**) και κυττάρων HepG2mtGFPGR (**A**) που δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια A/G. Κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα όπως υποδεικνύεται στο σχήμα και περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα Υλικά και μέθοδοι.

3.3 Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην καρκινογένεση

Η PDH όπως ήδη έχει αναφερθεί είναι ένα μόριο το οποίο συνδέει τη γλυκόλυση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στον καρκίνο, ο ρόλος του ενζύμου αυτού είναι καθοριστικής σημασίας για τον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, καθώς μείωση των επιπέδων του είτε απενεργοποίησή του οδηγεί σε μείωση της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης και παραγκωνισμό των μιτοχονδρίων από την κάλυψη των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου [211]. Με βάση τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας που αποδεικνύουν αλληλεπίδραση του GR με την PDH, κρίθηκε αναγκαία η διερεύνηση του ρόλου του GR στην καρκινογένεση.

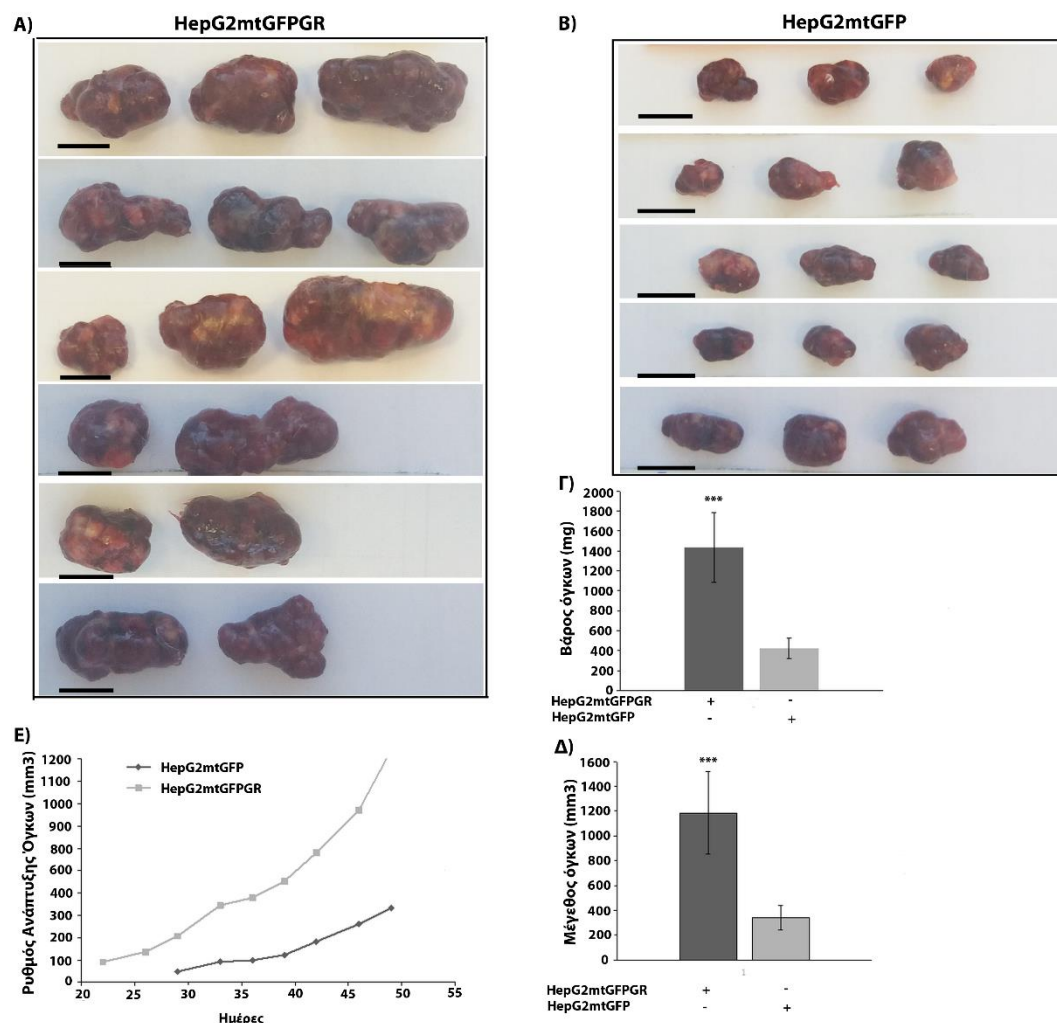
3.3.1 In Vivo μελέτες σε μύες

Αρσενικοί μύες, ηλικίας 6-8 εβδομάδων, της εταιρίας <<The Jackson Laboratory>>, οι οποίοι ήταν ανοσοκατεσταλμένοι εμβολιάστηκαν με τις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρική σειρά αναφοράς (control), για να είναι εφικτή η σύγκριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Πιο συγκεκριμένα, 8 μύες NOD-SCID, οι οποίοι δεν διέθεταν T και B λεμφοκύτταρα εμβολιάστηκαν στην πίσω μασχαλιαία χώρα υποδόρια, με 1.000.000 (**Εικόνα 50**) κύτταρα HepG2mtGFPGR και άλλοι 8 με 1.000.000 κύτταρα HepG2mtGFP. Επίσης, 20 συνολικά μύες NSG (NOD scid gamma), οι οποίοι είχαν έλλειψη των B-, T- και των NK (Natural Killer cells, <<κύτταρα φυσικούς φονείς>>)-κυττάρων εμβολιάστηκαν στην πίσω μασχαλιαία χώρα υποδόρια, είτε με 10.000 (**Εικόνα 52**) είτε με 100.000 (**Εικόνα 51**) κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR (5 μύες/συνθήκη). Σε όλες τις

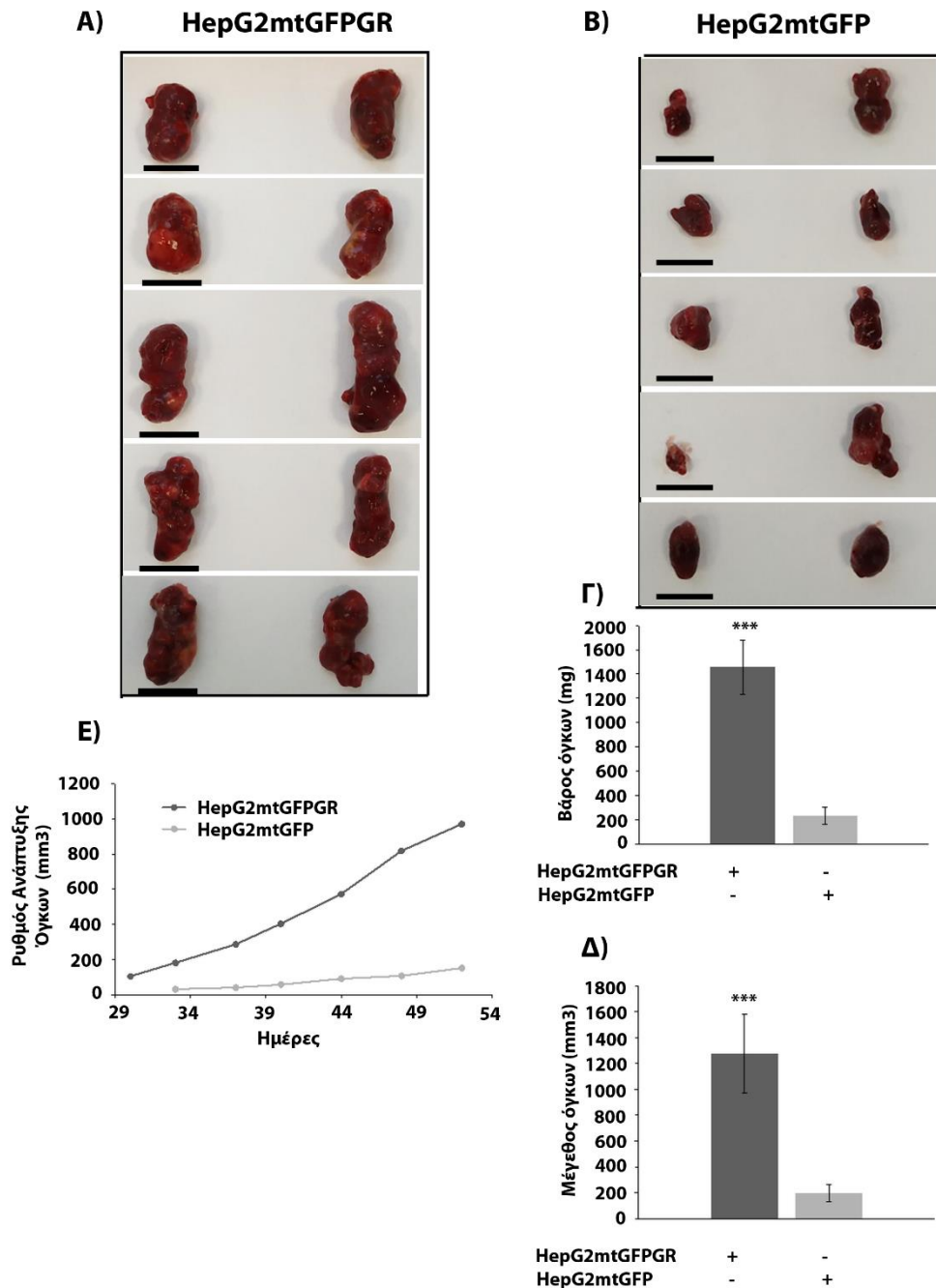
περιπτώσεις, τα κύτταρα που εμβολιάστηκαν στους μύες ήταν υπό μορφή εναιωρήματος σε θρεπτικό μέσο RPMI. Η προμήθεια, η φιλοξενία των μυών και η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό χώρο πειραματόζων, (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Κων/νος Δήμας) η θερμοκρασία του οποίου ήταν σταθερή σε θερμοκρασία 21° C, παρουσία 50% υγρασίας και 12 ωρών φώς/12 ωρών σκοτάδι. Τέλος, οι μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και φαγητό.

Στις εικόνες **50A, B, 51A, B** και **52A, B** παρουσιάζονται οι όγκοι που αναπτύχθηκαν σε κάθε κατηγορία ζώων. Η χρονική στιγμή εμφάνισης των όγκων σε πειραματόζωα που είχαν εμβολιαστεί με HepG2mtGFPGR κύτταρα προηγούνταν αυτής σε πειραματόζωα που είχαν εμβολιαστεί με HepG2mtGFP και στα τρεις κατηγορίες πειραμάτων. Έτσι, η πρώτη εμφάνιση των όγκων στους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τα 1.000.000 (**Εικόνα 50E**), 100.000 (**Εικόνα 51E**) και 10.000 (**Εικόνα 52E**) κύτταρα HepG2mtGFPGR, ανά ένεση, πραγματοποιήθηκε την 22^η, 30^η και 48^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό, αντίστοιχα. Ενώ, η πρώτη εμφάνιση των όγκων στους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τα 1.000.000 (**Εικόνα 50E**), 100.000 (**Εικόνα 51E**) και 10.000 (**Εικόνα 52E**) κύτταρα HepG2mtGFP (συνθήκη αναφοράς), ανά ένεση, παρατηρήθηκε την 29^η, 33^η και 72^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των όγκων και μέχρι την ευθανασία των μυών πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των διαστάσεων των όγκων και ζυγίσεις για την παρακολούθηση τυχόν τοξικότητας, 2 φορές την εβδομάδα. Από τις μετρήσεις αυτές προέκυψε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των όγκων στους μύες που εμβολιάστηκαν είτε με 1.000.000, είτε με 100.000, είτε με 10.000 από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των HepG2mtGFP κυττάρων (**Εικόνα 50E, 51E, 52E**). Η ευθανασία των μυών, η αφαίρεση και η μέτρηση του μεγέθους /ζύγιση των όγκων πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας, 49, 52 και 85 ημερών από τον εμβολιασμό των μυών με τα 1.000.000, 100.000 και 10.000 από τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFPGR (**Εικόνα 50A, Εικόνα 51A, Εικόνα 52A, αντίστοιχα**) και HepG2mtGFP (**Εικόνα 50B, Εικόνα 51B, Εικόνα 52B, αντίστοιχα**). Συγκεκριμένα, προέκυψαν 12 και 15 όγκοι κατά τον εμβολιασμό των μυών με 1.000.000 κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, αντίστοιχα. Από κάθε ομάδα μυών που εμβολιάστηκε με 100.000 κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, προέκυψαν συνολικά 20 όγκοι (10 όγκοι/κυτταρική σειρά). Τέλος, προέκυψαν 8 όγκοι από κάθε ομάδα μυών που είχε εμβολιαστεί με 10.000 κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, αντίστοιχα (16 όγκοι συνολικά). Στη συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός του βάρους (**Εικόνα 50Γ, 51Γ, 52Γ**) και του μέγεθους (διαστάσεις) των όγκων (**Εικόνα 50Δ, 51Δ, 52Δ**). Στις εικόνες 20, 21, 22 Γ και Δ παρουσιάζεται ο μέσος όρος (\pm SD) των μετρήσεων ανά κατηγορία. Τόσο το βάρος όσο και το μέγεθος των όγκων που προήλθαν από τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό των επίμυων εμβολιασμένων με τα κύτταρα HepG2mtGFP (Αναλογία 3: 1 στις περιπτώσεις των 1.000.000 ή 10.000, ή 7:1 στην περίπτωση των 100.000 κυττάρων). Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, στην οποία ο GR είναι υπερεκφρασμένος στα μιτοχόνδρια, εμφανίζεται πιο επιθετική, με πολύ

μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης όγκων από ότι η καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFP.

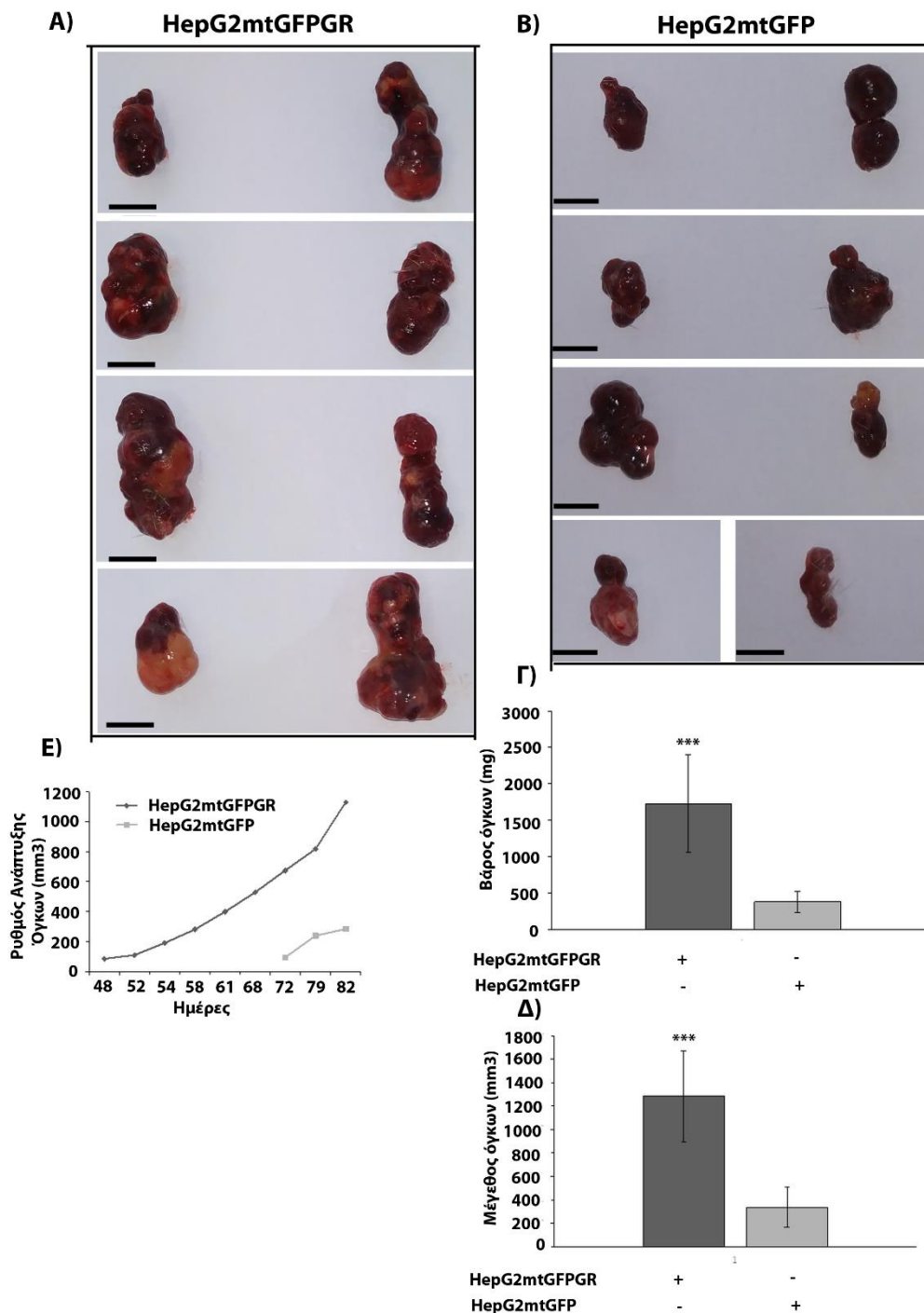


Εικόνα 50: Άυξημένος ρυθμός ανάπτυξης (**E**) των όγκων των μυών NOD-SCID που εμβολιάστηκαν με 1.000.000 κύτταρα από την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR. Αρσενικοί μύες NOD-SCID εμβολιάστηκαν με 1.000.000 κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP. Ακολούθησε μέτρηση των όγκων και καταγραφή των μετρήσεων 2 φορές την εβδομάδα κατά την ανάπτυξη των όγκων, και αφαίρεση των όγκων από τους μύες, αφού είχε προηγηθεί ευθανασία τους. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν στους μύες, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR (**A**) είναι αρκετά μεγαλύτεροι από αυτούς των κυττάρων HepG2mtGFP (**B**). Ο μέσος όρος του μεγέθους (**Γ**) και του βάρους (**Δ**) των όγκων των κυττάρων HepG2mtGFPGR μετά την ευθανασία είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από αυτό των κυττάρων HepG2mtGFP. Το μέγεθος των όγκων υπολογίζεται από την εξίσωση $(\alpha\beta^2)/2$, όπου α =μήκος, β =πλάτος του όγκου. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος + -S.D, (n=15), *** p<0.001, σε σύγκριση με αυτά από κύτταρα μάρτυρες HepG2mtGFP. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 1 cm.



Εικόνα 51: Αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης των όγκων των NSG μυών που εμβολιάστηκαν με 100.000 κύτταρα από την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR. Αρσενικοί μύες NSG εμβολιάστηκαν με 100.000 κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των όγκων πραγματοποιούνταν μετρήσεις των διαστάσεων τους 2 φορές τη βδομάδα. (Ε) Ακολούθησε ευθανασία των μυών και αφαίρεση των όγκων. Οι όγκοι που αναπτύχθηκαν στους μύες, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR (Α) είναι αρκετά μεγαλύτεροι από αυτούς των κυττάρων HepG2mtGFP (Β). Ο μέσος όρος του μεγέθους (Γ) και του βάρους (Δ) των όγκων των κυττάρων HepG2mtGFPGR μετά την ευθανασία είναι περίπου 7 φορές μεγαλύτερος από αυτόν των κυττάρων HepG2mtGFP. Το μέγεθος των όγκων υπολογίζεται από την εξίσωση $(\alpha\beta^2)/2$, όπου α =μήκος, β =πλάτος του όγκου. Τα αποτελέσματα

συγκρίνεται με αυτά από κύτταρα μάρτυρες HepG2mtGFP και εκφράζονται ως ο μέσος όρος + -S.D, (n>8), *** p<0.001. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 1 cm.



Εικόνα 52: Καρκινογένεση σε αρσενικούς μύες NSG που εμβολιάστηκαν με 10.000 κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP. Οι όγκοι των μυών, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με την κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR είχαν μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης (**Ε**) από αυτόν των κυττάρων HepG2mtGFP. Επίσης, μετά την ευθανασία παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέγεθος

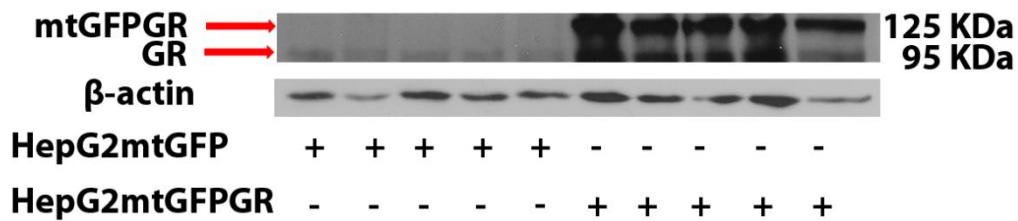
(A,B,Δ) αλλά και στο βάρος (Γ) των όγκων των δύο κυτταρικών σειρών. Η αναλογία του μέσου όρου του μεγέθους και του βάρους των όγκων που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR σε σχέση με τα κύτταρα HepG2mtGFP ήταν 3:1. Το μέγεθος των όγκων υπολογίζεται από την εξίσωση $(\alpha\beta^2)/2$, όπου α =μήκος, β =πλάτος του όγκου. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αυτά από τα κύτταρα μάρτυρες HepG2mtGFP και εκφράζονται ως ο μέσος όρος + -S.D, (n=8), *** $p < 0.001$. Οι μπάρες αντιστοιχούν σε 1 cm.

3.3.2 Διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο GR επάγει καρκινογένεση

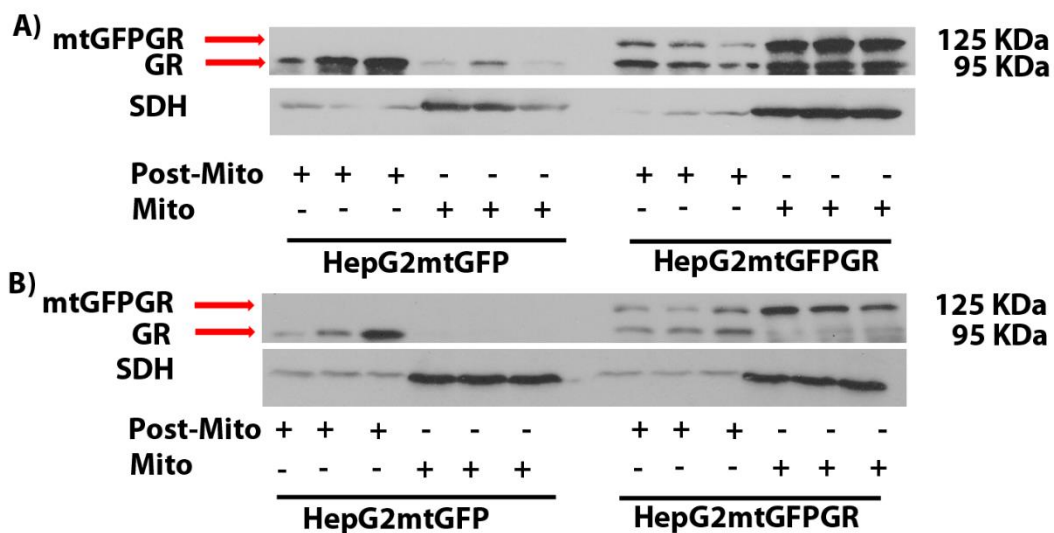
Για τη διερεύνηση και κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η υπερέκφραση του mtGR αυξάνει δραματικά την ικανότητα των HepG2 καρκινικών κυττάρων να δημιουργούν όγκους, όπως προέκυψε από τα in vivo πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μύες (**Εικόνες 50, 51 και 52**), οι όγκοι που απομονώθηκαν από τους μύες NOD-SCID (5 για κάθε κυτταρική σειρά) ομογενοποιήθηκαν με τη χρήση ομογενοποιητή Potter Elvehjem και αναλύθηκαν περαιτέρω μέσω δοκιμασίας Western blot. Επίσης, και οι όγκοι που απομονώθηκαν από τους μύες NSG, τόσο αυτοί που προέκυψαν από τον εμβολιασμό των μυών με 100.000 κύτταρα όσο κι αυτοί από τον εμβολιασμό των μυών με 10.000 κύτταρα HepG2mtGFP ή HepG2mtGFPGR (3 όγκοι από κάθε περίπτωση), ομογενοποιήθηκαν και στη συνέχεια ακολούθησε, υποκυτταρική κλασμάτωση, απομόνωση των μιτοχονδρίων τους και Western blot ανάλυση, πρωτεϊνών από εμπλουτισμένα κυτταροπλασματικά (Post-mito) όσο και τα μιτοχονδριακά (mito) κλάσματα.

Κατά τη δοκιμασία αυτή τόσο στα ολικά εκχύλισματα κυττάρων από τους όγκους που προέκυψαν από τον εμβολιασμό των μυών NOD-SCID όσο και στα κυτταροπλασματικά (Post-mito) και στα μιτοχονδριακά (mito) κλάσματα κυττάρων από τους όγκους που προέκυψαν από τον εμβολιασμό των μυών NSG, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης μιας σειράς μορίων που σχετίζονται με την αυτοφαγία, την απόπτωση, το μεταβολισμό, καθώς και άλλα μόρια που σχετίζονται με μηχανισμούς καρκινογένεσης και GR σηματοδότησης.

Αρχικά για την επιβεβαίωση του γεγονότος ότι η υπερέκφραση του mtGR εξακολουθεί να διατηρείται, στους όγκους που αναπτύχθηκαν και απομονώθηκαν από τους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με την καρκινική σειρά HepG2mtGFPGR, πραγματοποιήθηκε Western blot ανάλυση με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του GR (GRH300, SC-8992) τόσο στο ολικό εκχύλισμα (**Εικόνα 53**), όσο και στα μιτοχονδριακά κλάσματα (**Εικόνα 54**).



Εικόνα 53: Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης του mtGFPGR σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων από όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό μυών NOD-SCID, με την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR μέσω δοκιμασίας Western blot. Οι όγκοι που προήλθαν από τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα HepG2mtGFP χρησιμοποιήθηκαν ως συνθήκη αναφοράς (control). Κατά τη δοκιμασία Western blot έγινε χρήση του αντισώματος GR-H300, έναντι του GR, για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του, καθώς και χρήση αντισώματος έναντι β-ακτίνης, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.



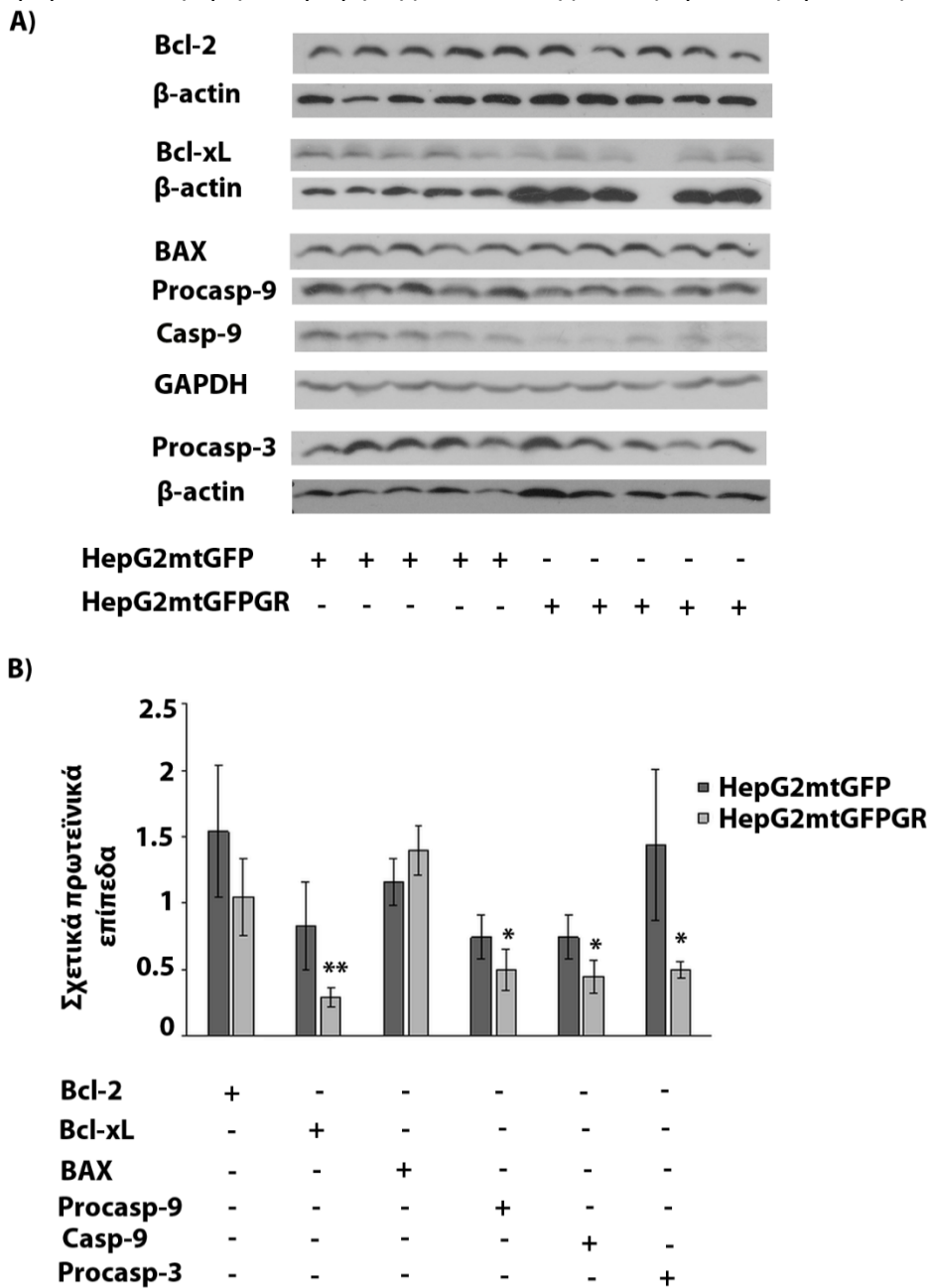
Εικόνα 54: Έλεγχος της υπερέκφρασης του mtGR σε κυτταροπλασματικά (post-mito) και μιτοχονδριακά (mito) κλάσματα κυττάρων από όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό μυών NSG, με 100.000 (**A**) ή 10.000 (**B**) από την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR μέσω δοκιμασίας Western blot. Αντίστοιχη μελέτη σε όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό των μυών NSG με τα κύτταρα HepG2mtGFP αποτέλεσε τη συνθήκη αναφοράς (control). Για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα έναντι του GR (SC-393232, Santa Cruz).

3.3.2.1 Ο ρόλος του mtGR στην απόπτωση κατά την καρκινογένεση

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου του mtGR στη ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών καθώς και του εξίσου σημαντικού ρόλου της απόπτωσης στην καρκινογένεση, διερευνήσαμε κατά πόσο η παρουσία του mtGR επηρεάζει την καρκινογένεση μέσω ρύθμισης των αποπτωτικών διεργασιών. Ο έλεγχος διαφόρων αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών μορίων πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή Western blot ανάλυσης, σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα όγκων που αφαιρέθηκαν από τους μύες NOD-SCID, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τις προαναφερθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-xL (πρωταρχική μελέτη διερεύνησης των επιπέδων του μορίου Bcl-xL παρουσιάζεται στην διπλωματικής εργασίας της προπτυχιακής φοιτήτριας Γιαννάκου Μαρίας), των προ-αποπτωτικών μορίων BAX, προκασπάση-9 και προκασπάση-3, καθώς και του αποπτωτικού μορίου κασπάση 9 (**Εικόνα 55**). Όπως φαίνεται στο σχήμα, τα επίπεδα των πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-XI εμφανίζονται μειωμένα στους όγκους που είχαν εμβολιαστεί με την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, σε σχέση με αυτά στους όγκους που εμβολιάστηκαν με την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFP. Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική, μόνο όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Bcl-XI. Επίσης, στατιστικά σημαντική μείωση παρουσίασαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών 9 και 3, καθώς και της κασπάσης 9 ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της πρωτεΐνης BAX μεταξύ των όγκων από τις δύο καρκινικές σειρές. Όλα τα παραπάνω, με εξαίρεση τη μείωση της κασπάσης-9, συνηγορούν στο γεγονός ότι στους όγκους που είχαν εμβολιαστεί με την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR λαμβάνει χώρα μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή είναι μη αναμενόμενη, καθώς το μέγεθος των όγκων αυτής της κυτταρικής σειράς ήταν πολύ μεγαλύτερο από αυτό της συνθήκης αναφοράς. Η μείωση των προκασπασών, καθώς και της κασπάσης 9 στους όγκους αυτούς, πιθανόν να οφείλεται σε ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας, καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η αυτοφαγία μπορεί να ανταγωνίζεται την απόπτωση προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων [225]. Επίσης, η αυτοφαγία επάγει την πρωτεόλυση ορισμένων μορίων που συμμετέχουν σε μηχανισμούς απόπτωσης. Για παράδειγμα, αύξηση του p62 (ενός μορίου, το οποίο είναι μειωμένο στην αυτοφαγία) οδηγεί σε ενεργοποίηση της κασπάσης 8 και κατά συνέπεια μείωση της αυτοφαγίας, ενώ πρωτεόλυση της κασπάσης ενεργοποιεί την αυτοφαγία [226]. Ανάλογα, η παρουσία θραυσμάτων της κασπάσης 9, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της αυτοφαγίας και όχι αποτέλεσμα ελεγχόμενης πρωτεολυτικής ενεργοποίησης του ενζύμου.

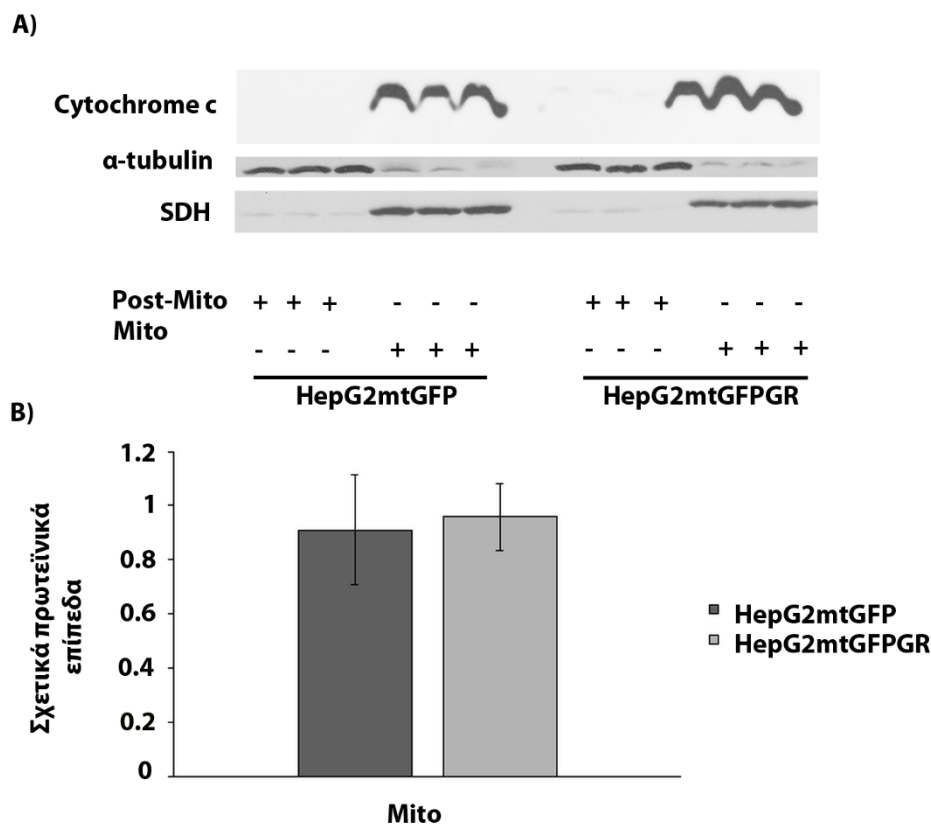
Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του ερωτήματος, πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη μελέτη σε μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά κλάσματα από όγκους μυών NSG (3 από κάθε κυτταρική σειρά), οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με 100.000 κύτταρα από τις προαναφερθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπου και ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του κυτοχρώματος c, όπως φαίνεται στην **εικόνα 56**. Τα επίπεδα του μορίου αυτού δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές,

μεταξύ των όγκων που προέκυψαν από τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, το κυτόχρωμα c ανιχνεύεται όλο εντός του μιτοχονδρίου, γεγονός που επιβεβαιώνει την μη επαγωγή της απόπτωσης στους προαναφερθέντες όγκους.



Εικόνα 55: A) Διερεύνηση των επιπέδων μορίων που σχετίζονται με αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά την από mtGR επαγόμενη καρκινογένεση. Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Bcl-2, Bcl-xL, BAX, προκασπάσης 9 και 3, καθώς και της κασπάσης 9πραγματοποιήθηκε μέσω δοκιμασίας Western blot και χρήση κατάλληλων εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων σε ολικό ομογενοποίημα όγκων που προήλθαν από τους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ακτίνης ή της GAPDH έγινε η κανονικοποίηση των

πρωτεϊνικών επιπέδων των προς εξέταση μορίων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.



Εικόνα 56: **A)** Διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του, κυτόχρωμα c σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (*mito*) και κυτταροπλασματικά (*post-mito*) κλάσματα από όγκους μυών NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με 100.000 κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων στα μιτοχονδριακά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH), ενώ των επιπέδων των πρωτεϊνών στα κυτταροπλασματικά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της α - τουμπουλίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=3), * $p < 0.05$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

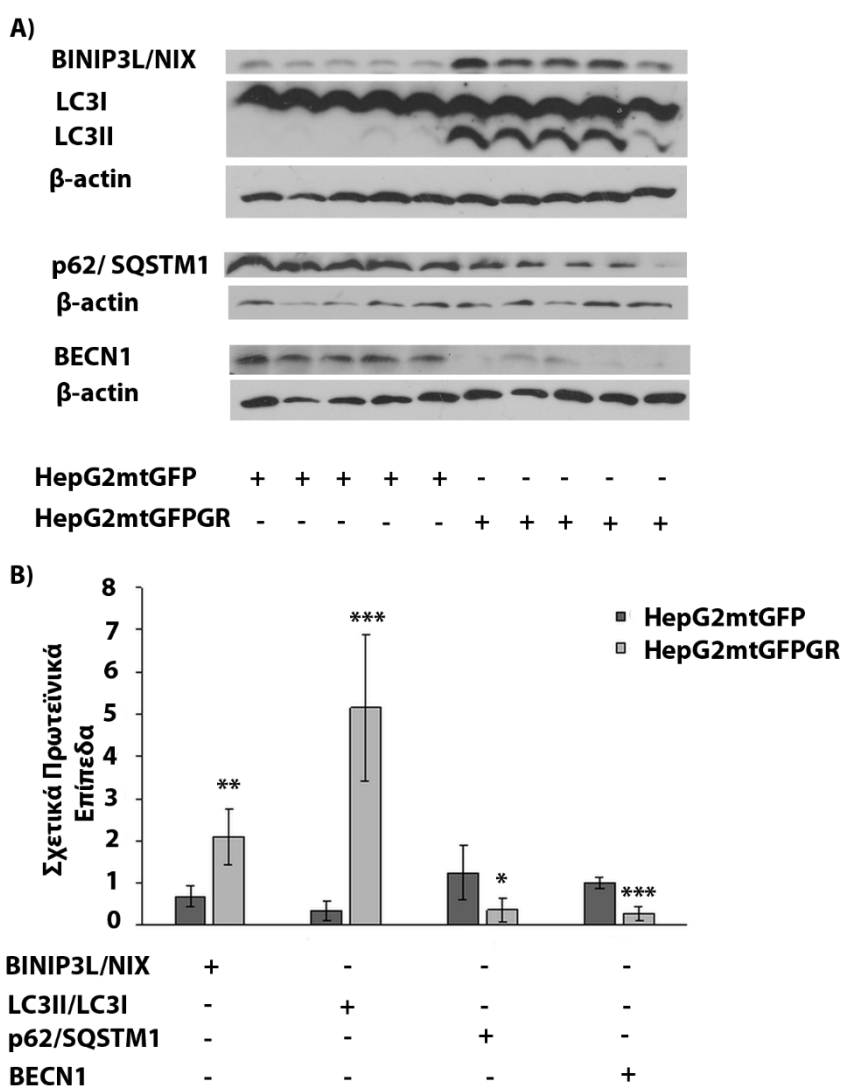
3.3.2.2 Ο ρόλος του mtGR στην αυτοφαγία

Δεδομένου ότι η αυτοφαγία σχετίζεται με μιτοχονδριακές λειτουργίες και εμπλέκεται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης, παράγοντας πρόδρομα μόρια, τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας για τα καρκινικά κύτταρα [114,143], και δεδομένου ότι παρουσία του mtGR παρατηρείται πρωτεόλυση διαφόρων αποπτωτικών μορίων, όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή του mtGR στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Για τον σκοπό αυτό κυτταρικό εκχύλισμα πρωτεϊνών από όγκους μυών NOD-SCID, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τις προαναφερθείσες καρκινικές κυτταρικές σειρές αναλύθηκε περαιτέρω με εφαρμογή δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση ειδικών αντισωμάτων για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των BINIP3L/NIX, LC3II/LC3I, p62 και BECN1 πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στην αυτοφαγία (μιτοφαγία) [114], όπως περιγράφεται στη παράγραφο **1.6**. Πιο συγκεκριμένα, για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 5 όγκοι από κάθε κατηγορία επιμύων. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 57A**, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου BINIP3L/NIX, ενός αυτοφαγικού υποδοχέα, καθώς και αυτά του μορίου LC3, το οποίο αξιολογείται ως ο λόγος LC3II (LC3 ενωμένο με την φωσφατιδυλεθανολαμίνη)/LC3I (κυτοσολική μορφή του LC3) ήταν αυξημένα στην περίπτωση των όγκων mtGFPGR κυττάρων σε σύγκριση με αντίστοιχους όγκους mtGFP κυττάρων. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων p62 και BECN1 που αποτελούν καταστολείς της καρκινογένεσης παρουσιάζαν μια στατιστικά σημαντική μείωση στους όγκους mtGFPGR κυττάρων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, αυξημένα επίπεδα του λόγου LC3II/LC3I και μειωμένα επίπεδα του μορίου p62, το οποίο αποικοδομείται μετά την έναρξη της αυτοφαγίας [227,228], υποδηλώνουν την επαγωγή της αυτοφαγίας. Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι στους όγκους, οι οποίοι απομονώθηκαν από τους μύες που είχαν εμβολιαστεί με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR λαμβάνει χώρα ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας.

Η επιβεβαίωση των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων διερευνήθηκε επίσης και σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό των μυών NSG με 100.000 (**Εικόνα 58A**) και 10.000 (**Εικόνα 58B**) κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αυτών αναλύθηκαν με δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης. Με τη χρήση ειδικού αντισώματος ελέγχθηκαν και σε αυτήν την περίπτωση, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου BINIP3L/NIX (**Εικόνα 58**) τόσο στα κυτταροπλασματικά (**post-mito**) όσο και στα μιτοχονδριακά (**mito**) κλάσματα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου αυτού παρουσιάζαν αύξηση στα μιτοχονδριακά κλάσματα κυττάρων από όγκους των επιμύων που εμβολιάστηκαν είτε με 100.000 είτε με 10.000 κύτταρα από την καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με τους όγκους των μυών που προέκυψαν από τον εμβολιασμό με τα κύτταρα μάρτυρες επιβεβαιώνοντας την επαγωγή αυτοφαγίας, παρουσία mtGR. Η εντόπιση του μορίου BINIP3L/NIX είναι κατά κύριο ρόλο μιτοχονδριακή [229], όπως φαίνεται και στην **εικόνα 30A, 30B**, ωστόσο μπορεί να εντοπίζεται και στον πυρήνα, στο σαροπλασματικό δίκτυο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο [230,231]. Τέλος, στο σημείο αυτό πρέπει να

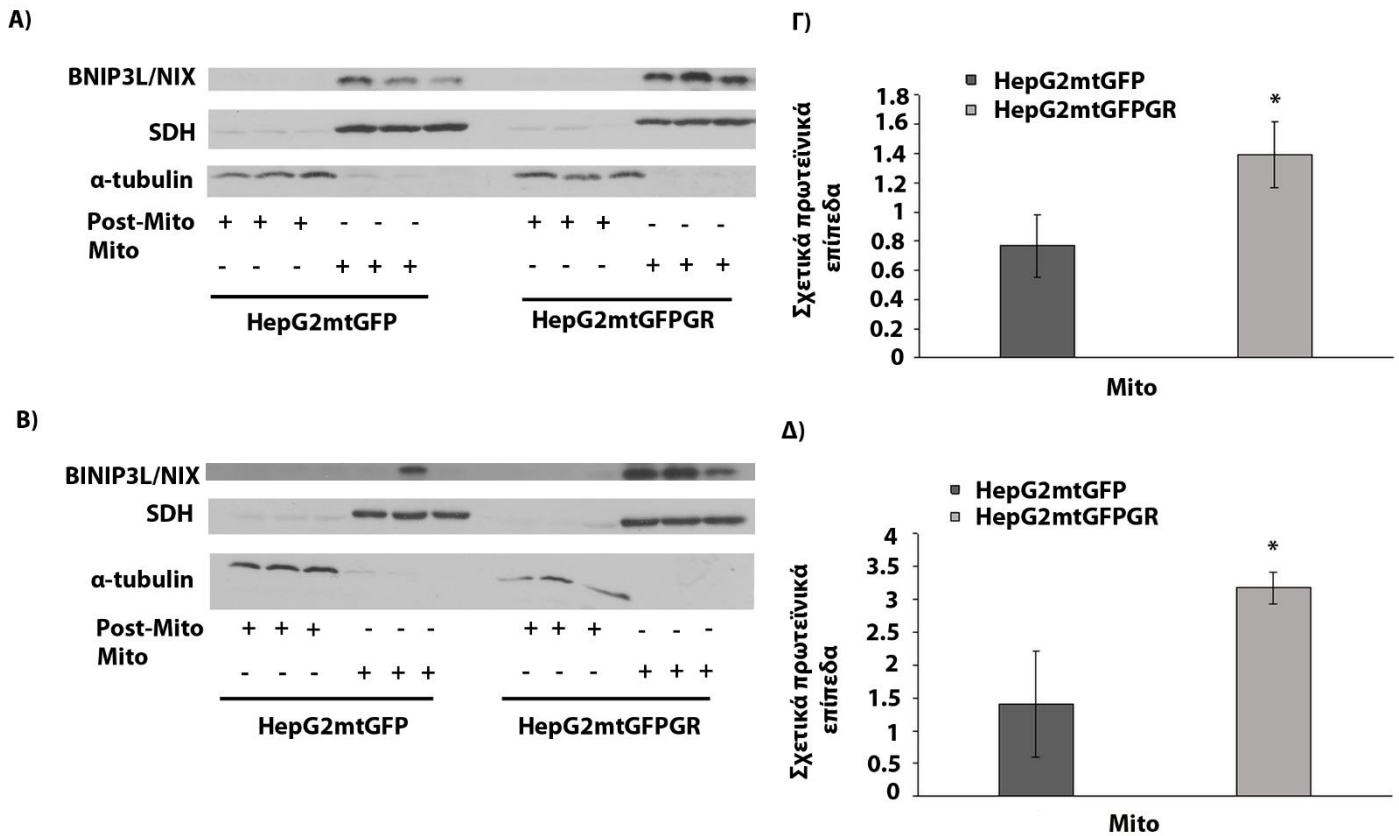
αναφερθεί ότι είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα αυξημένα επίπεδα του μορίου BINIP3L/NIX, λόγω επαγωγής μιτοφαγίας, εμποδίζουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και έτσι το κυτόχρωμα c παραμένει εντός του μιτοχονδρίου (πράγμα το οποίο εξηγεί και τη μιτοχονδριακή εντόπιση του κυτοχρώματος c και συνεπώς τη μη διεξαγωγή της απόπτωσης που παρατηρήθηκαν παραπάνω) [232].

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα από το ολικό εκχύλισμα των όγκων των μυών NOD-SCID που αναλύθηκαν πιο πάνω, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση για επαγωγή της μιτοφαγίας, παρουσία του mtGR.



Εικόνα 57: **A)** Επαγωγή του μηχανισμού της αυτοφαγίας από τον mtGR στους όγκους που προήλθαν από τους μύες NOD-SCID. Πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Western blot, με χρήση ειδικών, εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων, για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων BINIP3L/NIX, LC3, p62 και BECN1 και β ακτίνης τόσο σε όγκους των μυών, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με την κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR όσο και σε όγκους αυτών που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFP (συνθήκη αναφοράς). **B)** Σχετικά επίπεδα έκφρασης των

προαναφερθέντων μορίων μετά την κανονικοποίηση τους με αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Τα επίπεδα του μορίου LC3, προέκυψαν ως ο λόγος LC3II/LC3I, κανονικοποιημένος ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της ακτίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων σε όγκους που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

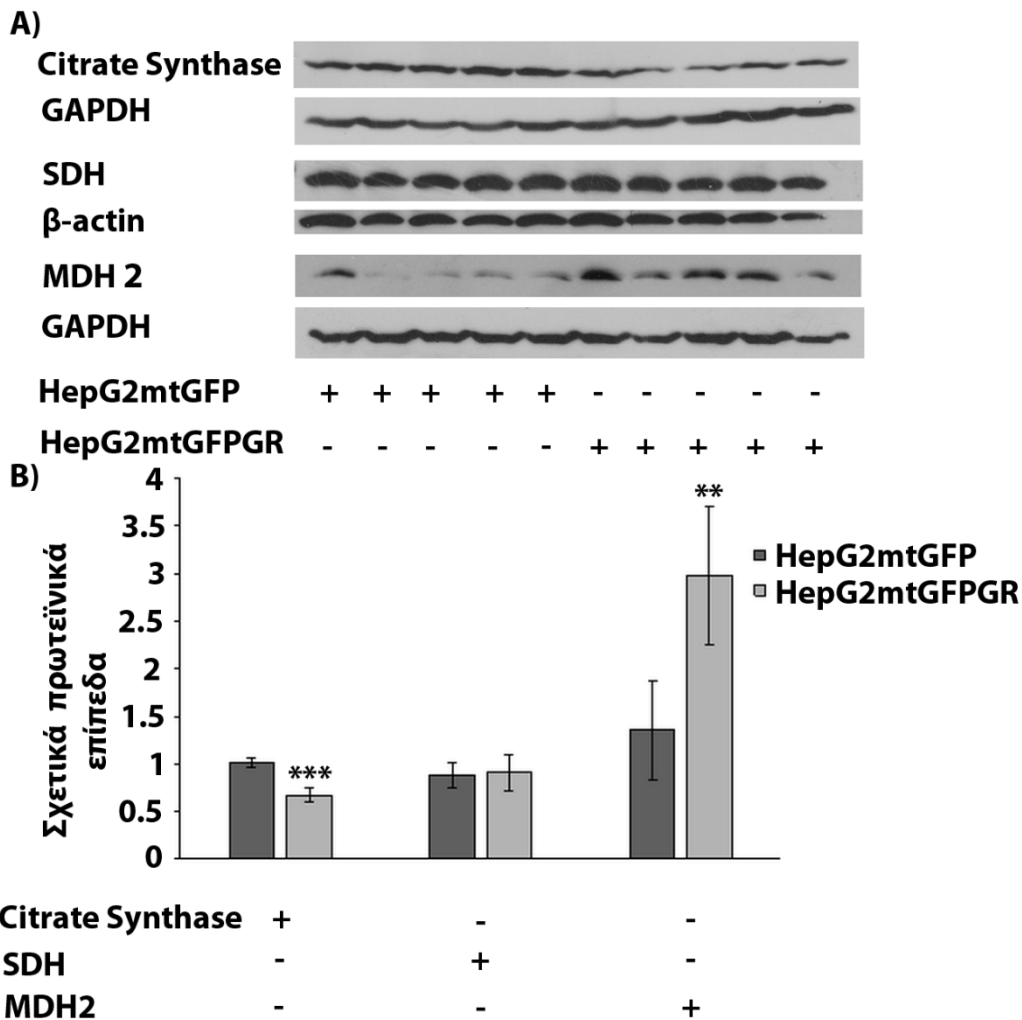


Εικόνα 58: A, B) Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων του μορίου BINIP3L/NIX (**30A, 30B**) σε κυτταροπλασματικά (*post-mito*) και μιτοχονδριακά (*mito*) κλάσματα, μετά από ομογενοποίηση και υποκυτταρική κλασμάτωση των όγκων που προήλθαν από τους μύες NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν είτε με 100.000 (**30A, 30Γ**) είτε με 10.000 (**30B, 30Δ**) κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **Γ,Δ)** Η κανονικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα μιτοχονδριακά κλάσματα έγινε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=3), * $p < 0.05$, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

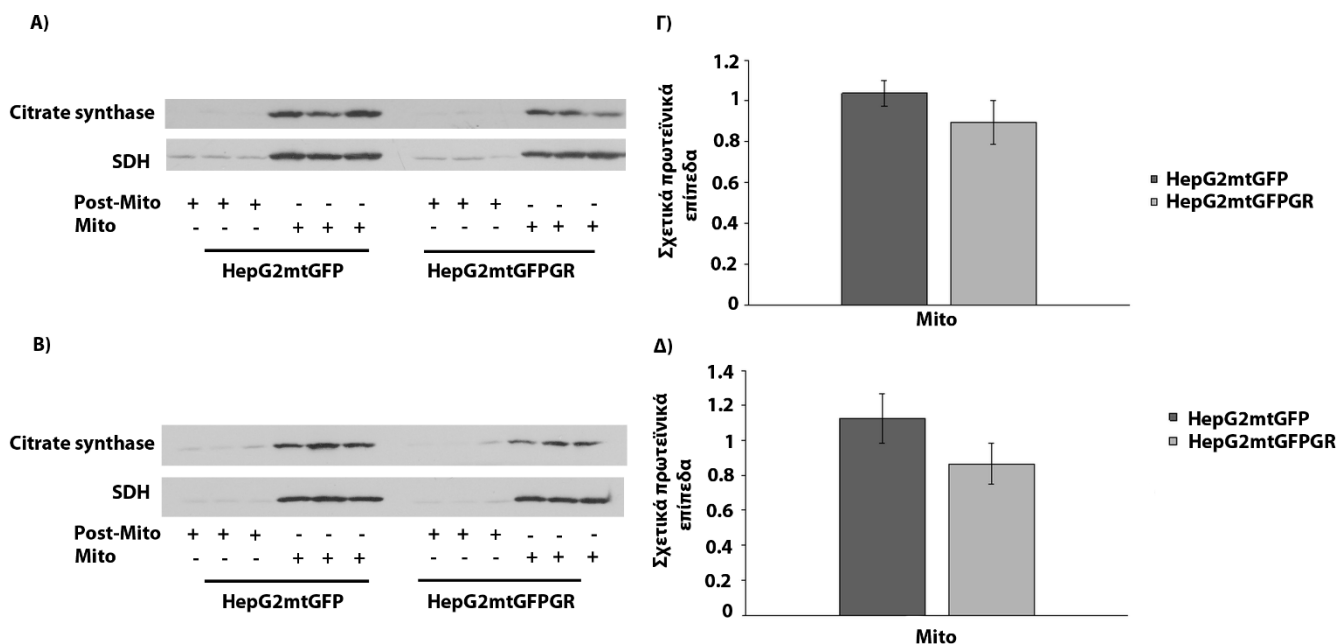
3.3.2.3 Επίδραση του mtGR στη μεταβολική οδό του κύκλου του Krebs

Οι ενεργειακές απαιτήσεις των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες καλύπτονται μέσω της παραγωγής πρόδρομων μορίων από την αυτοφαγία, όπως και προαναφέρθηκε, μπορούν να εξασφαλισθούν και από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μέσω της βιοσυνθετικής πορείας. Για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση στους όγκους των μυών NOD-SCID, που προήλθαν από τους προαναφερθέντες τύπους κυττάρων, εφαρμόζοντας την ανάλυση κατά Western. Τα ένζυμα των οποίων τα επίπεδα ελέγχθηκαν ήταν η συνθάση του κιτρικού οξέος, η αφυδρογονάση του μηλικού οξέος (MDH 2) (πρωταρχική μελέτη διερεύνησης των επιπέδων του μορίου MDH 2 παρουσιάζεται στην διπλωματικής εργασίας της προπτυχιακής φοιτήτριας Γιαννάκου Μαρίνας), καθώς και η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (SDH) (**Εικόνα 59**). Τα επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού οξέος παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντική μείωση στους όγκους των μυών που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR. Αντίθετα, τα επίπεδα της MDH2 παρουσίασαν μια στατιστική σημαντική αύξηση, στους ίδιους όγκους. Τέλος, τα επίπεδα της SDH δεν μεταβάλλονται μεταξύ των όγκων που προέρχονται από τις δύο κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με το Warburg effect, η απώλεια του ενζύμου της συνθάσης του κιτρικού οξέος, η οποία καταλύει την πρώτη αντίδραση του κύκλου του κιτρικού οξέος, αλλάζει τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, αποδυναμώνοντας τη συνεισφορά του κύκλου του Krebs στη παραγωγή ενέργειας και ενισχύοντας μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας μέσω ενεργοποίησης της γλυκολυτικής οδού, έναντι αυτής της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [233]. Επίσης, από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στο καρκίνο αυξάνονται τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος [234], ενός ενζύμου, το οποίο καταλύει τη μετατροπή του μηλικού σε οξαλοξικό. Αυτό πιθανόν να αποσκοπεί στην παραγωγή πρόδρομων μορίων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα σε βιοσυνθετικές πορείες. Συνεπώς, η διαφορική έκφραση των δύο αυτών ενζύμων στους όγκους που προέκυψαν από τους δύο αυτούς κυτταρικούς τύπους, συνάδει με τους αυξημένους ρυθμούς καρκινογένεσης στους όγκους που προήλθαν από τα HepG2mtGFPGR κύτταρα.

Περαιτέρω επαλήθευση και διερεύνηση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (**mito**) και κυτταροπλασματικά κλάσματα (**post-mito**) από όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό των επιμύων NSG με 100.000 (**Εικόνα 60A**) και 10.000 (**Εικόνα 60B**) κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Όπως αναμενόταν, η συνθάση του κιτρικού οξέος εντοπίστηκε αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια (**Εικόνα 60**). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υπό μελέτη μορίου παρουσιάζουν μια σχετική μείωση στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν τόσο με τα 100.000 όσο και με τα 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR σε σχέση με τους όγκους αναφοράς (**Εικόνα 60**) η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Η τάση μείωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος συμφωνεί με τις παρατηρήσεις που προέκυψαν από πειράματα που διεξήχθησαν στο ολικό εκχύλισμα των όγκων των μυών NOD-SCID που αναλύθηκαν πιο πάνω.



Εικόνα 59: Επίδραση της υπερέκφρασης του mtGR σε ένζυμα της μεταβολικής πορείας του κύκλου του κιτρικού οξέος **A)** Ανάλυση κατά Western των πρωτεϊνικών επιπέδων των ενζύμων συνθάσης του κιτρικού οξέος και αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, μέσω δοκιμασίας Western blot στους όγκους των μυών, που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό τους με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της Western blot ανάλυσης. Προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων της GAPDH πραγματοποιήθηκε με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την μελέτη των προς εξέταση μορίων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=5), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.



Εικόνα 60: Διαφορική έκφραση της συνθάσης του κιτρικού οξέος κατά την υπερέκφραση του mtGR. **A, B**) Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων του μορίου συνθάσης του κιτρικού οξέος σε κυτταροπλασματικά (*post-mito*) και μιτοχονδριακά (*mito*) κλάσματα των όγκων των μυών NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με 100.000 (**32A**) και 10.000 (**32B**) κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων **Γ,Δ**) Η κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα μιτοχονδριακά κλάσματα έγινε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH).

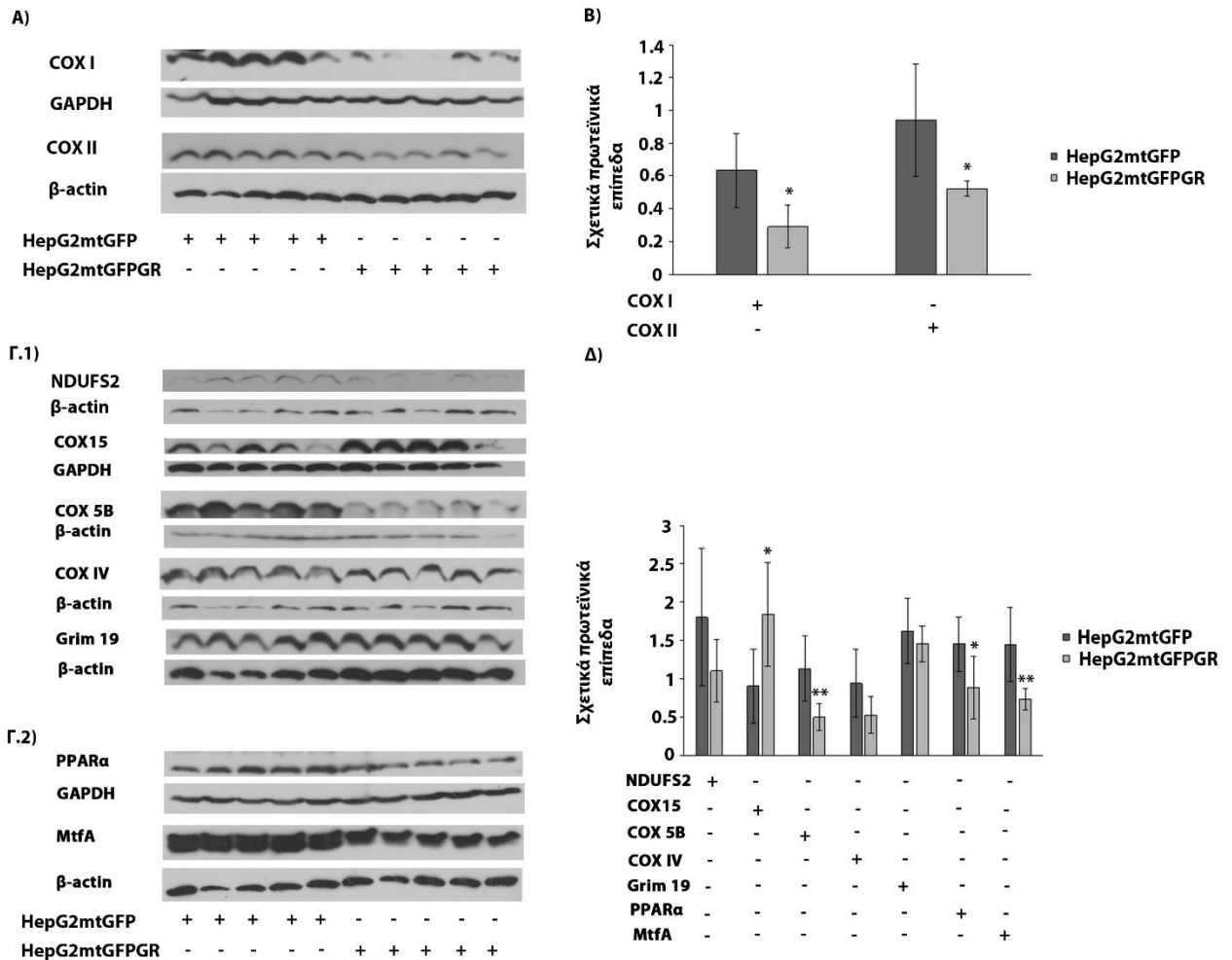
3.3.2.4 Ο ρόλος του mtGR στη Βιοσύνθεση ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας- οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κατά την καρκινογένεση

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον ρόλο του mtGR στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και δεδομένου των αλλαγών που παρατηρήθηκαν στον κύκλο του κιτρικού οξέος, για την επαλήθευση της μειωμένης συνεισφοράς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην παραγωγή ενέργειας, διερευνήθηκε η έκφραση πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων ενζύμων αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) καθώς και πυρηνικά κωδικοποιούμενων μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμιστών της μιτοχονδριακής μεταγραφής, κατά την ανάπτυξη όγκων. Με εφαρμογή δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης μιτοχονδριακά (**Εικόνα 61A, 61B**) και πυρηνικά (**Εικόνα 61Γ1, 61Δ**) κωδικοποιούμενων υπομονάδων ενζύμων αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από όγκους που απομονώθηκαν από τους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τα κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Τα μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα OXPHOS μόρια που εξετάστηκαν ήταν τα εξής: 1) η υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX I), και 2) η υπομονάδα II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c

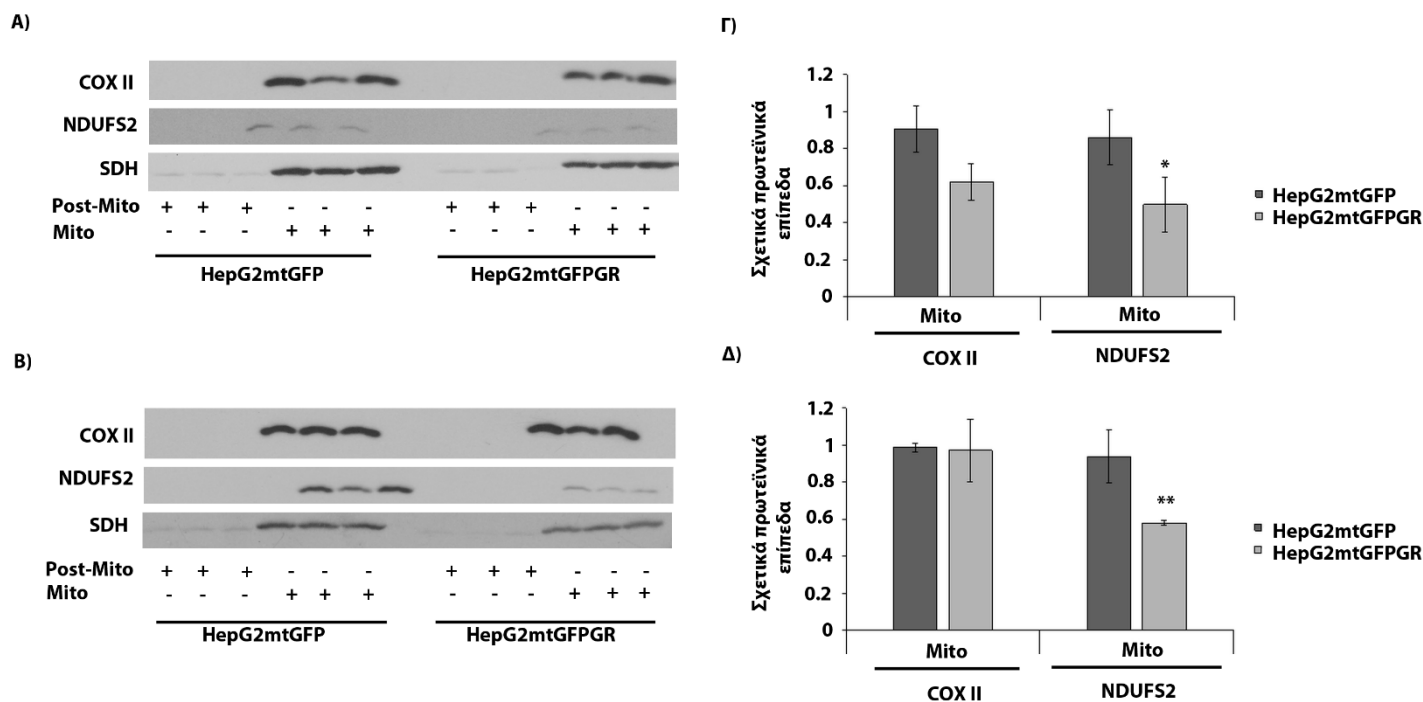
(COXII). Στο σύνολο τους, τα πρωτεϊνικά επίπεδα όλων των παραπάνω μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων μειώνονται στους όγκους που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR. Τα πυρηνικά κωδικοποιούμενα μόρια που μελετήθηκαν ήταν: η φέρουσα σύμπλοκα Fe-S υπομονάδα II της αφυδρογονάσης NADH (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein II, mitochondrial, NDUF52), η οξειδάση του κυτοχρώματος c, η ομόλογη της πρωτεΐνης συναρμολόγησης COX15 (Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog, COX15), η υπομονάδα VB της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Cytochrome c oxidase subunit 5B, COX5B), η υπομονάδα IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Cytochrome c oxidase subunit 4, COXIV), υπομονάδα 13 της αφυδρογονάσης NADH (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13, GRIM 19 ή NDUF13) (**Εικόνα 61Γ1, 61Δ**) καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες PPARα (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) και MtfA (Mitochondrial transcription factor A) (**Εικόνα 61Γ2, 61Δ**). Μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων NDUF52, COX5B, COXIV, GRIM 19, PPARα και MtfA και αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μορίου COX15 παρατηρήθηκε στους όγκους που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR. Η μείωση των περισσότερων πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων στους ιστούς αυτούς συνάδει με την παρατηρούμενη μείωση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ενίσχυση της αναερόβιας γλυκόλυσης κατά την ανάπτυξη όγκων. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα του COX15 υποστηρίζονται από δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας, καθώς υπερέκφραση του γονιδίου COX15 σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως τα HeLa έχει ως αποτέλεσμα τον γρήγορο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών [235].

Περαιτέρω επαλήθευση και διερεύνηση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (**mito**) και κυτταροπλασματικά κλάσματα (**post-mito**) από όγκους που προήλθαν από τον εμβολιασμό των επιμύων NSG τόσο με 100.000 (**Εικόνα 62Α, 62Γ**), όσο και με 10.000 (**Εικόνα 62Β, 62Δ**) κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του μορίου NDUF52 που σχετίζεται με ενεργειακό μεταβολισμό, στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν τόσο με τα 100.000 (**Εικόνα 62Α**) κύτταρα όσο και με τα 10.000 (**Εικόνα 62Β**) HepG2mtGFPGR. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του COX II, παρουσίαζαν μια τάση μείωσης στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν με τα 100.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, ενώ δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων του συγκεκριμένου μορίου στους όγκους των μυών που εμβολιάστηκαν με 10.000 κύτταρα από τις δύο κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα αυτά, συγκρινόμενα με αυτά που προέκυψαν από μύες NOD-SCID, μετά τη διαμόλυνση τους με 1.000.000 κύτταρα, πιθανόν να υποδηλώνουν ότι η παρατηρούμενη μείωση της COX II, στους αναπτυσσόμενους όγκους, σχετίζεται με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων και αυξάνει ανάλογα με αυτόν. Επιπρόσθετα, η παρατηρούμενη μείωση της NDUF52, ανεξάρτητα από τον αρχικό αριθμό των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό, αναδεικνύει την σημαντικότητα του ρυθμιστικού ρόλου του ενζύμου

αυτού, ως πρώτο ενζυμικό σύμπλοκο κατά την αναγωγή του O₂ και τη μεταφορά ηλεκτρονίων.



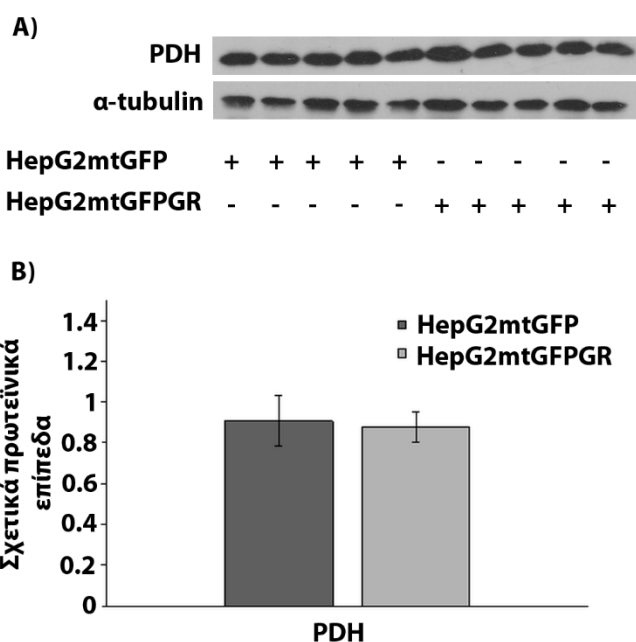
Εικόνα 61: Επίδραση mtGR στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και βιοσύνθεση ΟΧΡΗΟΣ. Συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων ΟΧΡΗΟΣ COX I, COX II, (A) των πυρηνικά κωδικοποιούμενων ΟΧΡΗΟΣ, NDUFS2, COX15, COX5B, COXIV, και Grim 19 (Γ1) καθώς των πυρηνικά κωδικοποιούμενων μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμιστών της μιτοχονδριακής μεταγραφής, PPARα, MtfA, (Γ2) σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα όγκων που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό επίμυων με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, με εφαρμογή δοκιμασίας κατά Western Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε παράλληλα ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β ακτίνης και της GAPDH, μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων (B, Δ). Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο ± S.D, (n=5), * p<0.05, ** p<0.01 και εκφράζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.



Εικόνα 62: A,B) Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων COXII και NDUF52 σε μιτοχondριακά (*mito*) κλάσματα, μετά από ομογενοποίηση και υποκυτταρική κλασμάτωση των όγκων που προήλθαν από τους μύες NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν είτε με 100.000 (**A,Γ**) είτε με 10.000 (**B,Δ**) κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Η κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα μιτοχondριακά κλάσματα έγινε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=3), * p< 0.05, ** p<0.01 σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

3.3.2.5 GR και PDH

Η προαναφερθείσα παρατήρηση της αλληλεπίδρασης mtGR-PDH μας ώθησε να διερευνήσουμε την πιθανή διαφορική έκφραση της PDH στους όγκους που προέκυψαν από τους δύο τύπους κυττάρων. Ο έλεγχος των επιπέδων του ενζύμου αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH) (**Εικόνα 63**) πραγματοποιήθηκε μέσω δοκιμασίας Western blot στους όγκους που απομονώθηκαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου αυτού, δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση του mtGR με την PDH πιθανόν να οδηγεί σε αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου, οι οποίες να ευθύνονται ή/και να συμβάλλουν στον παρατηρούμενο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό.



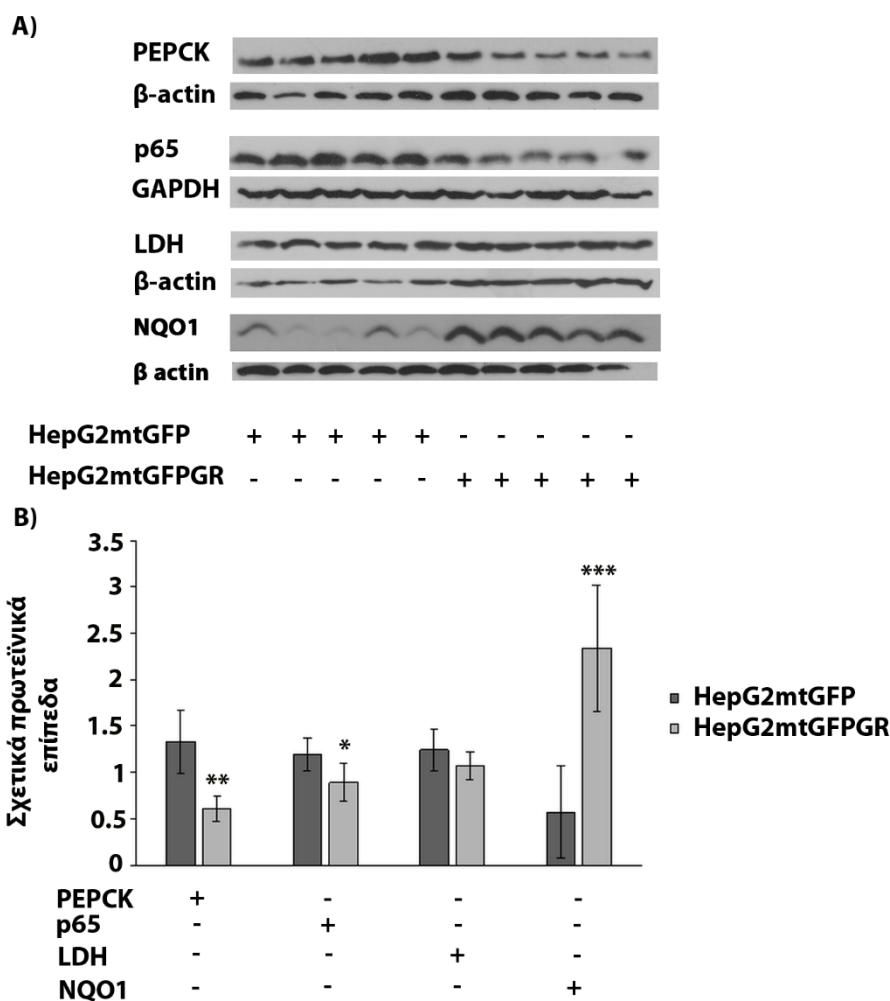
Εικόνα 63: **A)** Επίδραση mtGR στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος στους απομονωμένους όγκους, από τους μύες που είχαν εμβολιαστεί με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο \pm S.D, (n=5), και εκφράζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων σε όγκους που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

3.3.2.6 Επίδραση του mtGR στην γλυκονεογένεση και στη φλεγμονή

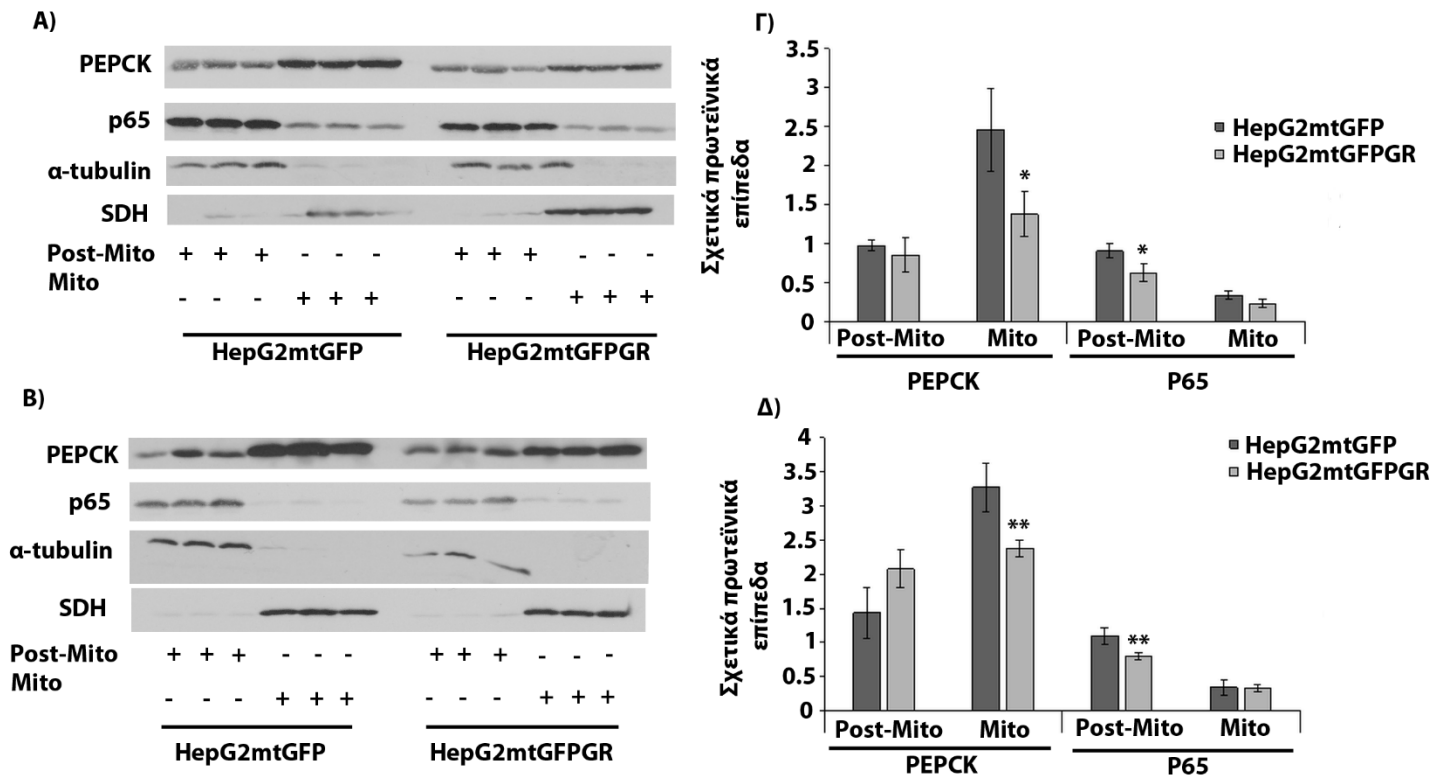
Δεδομένης της σημαντικότητας της ρύθμισης του μεταβολισμού της γλυκόζης και των αντι-φλεγμονωδών αποκρίσεων κατά την καρκινογένεση, καθώς και του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει ο GR στη ρύθμιση αυτών των διαδικασιών αυτών, δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης εφαρμόστηκε για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του γλυκογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), καθώς και της υπομονάδας p65 (**Εικόνα 64**), του παράγοντα φλεγμονής NFκB, στους όγκους που απομονώθηκαν από τους μύες NOD-SCID, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Επίσης, ελέγχθηκαν και τα επίπεδα του ενζύμου της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (LDH) (**Εικόνα 64**), ενός ενζύμου που καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ και αντίστροφα και το οποίο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση [236]. Τέλος ελέγχθηκαν και τα επίπεδα της NAD(P)H οξειδοαναγωγάση κινονών (NAD(P)H quinone oxidoreductase, NQO1), η οποία αποτελεί μια φλαβοπρωτεΐνη που

μετατρέπει τις κινόνες σε υδροκινόνες, έχοντας αποτοξινωτικό ρόλο [224]. Τόσο τα επίπεδα της PEPCK όσο και της υπομονάδας p65, παρουσιάζουν μια στατιστικά σημαντική μείωση στους όγκους που προήλθαν από τους μύες που είχαν εμβολιαστεί με την καρκινική σειρά HepG2mtGFPGR. Το γεγονός ότι μειώνεται η PEPCK οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στους όγκους αυτούς μειώνεται η γλυκονεογένεση ενώ είναι πιθανό να ευνοείται η γλυκολυτική πορεία και να επαναπρογραμματίζεται ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός, γεγονός το οποίο ισχύει και σε ορισμένους τύπους καρκίνων σύμφωνα με το “Warburg effect” [237]. Αντίθετα, το NQO1 παρουσίασε αυξημένα επίπεδα. Τα αυξημένα επίπεδα του μορίου αυτού παρατηρούνται σε περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων ως άμυνα αυτών στο οξειδωτικό στρες, δεδομένου ότι το ένζυμο NQO1, ως αντιοξειδωτικό ένζυμο βοηθάει στην επιβίωση του κυττάρου. Επίσης, αύξηση του NQO1 στον καρκίνο ενισχύει τη γλυκολυτική πορεία (γεγονός που επιβεβαιώνει την υπόθεση για επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων) μέσω αύξησης και αναγέννησης των NAD⁺ [237-239]. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι υπερέκφραση του ενζύμου αυτού, προκαλεί αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στις χημειοθεραπευτικές αγωγές, καθώς ενισχύεται η άμυνα τους έναντι κυτταροτοξικών μηχανισμών [240]. Όσον αφορά τα επίπεδα της πρωτεΐνης LDH δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των όγκων που προκύπτουν από τις δύο κυτταρικές σειρές. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (LDH) μπορούν είτε να διαφοροποιούνται είτε όχι στον καρκίνο, καθώς υπάρχουν ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα LDH, οι οποίοι και ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία έναντι του καρκίνου [236]. Επιπλέον, δεδομένου ότι στους ιστούς αυτούς επάγεται η αυτοφαγία, η μείωση του p65 είναι αναμενόμενη, καθώς η αυτοφαγία επάγει την αποικοδόμηση συστατικών σηματοδοτικού μονοπατιού του NFκB [143].

Για την επαλήθευση και περαιτέρω διερεύνηση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη μελέτη σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων μυών NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με 100.000 (**Εικόνα 65A, 65Γ**) όσο και με 10.000 (**Εικόνα 65B, 65Δ**) κύτταρα από τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων PEPCK και p65 (**Εικόνα 65A, 65Γ**) που σχετίζονται με ενεργειακό μεταβολισμό και φλεγμονή αντίστοιχα, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν με τα 100.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR. Επίσης, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων PEPCK και p65 (**Εικόνα 65B, 65Δ**) παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση στα μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα, αντίστοιχα, των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν με τα 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR σε σχέση με τους όγκους αναφοράς (**Εικόνα 65**). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα από το ολικό εκχύλισμα των όγκων των μυών NOD-SCID που αναλύθηκαν πιο πάνω.



Εικόνα 64: Μείωση των επιπέδων γλυκονογενετικών, γλυκολυτικών και φλεγμονωδών μορίων στους όγκους που προήλθαν κατά τον εμβολιασμό μυών με κύτταρα που υπερεκφράζουν mtGR. **A)** Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων PEPCK, p65 και LDH μέσω δοκιμασίας Western blot στους όγκους που προήλθαν από τους εμβολιασμένους μύες με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων μετά την κανονικοποίηση των επιπέδων των μορίων ενδιαφέροντος ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β ακτίνης. Οι τιμές αναπαριστούν το μέσο όρο \pm S.D, (n=5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και εκφράζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.



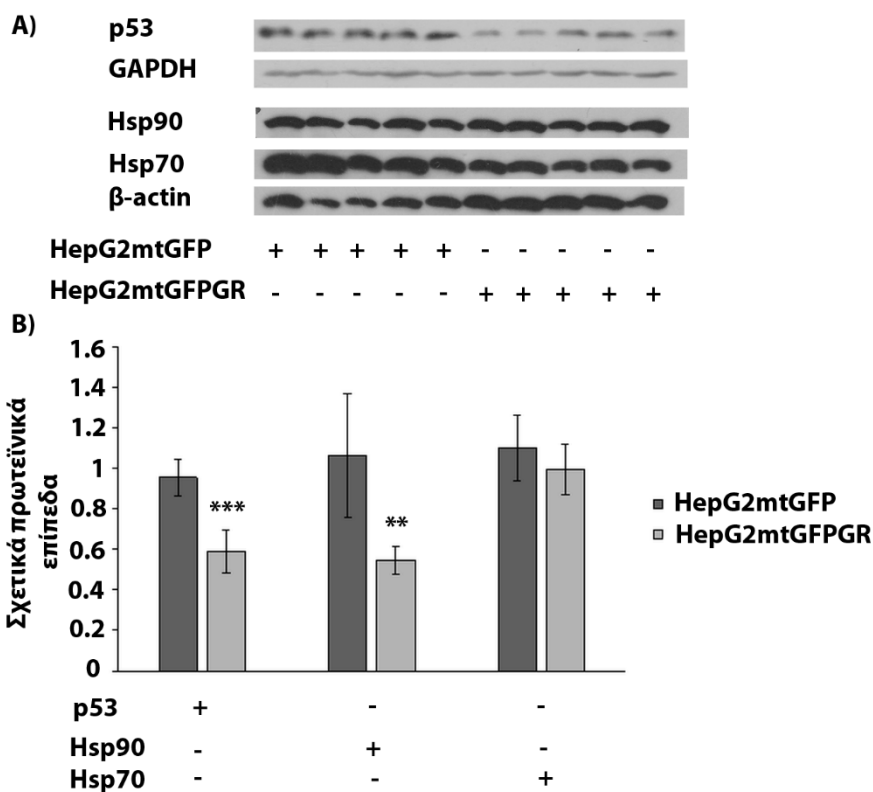
Εικόνα 65: A,B) Διερεύνηση της επίδρασης mtGR στα επίπεδα έκφρασης μιτοχονδριακών μορίων που εμπλέκονται σε γλυκονεογένεση (PEPCK) και φλεγμονή (P65) σε κυτταροπλασματικά (*post-mito*) και μιτοχονδριακά (*mito*) κλάσματα όγκων που προήλθαν από τους μύες NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν είτε με 100.000 (**A,Γ**) είτε με 10.000 (**B,Δ**) κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **Γ,Δ)** Η κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα κυτταροπλασματικά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-τουμπουλίνης, ενώ η κανονικοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών στα μιτοχονδριακά κλάσματα έγινε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.

3.3.2.7 Επίδραση του mtGR στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ και μορίων άλλων σηματοδοτικών οδών που διασταυρώνονται με την GR σηματοδότηση

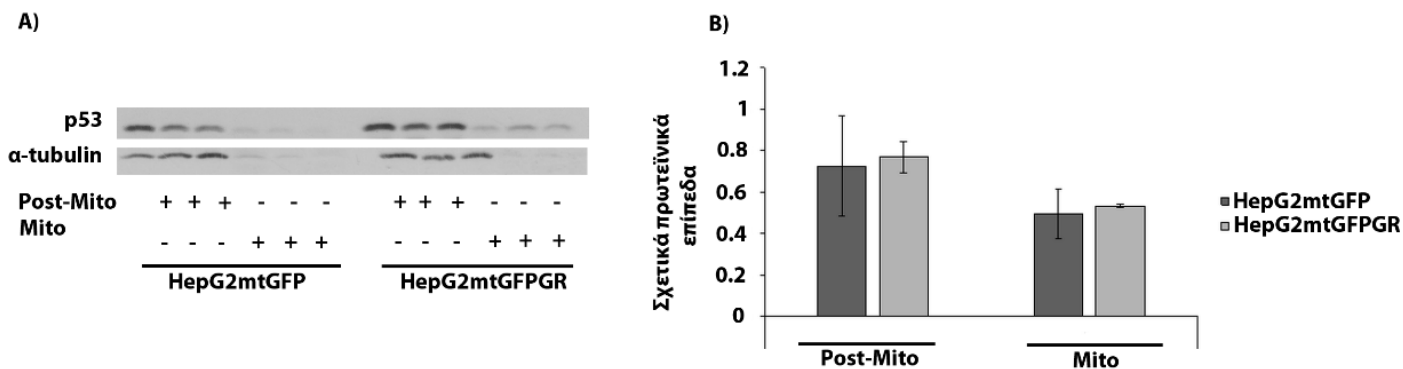
Δεδομένου του γεγονότος ότι οι πρωτεΐνες p53 [241] Hsp70 και Hsp90 (παράγραφος 3.2.2) αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών δοκιμασία Western blot εφαρμόστηκε για τον έλεγχο των επιπέδων των συγκεκριμένων πρωτεϊνών (**Εικόνα 66A**) στους όγκους που απομονώθηκαν από τους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τα κύτταρα HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών p53 και Hsp90 παρουσίασαν μια στατιστικά σημαντική μείωση στους όγκους των μυών που είχαν εμβολιαστεί με την κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Αντίθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης HSP70 δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των όγκων που προκύπτουν από τις δύο κυτταρικές σειρές. Τα μειωμένα επίπεδα της HSP90 δεν συνάδουν με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, όπου παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα της στην πλειονότητα των καρκίνων. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια ρύθμισης της ενεργοποίησης των δράσεων του GR, με την πρωτεΐνη HSP70 να εμπλέκεται στην αναδίπλωση του, ενώ την πρωτεΐνη HSP90 να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και μεταφορά του [242]. Επίσης, είναι γνωστό ότι η απακετυλάση ιστονών-6 [HDAC6] απακετυλιώνει την HSP90 και έτσι καθίσταται δυνατή η αλληλεπίδραση της με τον GR και η μεταφορά του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια [243]. Δεδομένου των παραπάνω και του γεγονότος ότι ο GR βρίσκεται ήδη στα μιτοχόνδρια, η μείωση της HSP90, πιθανόν να οφείλεται σε αναστολή των μηχανισμών υπερέκφρασης της. Επιπρόσθετα, όσον αφορά τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53, μείωση του, οδηγεί σε επαγωγή της αυτοφαγίας [244]. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνων το p53 παρουσιάζει είτε μειωμένα επίπεδα έκφρασης ή/και δραστηριότητας, (όπως συμβαίνει και στη δική μας περίπτωση) ή εμφανίζει αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων [245]. Τέλος, στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί και το γεγονός ότι ο πυρηνικός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του p53 και αντίθετα [246].

Για την επιβεβαίωση και επαλήθευση των αποτελεσμάτων που αφορούν τον παράγοντα p53 πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη μελέτη τόσο σε μιτοχονδριακά κλάσματα (mito) όσο και σε κυτταροπλασματικά κλάσματα (postmito) κυττάρων όγκων μυών NSG, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με 100.000 κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR (**Εικόνα 67**). Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του παράγοντα p53, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των όγκων που προήλθαν από τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με τους όγκους αναφοράς ούτε στα κυτταροπλασματικά κλάσματα ούτε στα μιτοχονδριακά κλάσματα. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η προαναφερθείσα μείωση σε ολικό εκχυλίσμα που παρατηρήθηκε στους όγκους επίμυων NOD-SCID που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς, αφορά μεταβολές στα επίπεδα του πυρηνικού p53. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το p53

ανιχνεύεται και στα μιτοχονδριακά κλάσματα. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι, υπό συνθήκες υποξίας, παρατηρείται μετακίνηση του p53 στα μιτοχόνδρια, γεγονός το οποίο φαίνεται να λαμβάνει χώρα και υπό τις συνθήκες του πειράματος, δεδομένου ότι παρατηρείται η ύπαρξη συμπαγών όγκων [73].



Εικόνα 66: Επίδραση του mtGR στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών θερμικού σοκ και μορίων άλλων σηματοδοτικών οδών που διασταυρώνονται με την GR σηματοδότηση. **A)** Δοκιμασία Western blot εφαρμόστηκε για τον έλεγχο των επιπέδων των πρωτεϊνών p53, Hsp70 και Hsp90 στους όγκους των μυών, που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό τους με τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Παράλληλα αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β ακτίνης και της GAPDH για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι τιμές αναπαριστούν τον μέσο όρο + -S.D, (n=5), ** p<0.01, *** p< 0.001 και εκφράζονται σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των πρωτεϊνικών επιπέδων των όγκων που προήλθαν από τους μύες που εμβολιάστηκαν με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP.



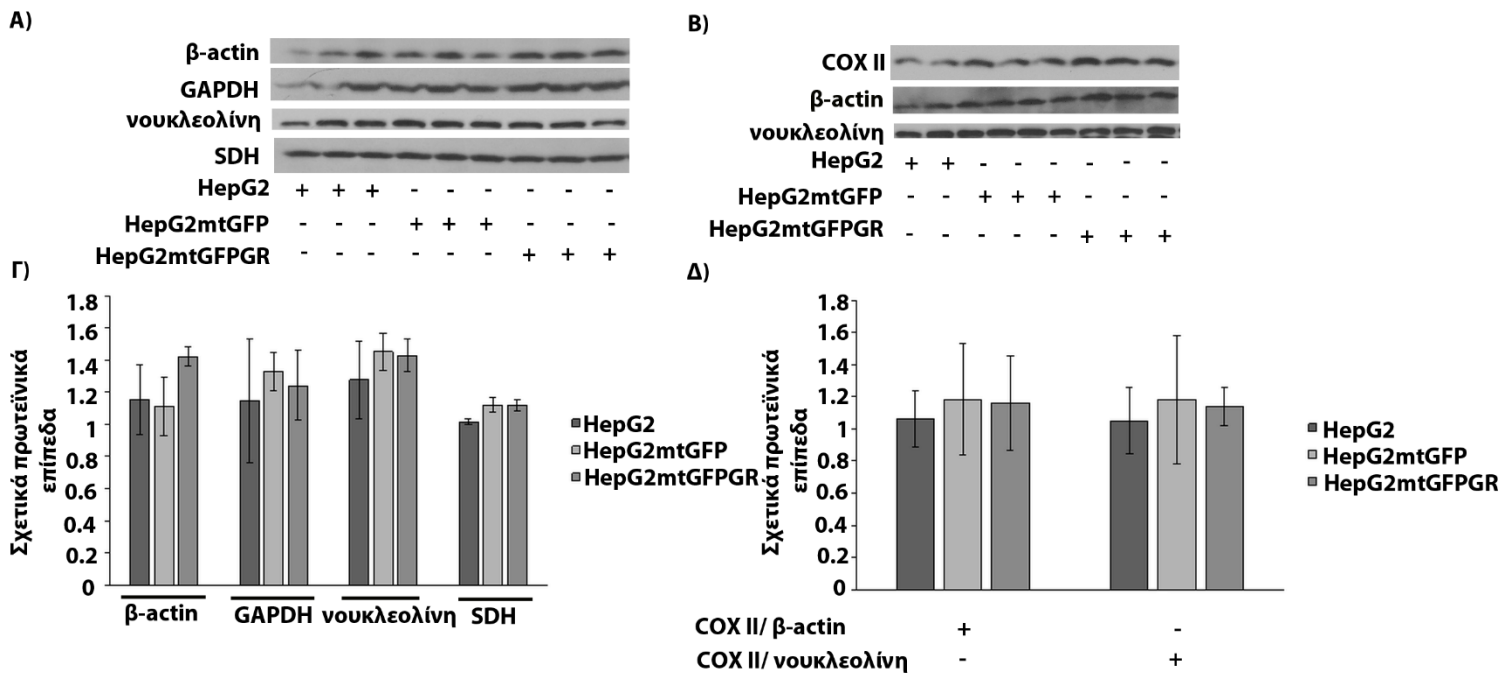
Εικόνα 67: **A)** Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων του παράγοντα p53 σε κυτταροπλασματικά (*post-mito*) και μιτοχονδριακά (*mito*) κλάσματα, μετά από ομογενοποίηση και υποκυτταρική κλασμάτωση των όγκων που προήλθαν από τους μύες NSG, οι οποίοι εμβολιάστηκαν με 100.000 κύτταρα από τις καρκινικές κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR. **B)** Η κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων σε κυτταροπλασματικά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της α - τουμπουλίνης, ενώ αυτών στα μιτοχονδριακά κλάσματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH).

3.4. Διερεύνηση της ορμονοεξαρτώμενης δράσης του mtGR σε κύτταρα HepG2, HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP

3.4.1 Διερεύνηση του ρόλου του mtGR στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία σε *ex vivo* σύστημα κυττάρων

A) Μελέτες σε ολικό εκχύλισμα. Με σκοπό τον έλεγχο της πιθανής επίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη διαφορική έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών άρα και βιογένεση των μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ίσο αριθμό κυττάρων HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, τα οποία αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία δείκτη κόκκινο της φαινόλης και FBS. Η καταμέτρηση και ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων από κάθε κυτταρική σειρά επιτεύχθηκε με χρήση μικροσκοπίου. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από ίσο αριθμό κυττάρων ηλεκτροφορήθηκε και μέσω της δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων ελέγχθησαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β -ακτίνης, της GAPDH, της SDH και της νουκλεολίνης. Η νουκλεολίνη παρουσιάζει αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση και χρησιμοποιήθηκε ως μόριο αναφοράς για την επιβεβαίωση της ανάλυσης ισόποσου αριθμού πυρήνων, άρα και κυττάρων (**Εικόνα 68A**). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH, β ακτίνης, νουκλεολίνης και GAPDH μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μόρια κανονικοποίησης.

Επιπρόσθετα, στις συνθήκες αυτές του πειράματος, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της υπομονάδας II της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX II) (**Εικόνα 68B**). Η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της COX II πραγματοποιήθηκε τόσο με βάση τα επίπεδα της ακτίνης, όσο και με βάση τα επίπεδα της νουκλεολίνης, σε ισόποσα δείγματα που μελετήθηκαν από κάθε κυτταρική σειρά. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της COX II δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών.

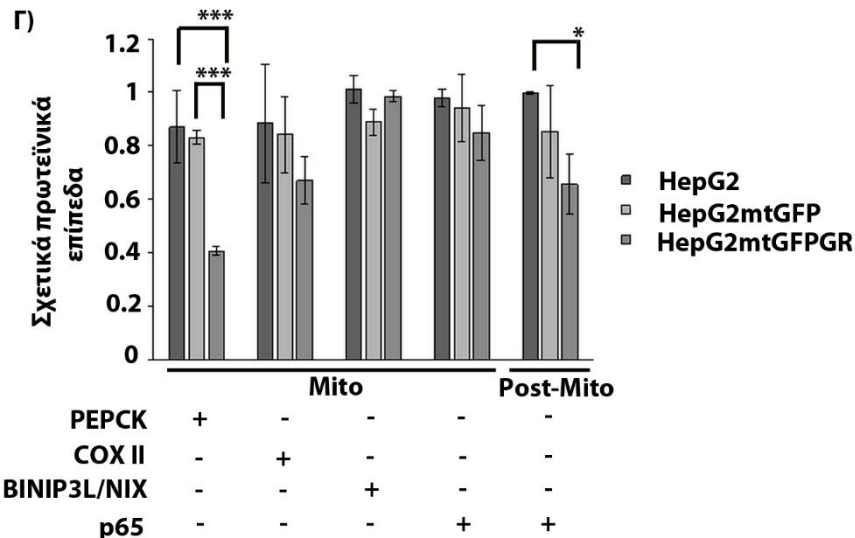
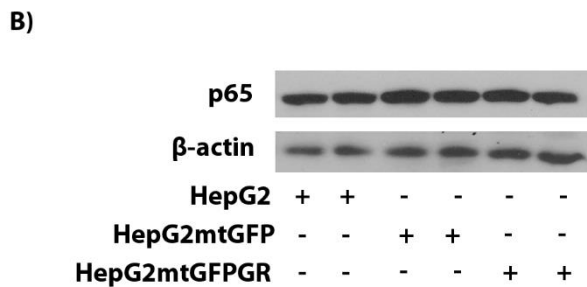
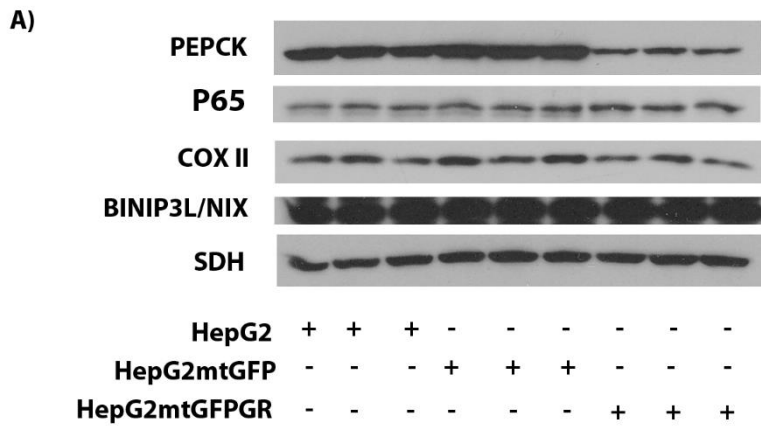


Εικόνα 68: Διερεύνηση του ρόλου του mtGR στη βιογένεση μιτοχονδρίων σε ex vivo σύστημα κυττάρων **A)** Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης, GAPDH, SDH και νουκλεολίνης, σε ισόποσο αριθμό κυττάρων από τις κυτταρικές σειρές HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, μέσω δοκιμασίας ανοσοαποτύπωσης. **B)** Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών COX II, μέσω δοκιμασίας Western blot. **Γ)** Κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της COX II ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της νουκλεολίνης και β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος τιμών \pm S.D, ($n > 2$), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα κύτταρα μάρτυρες HepG2 και HepG2mtGFP.

B) Μελέτες σε υποκυτταρικά κλάσματα. Με εφαρμογή Western blot ανάλυσης πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK, της υπομονάδας p65 και COX II, του αυτοφαγικού υποδοχέα BINIP3L/NIX, καθώς και της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDH) σε μιτοχονδριακά κλάσματα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR κυττάρων (**Εικόνα 69A**). Επίσης, ελέγχθηκαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 και της β ακτίνης στα κυτταροπλασματικά κλάσματα (Post-Mito) (**Εικόνα 69B**) των κυτταρικών αυτών σειρών. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της μιτοχονδριακής PEPCK στα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με

τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα in vivo πειράματα στους μύες. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η υπόθεση ότι η υπερέκφραση του GR στα μιτοχόνδρια πιθανόν να οδηγεί σε αλλαγή του μεταβολισμού, η οποία οδηγεί τελικά σε καταστολή της γλυκονεογενετικής πορείας και ενίσχυση της γλυκολυτικής πορείας. Επιπρόσθετα, στατιστική σημαντική μείωση παρουσίαζαν και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυτταροπλασματικής υπομονάδας p65 στη προαναφερθείσα κυτταρική σειρά, ενώ τα επίπεδα του μιτοχονδριακού p65 δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Δεδομένου ότι ο NF-κΒ εμφανίζει και μιτοχονδριακή εντόπιση, όπου ρυθμίζει αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών mRNAs [47], και δεδομένου ότι στα οργανίδια αυτά ανταγωνίζεται τη δράση του mtGR, μέσω αλληλεπίδρασης μεταξύ τους [65], εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μείωση του p65 στα κυτταροπλασματικά κλάσματα είναι αποτέλεσμα μιας γενικότερης αλλαγής στο μεταβολισμό, η οποία συντελείται μέσω διατηρούμενης επικοινωνίας μεταξύ των υποκυτταρικών οργανιδίων, στην οποία συμμετέχουν και οι στεροειδείς ορμόνες.

Επιπλέον, από την ανάλυση Western blot προέκυψε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του BINIP3L/NIX δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τρεις κυτταρικές σειρές. Τα σταθερά επίπεδα του υποδοχέα BINIP3L/NIX πιθανόν να υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα mtGR δεν αποτελούν ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας λαμβάνει χώρα μόνο εφόσον "συνυπάρχουν" και συνθήκες υποξίας. Τέλος, τα επίπεδα του COX II παρουσιάζουν μια μη στατιστικά σημαντική μείωση στα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές.



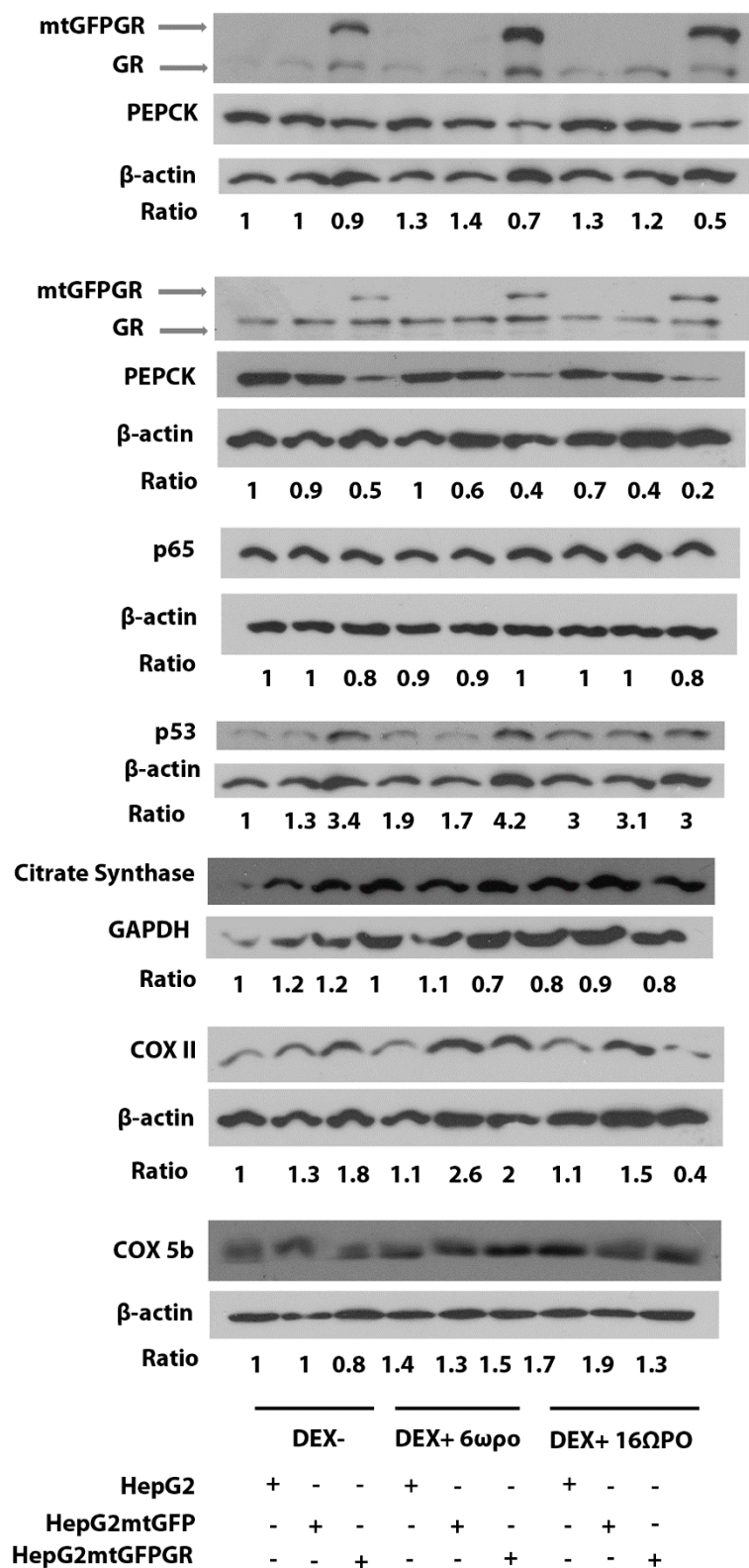
Εικόνα 69: Έλεγχος της διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία, σε απομονωμένα μιτοχόνδρια και κυτταροπλασματικά κλάσματα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR κυττάρων. Δοκιμασία Western blot πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων (A) PEPCK, p65, COX II, BINIP3L/NIX, σε απομονωμένα μιτοχόνδρια (B) και της p65 σε κυτταροπλασματικά κλάσματα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR κυττάρων. Γ) Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έκφρασης των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό εξέταση μορίων στα μιτοχονδριακά κλάσματα έγινε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH, ενώ αυτών των αντίστοιχων μορίων που ελέγχθηκαν στα κυτταροπλασματικά κλάσματα (PM), έγινε με βάση τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β

ακτίνης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο μέσος όρος \pm S.D, (n>2),* p< 0.05, *** p<0.001 σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες HepG2 και HepG2mtGFP.

3.4.2 Έλεγχος της ορμονοεξαρτώμενης διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία, υπό την επίδραση του mtGR

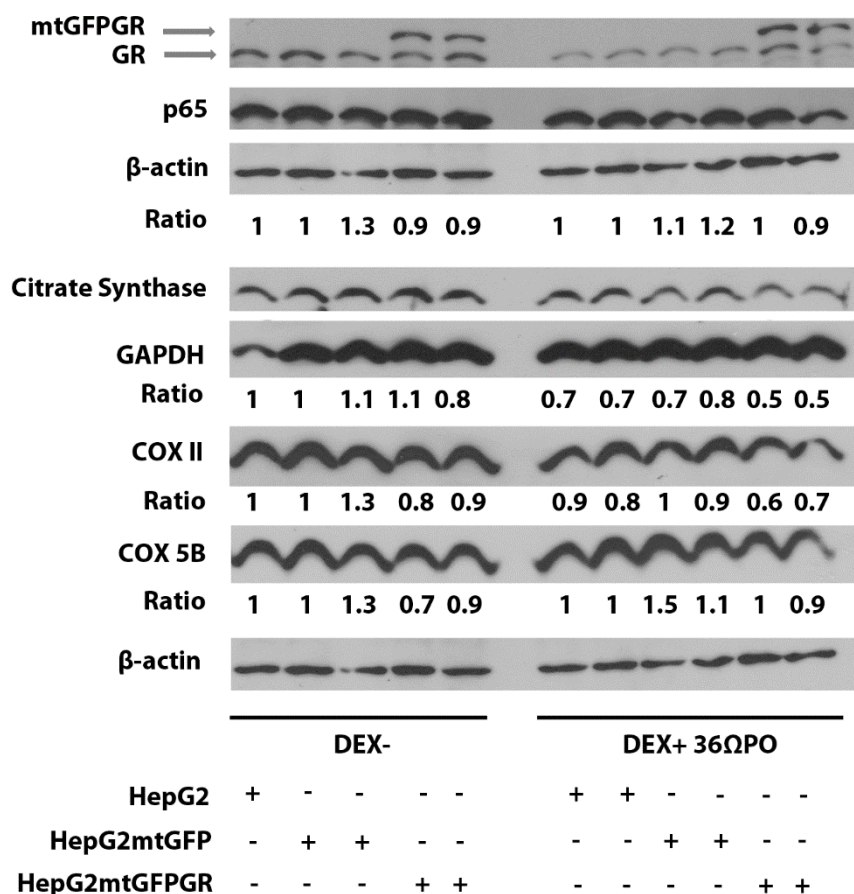
Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου των γλυκοκορτικοειδών στις μεταβολές στην έκφραση πρωτεϊνικών μορίων που περιγράφηκαν στις ενότητες 3.3.2.3, 3.3.2.5, 3.3.2.6 και 3.4.1 διεξήχθησαν πειράματα σε καλλιεργητικό μέσο απουσία κόκκινου της φαινόλης εμπλουτισμένου με FBS, το οποίο είχε υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, με σκοπό την απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών (CIS). Έτσι διεξήχθησαν πειράματα όπου οι κυτταρικές σειρές HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR αναπτύχθηκαν για 36 ώρες, σε θρεπτικό μέσο DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης, εμπλουτισμένου με 10% CIS, και στην συνέχεια κατεργάστηκαν περαιτέρω απουσία ή παρουσία του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνης 10^{-7} M, για 6 ή 16 ώρες (**Εικόνα 70 A,B,Γ**) ή 36 ώρες (**Εικόνα 71**). Μετά τη συλλογή και λύση των κυττάρων ακολούθησε Western blot ανάλυση για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων GR, PEPCK, p65, p53, συνθάση του κιτρικού οξέος, COX II, COX 5B, σε ολικό εκχύλισμα κυττάρων. Κατά την επώση των κυττάρων με DEX για 6 ή 16 ώρες (**Εικόνα 70 A,B,Γ**), παρατηρούμε ότι όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, τόσο απουσία όσο και παρουσία δεξαμεθαζόνης, παρουσιάζονται μειωμένα στην κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές. Μάλιστα, η μείωση της PEPCK, παρουσία του mtGR, ενισχύεται με την πάροδο του χρόνου (6 ώρες, 16 ώρες). Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p65 και της συνθάσης του κιτρικού οξέος, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών τόσο παρουσία, όσο και απουσία DEX. Αντίθετα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του p53, απουσία DEX, είναι αυξημένα στην κυτταρική HepG2mtGFPGR (σε σύγκριση με τις άλλες κυτταρικές σειρές). Παρουσία DEX για 6 ώρες, επάγεται η έκφραση του p53 σε όλες τις κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα επώάζονται με DEX για 16 ώρες, ενώ τα επίπεδα του μορίου αυτού συνεχίζουν να αυξάνονται στις κυτταρικές σειρές HepG2 και HepG2mtGFP, η δράση του mtGR δεν ενισχύεται περαιτέρω με την DEX. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι στη δράση αυτή της DEX, επί τη ρύθμιση των επιπέδων του p53, συμμετέχει σηματοδότηση μέσω και του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Επιπρόσθετα, ο mtGR επάγει την αύξηση των επιπέδων της COX II, απουσία δεξαμεθαζόνης. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που αναπαρίστανται στην **εικόνα 69 A,Γ**, όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων COXII μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών και πιθανόν να οφείλεται σε μη επαρκή απομάκρυνση των ενδογενών στεροειδών ορμονών κατά την 36^η προεπάσσή τους σε καλλιεργητικό μέσο απουσία στεροειδών ορμονών. Η ερμηνεία αυτή επαληθεύεται και από την παρατήρηση όπου κατά την εξάωρη επώαση με DEX, η αύξηση αυτή ενισχύεται σε μικρό βαθμό. Όσον αφορά το

δεκαεξάωρο επώασης με DEX, τα επίπεδα του συγκεκριμένου μορίου μειώνονται σημαντικά στη προαναφερθείσα κυτταρική σειρά. Επιπλέον, τα επίπεδα της COX5B δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στις τρεις κυτταρικές σειρές, απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης, για 6 ώρες, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυξάνονται στις κυτταρικές σειρές HepG2 και HepG2mtGFP, στο δεκαεξάωρο επώασης με τη DEX, σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR. Επίσης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 71**, υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, με DEX για 36 ώρες, τόσο απουσία, όσο και παρουσία δεξαμεθαζόνης, δεν παρουσιάζονται διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των p65 και COX 5B μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Όσον αφορά, τα επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού οξέος και της COX II, απουσία δεξαμεθαζόνης, δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις 3 κυτταρικές σειρές. Ωστόσο, παρουσία δεξαμεθαζόνης και παρουσία mtGR, τα επίπεδα των παραπάνω μορίων παρουσιάζονται μειωμένα. Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο χρόνος έκθεσης σε DEX επηρεάζει το αποτέλεσμα της επίδρασης της DEX στα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων OXPHOS. Διαφαίνεται ότι υπό την επίδραση DEX αρχικά λαμβάνει χώρα επαγωγή των μιτοχονδριακών υπομονάδων OXPHOS. Η δράση αυτή αντιστρέφεται με την πάροδο του χρόνου στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtGR, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης, εντός των μιτοχονδρίων, υπό συνθήκες επαρκούς μετακίνησης του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια και πλήρους ενεργοποίησής του από την ορμόνη. Η δράση αυτή της DEX ακολουθείται χρονικά και από αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS.



Εικόνα 70: Ορμονοεξαρτώμενη διαφορική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία, σε HepG2 mtGFPGR, HepG2 mtGFP κύτταρα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων GR, PEPCK, p65, p53, συνθάση του κιτρικού οξέος, COX II, COX 5B ελέγχθηκαν μέσω δοκιμασίας Western blot, σε κύτταρα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, τα οποία κατεργάστηκαν παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 10^{-7} M, για 6 ή 16 ώρες. Οι τιμές (Ratio) προέκυψαν μετά από την

κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων, με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης ή της GAPDH και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σχέση με αυτές των κυττάρων αναφοράς.



Εικόνα 71: Ορμονοεξαρτώμενη διαφορική έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή λειτουργία, σε HepG2 mtGFPGR, HepG2 mtGFP κύτταρα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων GR, p65, συνθάση του κιτρικού οξέος, COX II, COX 5B ελέγχθηκαν μέσω δοκιμασίας Western blot, σε κύτταρα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, τα οποία κατεργάστηκαν παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 10^{-7} M για 36 ώρες. Οι τιμές (Ratio) προέκυψαν μετά από την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων, με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης ή της GAPDH και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σχέση με αυτές των κυττάρων αναφοράς.

4. Συμπεράσματα

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες ασκούν τις δράσεις τους μέσω σύνδεσης τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Αυτού του είδους οι ορμόνες, αποτελούν ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα, εξαιτίας των αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Παρόλα αυτά, σήμερα, η χρήση τους περιορίζεται, εξαιτίας διαφόρων αρνητικών παρενεργειών (πχ. διαβήτη, απώλεια μυικής μάζας, οστεοπόρωση κ.α.) που επιφέρουν [184].

Παλαιότερα, ήταν γενικά αποδεκτό ότι ο μηχανισμός της trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής από τον GR σχετιζόταν με τις αρνητικές παρενέργειες που επιφέρουν τα γλυκοκορτικοειδή πχ. διαβήτη, ενώ ο μηχανισμός της trans-καταστολής της μεταγραφής από τον GR ήταν συνδεδεμένος με τις θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών πχ. αντιφλεγμονώδης δράση. Ωστόσο, πλέον, είναι γνωστό ότι μερικές αρνητικές παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να είναι αποτέλεσμα και της trans-καταστολής της μεταγραφής από τον GR πχ. απώλεια μυικής μάζας ή καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσις-επινεφριδίων [184,185].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι χρήσιμη θα ήταν η εύρεση ενώσεων, νέων προσδετών του GR, οι οποίες θα ενεργοποιούν επιλεκτικά, συγκεκριμένους μηχανισμούς δράσης του υποδοχέα, ενισχύοντας τους μηχανισμούς που σχετίζονται με αντιφλεγμονώδεις δράσεις του GR, όπως καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κB και περιορίζοντας ή εξαλείφοντας άλλους μηχανισμούς δράσης του υποδοχέα, όπως trans-ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και κατά συνέπεια μείωση της γλυκοεογεννητικής του δράσης. Τέτοιου είδους ενώσεις, είναι γνωστές στη βιβλιογραφία ως επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Selective glucocorticoid receptor agonists, SEGRAs) ή επιλεκτικοί ρυθμιστές (Selective glucocorticoid receptor modulators, SEGRMs) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [186].

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου μας, αλλά και άλλων ερευνητικών ομάδων αναδεικνύουν τις τριτερπενοειδείς ενώσεις ως εν δυνάμει εκλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs). Οι ενώσεις αυτές έχουν δομή παρόμοια με αυτή των γλυκοκορτικοειδών και σήμερα είναι γνωστό ότι διαθέτουν αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιακές, αντιβακτηριακές, καθώς και αντιμυκητιακές ιδιότητες, μερικές από τις οποίες επιτελούνται εν μέρει μέσω σύνδεσης τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών [191-194,247].

Τα τερπένια συναντώνται τόσο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (φυτά, ζώα) όσο και στους προκαρυωτικούς (μύκητες). Ωστόσο, η περιεκτικότητα των φυτών σε τερπένια είναι πολύ μεγαλύτερη, σε σχέση με όλους τους άλλους οργανισμούς. Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες ομάδες τερπενίων, ενώσεις της οποίας μελετήθηκαν και στη παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι τα τριτερπένια, των οποίων η δομή μπορεί να είναι είτε πεντακυκλική (ταραξάνες, ολεανάνες, ουρσάνες, λουπάνες) είτε τετρακυκλική (δαμαράνες, κουρκουμπιτάνες, ευθάνες) [188].

Συγκεκριμένα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή σαρώθηκε μια πληθώρα τριτερπενοειδών ενώσεων, ως προς την ικανότητα τους να προκαλούν ενεργοποίηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μέσω επαγωγής της πυρηνικής του μετατόπισης.

Από τις ενώσεις που ελέγχθηκαν, η πρωτοπαναξαδιόλη (PPD), πρωτοπαναξατριόλη (PPT), που ανήκουν στην κατηγορία των σαπωνινών, τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος (α -BA, β -BA, β -ABA, KBA, AKBA, α -ABA), κάποια παράγωγα του μπετουλινικού οξέος (ονομασία κατά την παρούσα διατριβή: **παράγωγο μπετουλινικού οξέος 1_Betulinic Deriv. 1**, **παράγωγο μπετουλινικού οξέος 2_Betulinic Deriv. 2**, **παράγωγο μπετουλινικού οξέος 3_Betulinic Deriv. 3**), καθώς και η α -αμυρίνη και κάποια παράγωγα της (ονομασία κατά την παρούσα διατριβή: **α -αμυρίνη_ α -Amyrin**, **παράγωγο 1 α -αμυρίνης_ α -Amyrin Deriv. 1**, **παράγωγο 2 α -αμυρίνης_ α -Amyrin Deriv. 2**), διέθεταν την ικανότητα επαγωγής της πυρηνικής μετατόπισης του GR σε ποσοστό από 10-35%, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, και γι' αυτό τον λόγο εξετάστηκαν περαιτέρω.

Όσον αφορά τα τετρακυκλικά τριτερπένια, PPD και PPT, τα πειραματικά μας δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις, σε συγκεντρώσεις από 1 μ M-10 μ M, διέθεταν την ικανότητα ενεργοποίησης της πυρηνικής μετατόπισης του GR, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 10% και 20% αντίστοιχα, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, μέσω άμεσης σύνδεσης τους σε αυτόν, όπως υποδεικνύεται και από μελέτες προσομοίωσης της πρόσδεσης των ενώσεων στην LBD περιοχή του GR. Συνοπτικά, από τις μελέτες πρόσδεσης των συγκεκριμένων ενώσεων στην περιοχή πρόσδεσης προσδέτη του GR, οι δύο ενώσεις προσδένονταν στην LBD του GR, στο ίδιο σημείο με την δεξαμεθαζόνη, αλλά σε επίπεδο όχι παράλληλο με αυτό της DEX. Επίσης, διαφορές στον τρόπο σύνδεσης των ενώσεων στον GR, εντοπίστηκαν στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν οι PPD και PPT, σε σχέση με αυτούς της DEX. Ωστόσο, μετά την πρόσδεση των ενώσεων στον υποδοχέα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη διαμόρφωση της H3 έλικας, η οποία είναι υπεύθυνη για την έκφραση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, η διαμόρφωση της οποίας παραμένει ίδια με αυτή της δεξαμεθαζόνης [197].

Ερμηνεύοντας την επίδραση των ενώσεων στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, όπως περιγράφεται στη συνέχεια, προέκυψε ότι η μερική ενεργοποίηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR από τις ενώσεις PPD και PPT, δεν συνοδεύεται με επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποδοχέα. Μάλιστα, σε κύτταρα HeLa, παρατηρήθηκε καταστολή της από DEX-ενεργοποιούμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, γεγονός, το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, ενός γονιδίου στόχου του GR, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HepG2. Όσον αφορά τα κύτταρα HepG2, η μείωση αυτή παρατηρήθηκε σε μικρότερο ποσοστό και δεδομένου ότι συνοδεύεται και με μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στην επαγόμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και όχι σε πιθανή ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ενώσεων και της DEX. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, μπορεί να προκληθεί, μέσω της ενεργοποίησης της AMPK κινάσης, υπό συνθήκες στρες, όπου λαμβάνει χώρα και ενεργοποίηση της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών [248]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω ενεργοποίηση της AMPK κινάσης έχει παρατηρηθεί και *ex vivo*, υπό συνθήκες “κατεργασίας”, με Rb1 ginsenoside, το οποίο αποτελεί πολυγλυκοζυλιωμένο τριτερπενοειδές PPD-τύπου) [249]. Στο ίδιο πλαίσιο, μείωση των επιπέδων GR, υπό την επίδραση συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης μεγαλύτερων

από 10^{-7} M, έχει επίσης παρατηρηθεί, σε διάφορους τύπους κυττάρων, τόσο από το εργαστήριό μας, όσο και από άλλες ερευνητικές ομάδες [192,250,251]. Οι όποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, αποδίδονται στη διαφορική έκφραση και επίπεδα έκφρασης ρυθμιστικών μορίων, καθώς και συμπαραγόντων της μεταγραφικής μηχανής, που δύναται να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα, επιφέροντας τροποποιήσεις στην τελική διαμόρφωση του υποδοχέα.

Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι οι ενώσεις PPD και PPT αναδείχθηκαν αποτελεσματικές στην καταστολή της από TNF α -επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1 μ M, σε κύτταρα HEK-293 και HeLa, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Μάλιστα, η ουσία PPD, η οποία προκαλούσε μεγαλύτερη πυρηνική μετατόπιση του GR, όπως και προαναφέρθηκε, κατέστειλε και σε μεγαλύτερο βαθμό τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF- κ B, σε ποσοστό συγκρίσιμο με αυτό ίσης συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης (1 μ M). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η οι δράσεις αυτές δεν παρατηρούνται σε κύτταρα COS-7, τα οποία εκφράζουν χαμηλά έως μηδαμινά επίπεδα υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, αποδεικνύοντας ότι η καταστολή της από TNF α επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B, υπό την επίδραση των ενώσεων, οφείλεται εν μέρει τουλάχιστον, στην εμπλοκή του GR, μέσω ενεργοποίησης της trans-κατασταλτικής δράσης του υποδοχέα στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF- κ B. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα συμφωνούν με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας που καταδεικνύουν τις αντιφλεγμονώδεις και αντιδιαβητικές δράσεις των παραπάνω ενώσεων [252,253] και αναδεικνύουν τις ενώσεις ως εν δυνάμει SEGRAs ή μόρια οδηγούς για την ανάπτυξη νέων SEGRAs με αυξημένες επιθυμητές αντιφλεγμονώδεις δράσεις αλλά με μειωμένες παρενέργειες. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι οι ενώσεις δεν παρουσίαζαν κυτταροτοξική δράση στις συνθήκες του πειράματος, όπως αποδεικνύεται από έλεγχο με εφαρμογή δοκιμασίας σουλφοροδαμίνης.

Όσον αφορά την εμπλοκή των υπό μελέτη μορίων στην ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών, μέσω συνομιλίας τους με στεροειδική σηματοδότηση, τα πειραματικά δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις PPD και PPT διαθέτουν και εν δυνάμει αντικαρκινική δράση, καθώς έχουν την ικανότητα επαγωγής μιτοχονδριακά-επαγόμενης απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 9 ή/και 3, σε κύτταρα HeLa και HepG2. Επιπλέον, στα κύτταρα HepG2, συν-χορήγηση των ενώσεων με δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε ενίσχυση της δράσης αυτής, σε αντίθεση με τα κύτταρα HeLa, όπου δεν παρατηρείται περαιτέρω ενίσχυση της δράσης των ουσιών, μετά τη συν-χορήγηση τους με την DEX, γεγονός που υποδηλώνει ιστοειδική δράση των ενώσεων, μέσω GR σηματοδότησης, όπως προαναφέρθηκε.

Όσον αφορά τα παράγωγα του μπόσγουελλικού οξέος **KBA**, **AKBA**, **α -BA**, **β -BA**, **α -ABA**, **β -ABA**, και αυτά επάγουν πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα, το ποσοστό της οποίας διαφοροποιείται μεταξύ των παραγώγων. Πιο συγκεκριμένα, το παράγωγο KBA παρουσίασε τη μέγιστη δραστηριότητα, προκαλώντας αύξηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR σε ποσοστό 31% σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Ακολούθησαν οι ενώσεις AKBA και α -BA, οι οποίες προκαλούσαν αύξηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR σε ποσοστό περίπου 21%, ενώ τη μικρότερη

δραστηριότητα παρουσίασαν οι ενώσεις β -BA, α -ABA και β -ABA, παρουσία των οποίων, η πυρηνική μετατόπιση του GR, κυμαίνονταν από 6-11%, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Μάλιστα, όπως αποκαλύφθηκε από μελέτες προσομοίωσης της πρόσδεσης στην περιοχή LBD του GR, τα παράγωγα του μποςγουελικού οξέος προσδέονται με ευχέρεια στον θύλακα πρόσδεσης της δεακυλοκορτιβαζόλης (DAC) που είναι διευρυμένη μορφή του θύλακα που προσδέει την δεξαμεθαζόνη, με τα παράγωγα β -BA, KBA και α -ABA να εμφανίζουν την σταθερότερη πρόσδεση.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα παράγωγα του μποςγουελικού οξέος, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HEK293 δεν προκάλεσαν ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις μη σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα PEPCK, σε κύτταρα HeLa, παρουσία των ενώσεων. Εξάιρεση αποτελούν τα μειωμένα επίπεδα της PEPCK παρουσία της ουσίας α -BA σε κύτταρα HeLa, η οποία αποδίδεται στην παρατηρούμενη αντίστοιχη μείωση των επιπέδων GR. Μάλιστα, σε κύτταρα HEK293 παρουσία δεξαμεθαζόνης και παρουσία των ενώσεων KBA, AKBA, β -BA, α -ABA παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της από DEX-επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR σε ένα ποσοστό της τάξεως του 10-20%, ενώ παρουσία της ουσίας α -BA, η μείωση αυτή φτάνει περίπου στο 50%. Η παρατήρηση αυτή αναδεικνύει την εν δυνάμει υπογλυκαιμική δράση της α -BA, γεγονός που το καθιστά ως ένα νέο εν δυνάμει, υπό μελέτη αντιδιαβητικό φάρμακο. Ωστόσο, καθώς παρουσία της ουσίας αυτής, στα κύτταρα HeLa, παρατηρήθηκε και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR, η μείωση των επιπέδων της PEPCK πιθανόν να αποδίδεται κυρίως στην επαγόμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και όχι σε πιθανή ανταγωνιστική δράση μεταξύ των ενώσεων και της DEX. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, μείωση των επιπέδων GR, υπό την επίδραση συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης μεγαλύτερων από 10^{-7} M, έχει επίσης παρατηρηθεί, σε διάφορους τύπους κυττάρων, τόσο από το εργαστήριό μας, όσο και από άλλες ερευνητικές ομάδες [192,250,251].

Επιπλέον, η μελέτη της πιθανής αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων αναδεικνύει ότι οι προαναφερθείσες ενώσεις παρουσιάζουν και σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση, όπως υποδηλώνεται από την ικανότητά τους να προκαλούν καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις KBA, AKBA, α -ABA και β -ABA, προκάλεσαν καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B σε ποσοστό της τάξεως του 40% με 50%, ενώ οι ενώσεις α -BA και β -BA παρουσίασαν μικρότερη μείωση της τάξεως του 20%-30%, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, σε κύτταρα HeLa. Ωστόσο, σε κύτταρα HEK293, όλες οι ενώσεις προκάλεσαν μικρότερη μείωση της από TNF- α επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του NF- κ B, της τάξεως του 10%-20%. Η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών πιθανόν να οφείλεται σε ιστοειδική δράση των ενώσεων, λόγω της διαφορετικής έκφρασης των επιπέδων του GR στις δύο κυτταρικές σειρές, αλλά και λόγω της διαφορετικής έκφρασης συμπαραγόντων κρίσιμων για την έκφραση της δραστηριότητας GR στις δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Επίσης, πειράματα σε κύτταρα HEK293, τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο

PEGFPC2GR, έτσι ώστε να υπερεκφράζουν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών έδειξαν ότι, τόσο η DEX όσο και η συγχορήγηση ενώσεων με DEX, προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ, τόσο απουσία, όσο και παρουσία TNF-α, σε σύγκριση με κύτταρα μάρτυρες, τα οποία διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο PEGFPC2. Μάλιστα, παρουσία TNF-α, στα διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο PEGFPC2GR παρατηρήθηκε 40% επιπλέον μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κΒ σε σχέση με αυτή των διαμολυσμένων κυττάρων με το πλασμίδιο PEGFPC2 γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή του GR σε αυτήν τη διαδικασία. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν επίσης ότι οι ενώσεις KBA και AKBA ασκούν αθροιστική δράση σε αυτήν της DEX. Η δράση των ενώσεων μέσω GR σηματοδότησης επιβεβαιώθηκε επίσης και από τη μη εμφάνιση της κατασταλτικής τους δράση έναντι της ενεργοποίησης του NF-κΒ, από TNFα, σε κύτταρα COS-7, τα οποία όπως προαναφέρθηκε εκφράζουν χαμηλά έως μηδαμινά επίπεδα GR. Με βάση όλα τα παραπάνω, προκύπτει ότι τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος, και ιδιαίτερα τα KBA και AKBA μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων εν δυνάμει SEGRAs, των οποίων η χορήγηση ή η συν-χορήγησή τους με γνωστά συνταγογραφούμενα γλυκοκορτικοειδή να επιφέρει βελτιωμένα επιθυμητά αποτελέσματα με μειωμένες παρενέργειες.

Επιπλέον, πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι εκτός από τη χρήση τους ως SEGRAs, τα παράγωγα του μποςγουελλικού οξέος KBA, AKBA, α-BA, β-BA και β-ABA, με εξαίρεση το παράγωγο α-ABA, διαθέτουν και εν δυνάμει αντικαρκινικές ιδιότητες, καθώς έχουν την ικανότητα επαγωγής μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης, τόσο σε κύτταρα HeLa, όσο και σε κύτταρα HepG2, συμπεράσμα το οποίο προέκυψε από τα μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης-9 και 3 στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Μάλιστα, η αποπτωτική δράση ενισχύεται κατά την συν-χορήγηση των ενώσεων AKBA και α-BA, με DEX, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενώσεις πιθανόν ασκούν αθροιστική δράση σε αυτή της DEX. Οι αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές και αντικαρκινικές δράσεις των παραπάνω ενώσεων έχουν αναφερθεί και στη διεθνή βιβλιογραφία [190].

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, τα οποία αναδεικνύουν ότι αυξάνεται το φάσμα της φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών, τα οποία μπορεί να αξιοποιηθούν ως εν δυνάμει SEGRAs, μελετήθηκαν περαιτέρω ημι-συνθετικά παράγωγα τριτερπενικών ενώσεων, για τις οποίες οι αρχικές μας παρατηρήσεις έδειχναν ότι δεν είχαν σημαντική στεροειδική δράση. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν ήταν η α- Αμυρίνη (**α-Amyrin**) και τα παράγωγα της (**α-Amyrin Deriv. 1, α-Amyrin Deriv. 2**) αλλά και τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος (**Betulinic Deriv. 1, Betulinic Deriv. 2, Betulinic Deriv. 3**). Υπό την επίδραση των ενώσεων αυτών παρατηρήθηκε επαγωγή της πυρηνικής μετατόπισης του GR η οποία κυμαίνονταν σε ποσοστό 14%-19%, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς.

Επίσης, οι παραπάνω ενώσεις δεν προκάλεσαν μεταβολές στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε κύτταρα HEK-293. Το αποτέλεσμα αυτό διαφοροποιούνταν από αυτό στα κύτταρα HeLa, όπου τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος 3 (Betulinic Deriv. 3), της α-Αμυρίνης 1 (α-Amyrin Deriv. 1) και της α-Αμυρίνης 2 (α-Amyrin Deriv.2) παρουσίασαν καταστολή της από DEX- επαγόμενης μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε ποσοστό της τάξεως του 45%, 50% και 60%, αντίστοιχα,

υποδηλώνοντας ιστοειδική δράση των ενώσεων αυτών. Η δράση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK σε κύτταρα HeLa, παρουσία των συγκεκριμένων ενώσεων, προσδίδοντας στις ενώσεις αυτές εν δυνάμει αντιδιαβητικές ιδιότητες. Όσον αφορά την επίδραση των ενώσεων αυτών στη μεταγραφική δραστικότητα του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ, δεν παρατηρήθηκε καταστολή της μεταγραφικής δραστικότητας του NF-κΒ, ούτε στα κύτταρα HEK293 ούτε στα COS.7, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ενώσεις αυτές δεν διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση.

Στη συνέχεια, δεδομένου του σημαντικού ρόλου των μιτοχονδρίων αλλά και του γεγονότος ότι ο GR μπορεί να εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και να επιδρά άμεσα στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και απόπτωση [49-53,212] διερευνήθηκε ο ρόλος και οι μηχανισμοί δράσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Για την επίτευξη του στόχου αυτού αρχικά μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του GR με πρωτεΐνες που παίζουν κύριο ρόλο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό και στη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες πχ. MtfA, μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να εισέρχονται στα μιτοχόνδρια πχ. PPARα [47], πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων πχ. VDAC, πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την απόπτωση πχ. Bcl2, μόρια που εμπλέκονται στη διατήρηση τη σωστής διαμόρφωσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, καθώς και στη μεταφορά πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο πχ. HSP90, HSP70, καθώς και πρωτεΐνες του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού, όπως η αφυδρογονάση του πυροσταφικού οξέος. Επίσης, μελετήθηκε και η αλληλεπίδραση του GR με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, οξειδοαναγωγή κινονών NADPH (NQO1), πρωτεΐνη η οποία έχει αναφερθεί ότι εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια [223].

Με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων και εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης GR από ολικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα κυττάρων HepG2, καθώς και κυττάρων HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR [65] διαπιστώθηκε δυνατότητα αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ με μοριακά βάρη 70 KDa (70 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP70) και 90 KDa (90 Kilodalton Heat Shock Protein, HSP90), τον μεταγραφικό παράγοντα PPARα, την PDH, την πρωτεΐνη VDAC, το μεταγραφικό παράγοντα MtfA, καθώς και την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl2. Επίσης, εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης πραγματοποιήθηκε και με χρήση αντισώματος έναντι της PDH, σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2mtGFPGR, γεγονός που επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση της PDH με τον GR. Μεταξύ των παραπάνω αλληλεπιδράσεων με τον GR, ισχυρή αλληλεπίδραση παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες PDH, HSP70 και PPARα, όπως υποδεικνύεται από την ένταση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών ζωνών. Μάλιστα, όσον αφορά την PDH, η επαλήθευση της αλληλεπίδρασής της με τον GR, επιτεύχθηκε με χρήση διαφορετικών, εναλλακτικών αντισωμάτων ανοσοκατακρήμνισης έναντι του GR, τόσο υπό συνθήκες υπερέκφρασης του GR όσο και υπό συνθήκες ύπαρξης ενδογενών επιπέδων έκφρασης του mtGR. Η αλληλεπίδραση του GR με την PDH είναι υψίστης σημασίας, καθώς το μόριο αυτό είναι ένα μόριο κλειδί που συνδέει τη γλυκόλυση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος και οποιαδήποτε τροποποίηση στα επίπεδα έκφρασης ή στη δραστικότητα του ενζύμου οδηγεί σε τροποποίηση και

επαναπρογραμματισμό του συνόλου του κυτταρικού μεταβολισμού [211]. Επίσης, η αλληλεπίδραση του GR με τις πρωτεΐνες Bcl2 και VDAC ανιχνεύθηκε τόσο υπό συνθήκες έκφρασης ενδογενών επιπέδων μιτοχονδριακού GR, σε μιτοχόνδρια κυττάρων HepG2, όσο υπό συνθήκες υπερέκφρασης του μιτοχονδριακού GR σε μιτοχόνδρια κυττάρων HepG2mtGFPGR. Το γεγονός ότι ο GR αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη VDAC, πιθανόν να υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση αυτή αποτελεί συστατικό του μηχανισμού εισόδου του υποδοχέα στο μιτοχόνδριο, ενώ η αλληλεπίδραση του με την Bcl2, πιθανόν να υποδηλώνει μια άμεση ρύθμιση των μιτοχονδριακά εξαρτώμενων αποπτωτικών μηχανισμών, γεγονός το οποίο συμφωνεί και με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που αναφέρουν ότι η αλληλεπίδραση του mtGR με την πρωτεΐνη Bcl2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των αποπτωτικών δράσεων του GR [254]. Επίσης, η αλληλεπίδραση του GR με τις πρωτεΐνες HSP70 και HSP90, πιθανόν να συνεισφέρει στη διατήρηση της σταθερότητας του υποδοχέα, αλλά και στη μεταφορά του από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια [255]. Τέλος, το γεγονός ότι ο GR αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς παράγοντες MtfA και PPARα, επιβεβαιώνει τη συμμετοχή και συνομιλία των συγκεκριμένων παραγόντων στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και έλεγχο του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού.

Όπως προαναφέρθηκε, η PDH παίζει καθοριστικό ρόλο στον καρκίνο, καθώς αναστολή της δραστηριότητάς της ή/και μείωση των επιπέδων της συντελεί στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, μειώνοντας τη συνεισφορά της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην παραγωγή ενέργειας. Δεδομένου ότι ο GR αλληλεπιδρά με την PDH, κρίθηκε αναγκαία η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην ανάπτυξη όγκων. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού πραγματοποιήθηκαν in vivo πειράματα επαγωγής καρκινογένεσης σε 16 ανοσοκατεσταλμένους μύες NOD-SCID, οι οποίοι εμφανίζουν έλλειψη B- και T- λεμφοκυττάρων και οι οποίοι εμβολιάστηκαν στην οπίσθια μασχαλιαία περιοχή με 1.000.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR και HepG2mtGFP (8 μύες/συνθήκη). Επίσης, 20 συνολικά μύες τύπου NSG, οι οποίοι εμφανίζουν έλλειψη των B-, T- και των NK- (Natural Killer cells, <<κύτταρα φυσικούς φονείς>>) κυττάρων, εμβολιάστηκαν στην οπίσθια μασχαλιαία περιοχή, είτε με 100.000, είτε με 10.000 κύτταρα από τις κυτταρικές σειρές HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR (5 μύες/συνθήκη). Και στις τρεις περιπτώσεις η χρονική στιγμή εμφάνισης, άρα και ανάπτυξης των όγκων σε πειραματόζωα που είχαν εμβολιαστεί με HepG2mtGFPGR κύτταρα προηγούνταν αυτής σε πειραματόζωα που είχαν εμβολιαστεί με HepG2mtGFP. Πιο συγκεκριμένα η εμφάνιση των όγκων στους μύες που είχαν εμβολιαστεί με τα 1.000.000, 100.000 και 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, ανά ένεση, πραγματοποιήθηκε την 22^η, 30^η και 48^η ημέρα, μετά τον εμβολιασμό, αντίστοιχα, ενώ η εμφάνιση των όγκων στους αντίστοιχους μύες, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με τα κύτταρα HepG2mtGFP (συνθήκη αναφοράς), ανά ένεση, παρατηρήθηκε την 29^η, 33^η και 72^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό αντίστοιχα. Επίσης, τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης όσο και το μέγεθος των όγκων στους συγκεκριμένους μύες ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτά των μυών που είχαν εμβολιαστεί με τα HepG2mtGFP κύτταρα (Αναλογία 3: 1 στις περιπτώσεις των 1.000.000 ή 10.000, ή 7:1

στην περίπτωση των 100.000 κυττάρων), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο mtGR συμμετέχει σε μηχανισμούς που προάγουν την ανάπτυξη όγκων.

Στην συνέχεια, με σκοπό τη διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων ο mtGR οδηγεί στην καρκινογένεση πραγματοποιήθηκαν συγκριτικές μελέτες ελέγχου των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό, απόπτωση και αυτοφαγία, τόσο σε ολικά όσο και μιτοχονδριακά κυτταρικά εκχυλίσματα από τους προαναφερθέντες όγκους. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι παρουσία του mtGR, δεν ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί επαγωγής μιτοχονδριακά εξαρτώμενης απόπτωσης, όπως υποδεικνύεται από τη διατήρηση των επιπέδων κυτοχρώματος c εντός του μιτοχονδρίου και της μη απελευθέρωσής του στο κυτταρόπλασμα κυττάρων όγκων, που προέκυψαν από τον εμβολιασμό των μυών NSG με 100.000 κύτταρα, από τις δύο κυτταρικές σειρές. Η μη ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών συνάδει με την ανάπτυξη των όγκων που παρατηρήθηκε κατά τον εμβολιασμό και με τους δύο τύπους κυττάρων. Παράλληλα η μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Bcl-xL και των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, προκασπάσης-9 και προκασπάσης-3, αλλά και της αποπτωτικής πρωτεΐνης κασπάσης-9 στα ολικά εκχυλίσματα των όγκων των μυών NOD-SCID που εμβολιάστηκαν με 1.000.000 κύτταρα, έδειξε μείωση των επιπέδων των προαναφερθέντων μορίων στους όγκους HepG2mtGFPGR κυττάρων, σε σχέση με τα τους όγκους αναφοράς. Η μείωση αυτή, λόγω της μη παρατηρούμενης επαγωγής απόπτωσης, μας οδήγησε στη διερεύνηση επαγωγής μηχανισμών αυτοφαγίας. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η αυτοφαγία μπορεί να ανταγωνίζεται την απόπτωση προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, μέσω της απομάκρυνσης των οργανιδίων που έχουν υποστεί βλάβη και αποτελούν πηγή γενετοξικών ROS ή με τον καταβολισμό των κυτταρικών μακρομορίων εξασφαλίζει την παροχή θρεπτικών ενώσεων και ενέργειας για τα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, μέσω αποικοδόμησης των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, περιορίζει το στρες που υφίσταται το ενδοπλασματικό δίκτυο [225]. Επίσης, είναι γνωστό ότι η αυτοφαγία εμπλέκεται στη ρύθμιση του καρκίνου είτε μέσω ενίσχυσης του, είτε μέσω καταστολής του [145]. Όσον αφορά την ενίσχυση του καρκίνου, δεδομένου ότι οι όγκοι μεγαλώνουν σε περιβάλλον όπου επικρατούν υποξικές συνθήκες και έλλειψη θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων, η επαγωγή της αυτοφαγίας προωθεί την ανάπτυξη του καρκίνου περιορίζοντας το μεταβολικό στρες [158]. Είναι γνωστό ότι τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού με τον οποίο πολλαπλασιάζονται, έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούν την αυτοφαγία ως έναν μηχανισμό, ο οποίος θα τους εξασφαλίσει την απαραίτητη ενέργεια (ATP), αλλά και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά και τους ενδιάμεσους μεταβολίτες που χρειάζονται για να μπορέσουν να αναπτυχθούν [145].

Η μελέτη μηχανισμών αυτοφαγίας ανέδειξε ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας στους όγκους των κυττάρων HepG2mtGFPGR. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τα αυξημένα επίπεδα του λόγου των μορίων LC3II/LC3I και του αυτοφαγικού υποδοχέα BINIP3L/NIX, καθώς και από τα μειωμένα επίπεδα του P62, τα επίπεδα του οποίου μειώνονται, καθώς το μόριο αυτό αποικοδομείται μετά την έναρξη της αυτοφαγίας, σε ολικά εκχυλίσματα των όγκων των μυών NOD-SCID που

εμβολιάστηκαν με 1.000.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με αυτών των HepG2mtGFP κυττάρων. Επίσης, στους προαναφερθέντες όγκους παρατηρήθηκαν μειωμένα και τα επίπεδα του μορίου BECN1, το οποίο θεωρείται καταστολέας της καρκινογένεσης (βιβλιογραφία). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου BINIP3L/NIX, σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από όγκους των μυών NSG που εμβολιάστηκαν με 100.000 και 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την θεωρία επαγωγής αυτοφαγίας και παράλληλα παρεμπόδισης αποπτωτικών μηχανισμών, δεδομένου ότι από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η μιτοχονδριακή εντόπιση του παράγοντα BINIP3L/NIX, συμβάλει στην παρεμπόδιση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και συνεπώς σε μη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια [232].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι, παρουσία του mtGR, σε συνθήκες ανάπτυξης όγκων, παρατηρήθηκαν αλλαγές και στα επίπεδα ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs, και συμβάλλουν στη ενίσχυση του βιοσυνθετικού ρόλου του κύκλου, δηλαδή στην παραγωγή πρόδρομων μορίων. Στόχος που επιτυγχάνεται, όπως προαναφέρθηκε, και μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών αυτοφαγίας. Πιο συγκεκριμένα, στους όγκους των μυών NOD-SCID που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού οξέος ήταν μειωμένα, τα επίπεδα της MDH2 αυξημένα, ενώ τα επίπεδα της SDH δεν μεταβάλλονταν, σε σύγκριση με τους όγκους αναφοράς. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και από τα μειωμένα επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού οξέος στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών NSG που εμβολιάστηκαν τόσο με τα 100.000 όσο και με τα 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς. Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούν με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, τα οποία υποστηρίζουν ότι η απώλεια του ενζύμου της συνθάσης του κιτρικού οξέος, αποδυναμώνει τη συνεισφορά του κύκλου του Krebs στη παραγωγή ενέργειας και ενισχύει μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας μέσω ενεργοποίησης της γλυκολυτικής οδού και όχι μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, θεωρία η οποία υποστηρίζεται και από το Warburg effect [233,256-258]. Επίσης, από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στο καρκίνο η αύξηση των επιπέδων της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, ενισχύει την παραγωγή πρόδρομων μορίων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν από τα καρκινικά κύτταρα σε βιοσυνθετικές πορείες [234].

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, τα οποία συνηγορούν στην αλλαγή του μεταβολισμού από τον GR, οδηγώντας στην ενίσχυση της γλυκολυτικής πορείας και στην καρκινογένεση ενισχύονται και από τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των πυρηνικά (COX5B, COXIV, GRIM 19, NDUFS2) και μιτοχονδριακά (COX I, COX II) κωδικοποιούμενων υπομονάδων ενζύμων αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) καθώς και από τα μειωμένα επίπεδα των πυρηνικά κωδικοποιούμενων μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμιστών της μιτοχονδριακής μεταγραφής (PPARα, MtfA), στους όγκους των μυών NOD-SCID που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με τους όγκους αναφοράς. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τα μειωμένα επίπεδα του μορίου NDUFS2 στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών NSG που εμβολιάστηκαν τόσο με

100.000 όσο και με 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, αλλά και από τα μειωμένα επίπεδα του COXII στους μύες NSG με τα 100.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR. Η παράλληλη μείωση μιτοχονδριακά και πυρηνικά κωδικοποιούμενων παραγόντων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και λειτουργίας, συμφωνεί και επιβεβαιώνει την ύπαρξη ρυθμιστικών μηχανισμών συγχρονισμού και συνομιλίας πυρήνας – μιτοχονδρίου [60,65,259,260]. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου COX15 στους όγκους των μυών NOD-SCID που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, η οποία συμφωνεί με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, που υποστηρίζουν ότι αύξηση του συγκεκριμένου μορίου προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα και ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους [235,240]. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η παρουσία του μιτοχονδριακού GR, υπό συνθήκες ανάπτυξης όγκων, που ισοδυναμεί με συνθήκες κυτταρικού στρες, προκαλείται καταστολή της βιοσύνθεσης μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, η οποία ενεργοποιεί μηχανισμούς επίτευξης ενορχήστρωσης πυρηνικών και μιτοχονδριακών δράσεων και κατά συνέπεια μείωση της βιοσύνθεσης πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου PDH, το οποίο συνδέει την γλυκόλυση με τον κύκλο του Krebs, δεν παρουσίασαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των όγκων που προέκυψαν από τις δύο κυτταρικές σειρές. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση του mtGR με την PDH πιθανόν να οδηγεί σε αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου, οι οποίες να ευθύνονται ή/και να συμβάλλουν στον παρατηρούμενο μεταβολικό επαναπρογραμματισμό.

Οι προαναφερθείσες μεταβολές αναμένεται να επηρεάσουν και το μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως προαναφέρθηκε. Σε αυτό το πλαίσιο παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της μιτοχονδριακής PEPCK (PEPCK-M) (γλυκονογεννητικό ένζυμο) και αύξηση του ενζύμου NQO1 (αυξημένα επίπεδα του οποίου, όπως περιγράφεται στη συνέχεια, ενισχύουν τη γλυκόλυση), στους όγκους που προήλθαν από τους μύες που είχαν εμβολιαστεί με την καρκινική σειρά HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Τα μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK επιβεβαιώνονται και στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν είτε με 100.000 κύτταρα είτε με 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Η αύξηση των επιπέδων του NQO1 σχετίζεται με ενίσχυση της γλυκολυτικής οδού, μέσω αύξησης και αναγέννησης των NAD⁺ [237-239]. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι το ένζυμο NQO1 προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα έναντι διαφόρων κυτταροτοξικών μηχανισμών [240]. Ωστόσο, στους προαναφερθέντες όγκους, τα επίπεδα έκφρασης της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος, μέσω της οποίας παράγεται γαλακτικό και αναγεννάται NAD⁺ δεν παρουσίασαν μεταβολές. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος (LDH) μπορούν είτε να διαφοροποιούνται είτε όχι στον καρκίνο, καθώς υπάρχουν ασθενείς με φυσιολογικά επίπεδα LDH, οι οποίοι και ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία έναντι του καρκίνου [236]. Έτσι, υπό συνθήκες υπερέκφρασης mtGR και καρκινογένεσης παρατηρούνται μεταβολές σε ένζυμα που συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης, που οδηγούν τελικά σε ενίσχυση της γλυκολυτικής πορείας έναντι αυτής της γλυκονογένεσης.

Επιπλέον, οι προκαλούμενες αλλαγές στον μεταβολισμό εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων mtGR φαίνεται να επηρεάζουν και τις αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις των κυττάρων, όπως υποδεικνύεται από την παρατηρούμενη μείωση της υπομονάδας p65, του παράγοντα φλεγμονής NF-κB, τόσο στο ολικό εκχύλισμα των μυών NOD-SCID, όσο και στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των όγκων των μυών που εμβολιάστηκαν με 100.000 ή 10.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς. Επιπλέον, δεδομένου ότι στους ιστούς αυτούς επάγεται αυτοφαγία, η μείωση του p65 είναι αναμενόμενη, καθώς η αυτοφαγία επάγει την αποικοδόμηση συστατικών σηματοδοτικού μονοπατιού του NFκB [143].

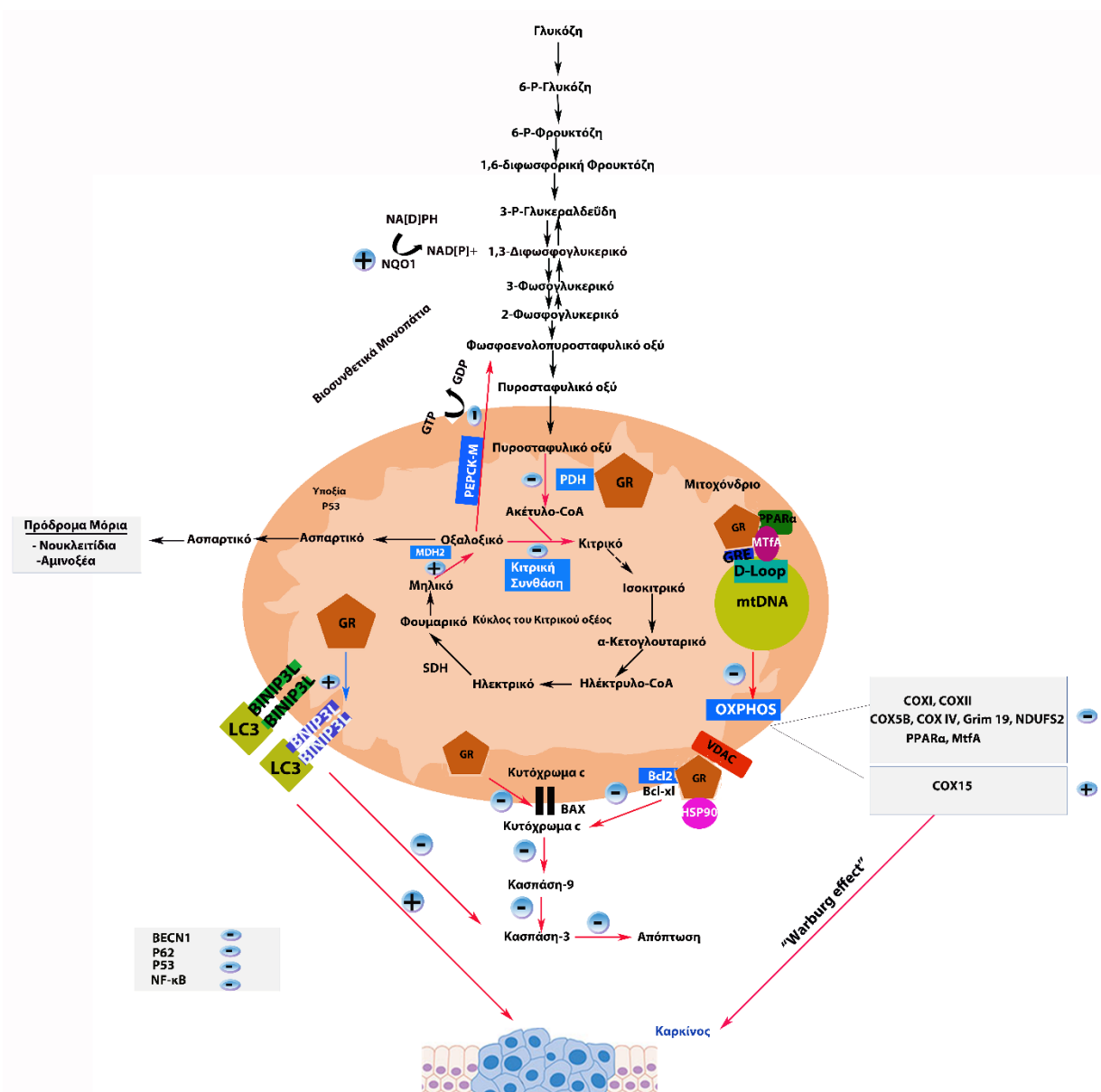
Επιπρόσθετα, στην παρούσα διδακτορική διατριβή στους όγκους των μυών NOD-SCID που προήλθαν από τα κύτταρα HepG2mtGFPGR, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53 ήταν μειωμένα, σε σύγκριση με τους όγκους αναφοράς. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, σύμφωνα με τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνων, το p53 παρουσιάζει είτε μειωμένα επίπεδα έκφρασης ή/και δραστηριότητας ή εμφανίζει αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων [245]. Επίσης, η μείωση του p53 συνάδει με την παρατηρούμενη επαγωγή αυτοφαγίας, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες επιστημονικές μελέτες [244]. Ωστόσο τα επίπεδα του p53 στους όγκους των μυών NSG που εμβολιάστηκαν με 100.000 κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σχέση με τους όγκους αναφοράς, παραμένουν σταθερά. Η διαφοροποίηση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους μύες NOD-SCID πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό τύπο των μυών, καθώς οι μύες NSG είναι πλήρως ανοσοκατεσταλμένοι και ο παράγοντας p53 αποτελεί <<συστατικό>> της φυσικής άμυνας του οργανισμού. Επίσης, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο παράγοντας p53 ανιχνεύεται και στα μιτοχονδριακά κλάσματα των μυών των κυττάρων HepG2mtGFPGR. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις που αναφέρουν μιτοχονδριακή εντόπιση p53 υπό συνθήκες υποξίας, που προκύπτουν κατά την ανάπτυξη συμπλεγμάτων όγκων [73].

Τέλος, αυξημένα επίπεδα mtGR οδήγησαν σε μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης μοριακού συνοδού HSP90 ενώ δεν προκάλεσαν μεταβολές στα επίπεδα της πρωτεΐνης HSP70, στους όγκους των μυών NOD-SCID των κυττάρων HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς HepG2mtGFP. Η μείωση της HSP90, πιθανόν να οφείλεται σε αναστολή των μηχανισμών υπερέκφρασης της, δεδομένου ότι ο GR βρίσκεται ήδη στα μιτοχόνδρια. Το μόριο αυτό είναι γνωστό ότι συμμετέχει στη μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια [242] και όπως αποδεικνύεται από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αλληλεπιδρά με την mtGR, και ενδεχομένως συμμετέχει σε μηχανισμούς εισόδου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν επηρεάζονται τα επίπεδα της HSP70, πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες HSP70 και HSP90 εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια ρύθμισης της ενεργοποίησης των δράσεων του GR, με την πρωτεΐνη HSP70 να εμπλέκεται στην αναδίπλωση του, ενώ την πρωτεΐνη HSP90 να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και υποκυτταρική μεταφορά του [242].

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, ακολουθεί περιγραφή του προτεινόμενου μηχανισμού μέσω του οποίου η υπερέκφραση του μιτοχονδριακού GR οδηγεί στην

ενίσχυση του ρυθμού ανάπτυξης όγκων κατά την καρκινογένεση (**εικόνα 72**). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι ο μιτοχονδριακός GR μπορεί να ρυθμίζει είτε θετικά είτε αρνητικά τη μιτοχονδριακή μεταγραφή [47,53,67,68]. Στην προκειμένη περίπτωση, υπό συνθήκες υποξίας και στρες, ο mtGR φαίνεται ότι προκαλεί αρνητική ρύθμιση στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και σύνθεση των υπομονάδων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μείωση αυτή των OXPHOS οδηγεί σε επαναπρογραμματισμό όλου του μεταβολισμού του κυττάρου, παρόμοιο με αυτόν που αναφέρεται στο Warburg effect [233]. Η διαδικασία επαναπρογραμματισμού εντός του μιτοχονδρίου, περιλαμβάνει αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος, ο οποίος πλέον περιορίζει τη διοχέτευση αναγωγικών ισοδυνάμων (NADH και FADH₂) στην αναπνευστική αλυσίδα-οξειδωτική φωσφορυλίωση, και λειτουργεί υπέρ του βιοσυνθετικού του ρόλου μέσω της παραγωγής πρόδρομων μορίων, όπως έχει παρατηρηθεί στην πλειονότητα των καρκίνων [234]. Συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος, η οποία αυξάνει την παραγωγή του οξαλοξικού οξέος, το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε ασπαρτικό οξύ, που εξέρχεται στο κυτοσόλιο για την παραγωγή πρόδρομων μορίων (πχ. νουκλεοτίδια), τα οποία θα αποτελέσουν πηγή ATP για τα καρκινικά κύτταρα [261]. Παράλληλα με τα γεγονότα που προαναφέρθηκαν, σήματα τα οποία εξέρχονται από τα μιτοχόνδρια επάγουν τροποποιήσεις της πυρηνικής μεταγραφής, οδηγώντας στη μείωση της μιτοχονδριακής PEPCK και αύξηση του ενζύμου NQO1, αποδυναμώνοντας τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης και ενισχύοντας τη γλυκολυτική πορεία, αντίστοιχα. Μάλιστα, μείωση της PEPCK-M και καταστολή της γλυκονεογένεσης, έχει αναφερθεί και παρουσία άλλων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο Stat-3, του οποίου η μιτοχονδριακή εντόπιση και η απευθείας ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας έχει επίσης παρατηρηθεί [262,263]. Η μείωση του ATP που προκύπτει από τη μειωμένη συμμετοχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην παραγωγή ενέργειας, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης AMP και τη μείωση του ενεργειακού φορτίου των κυττάρων. Η αυξημένη συγκέντρωση AMP συνεπάγεται ενεργοποίηση της AMPK κινάσης, η ενεργοποίηση της οποίας προκαλεί μείωση των επιπέδων της PEPCK και κατά συνέπεια αναστολή της γλυκονεογένεσης [79]. Στην όλη διαδικασία επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού κομβικό ρόλο παίζει και το ένζυμο αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο πιθανόν να υφίσταται τροποποίηση της δραστηριότητάς του μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Η τροποποίηση της δράσης του ενζύμου, το οποίο αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ του κύκλου του Krebs και της γλυκόλυσης θα συμβάλει επίσης σημαντικά στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού του κυττάρου κατά την καρκινογένεση. Οι αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια και πρόδρομα μόρια για τις βιοσυνθετικές πορείες των γρήγορα αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων οδηγεί παράλληλα στην ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτοφαγίας, όπως υποδεικνύεται από την αύξηση των επιπέδων του λόγου των μορίων LC3II/LC3I και του μορίου BINIP3L/NIX και μείωση των επιπέδων του μορίου P62, υπό συνθήκες αυξημένων επιπέδων mtGR. Μάλιστα, η επαγωγή της αυτοφαγίας συνάδει και με την παρατηρούμενη μείωση του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53 [244] για τον οποίο είναι γνωστό ότι μείωση του οδηγεί στη μείωση των OXPHOS και της απόπτωσης [264]. Επίσης, η ανίχνευση του p53 εντός του

μιτοχονδρίου επιβεβαιώνει και την ύπαρξη συνθηκών υποξίας, που αναφέρθηκαν παραπάνω [73]. Επιπλέον, σε όλα τα παραπάνω προστίθεται και το γεγονός ότι στους όγκους των κυττάρων HepG2mtGFPGR, δε λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός της μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης, γεγονός που υποδεικνύεται από τη μη απελευθέρωση κυτοχρώματος c και επιβεβαιώνεται από το αυξημένο μέγεθος των όγκων αυτών. Αντιθέτως, τα μόρια που συμμετέχουν στην απόπτωση πχ. κασπάσες πρωτεολύονται από τον αυτοφαγικό μηχανισμό [226], καθώς ο μηχανισμός της αυτοφαγίας μπορεί να ανταγωνίζεται τον αποπτωτικό μηχανισμό, με σκοπό την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την παραγωγή πρόδρομων μορίων [225], όπως προαναφέρθηκε. Συνεπώς, όπως διαφαίνεται η παρουσία του GR εντός του μιτοχονδρίου είναι υψίστης σημασίας, καθώς οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού και στην ανάπτυξη όγκων.



Διδακτορική διατριβή

Καρρά Αικατερίνη

Εικόνα 72: Μηχανισμός μέσω του οποίου ο GR οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων, όπως προέκυψε από την παρούσα διδακτορική διατριβή. Τα (-) και (+) υποδηλώνουν είτε αρνητική είτε θετική ρύθμιση, αντίστοιχα στις σηματοδοτικές οδούς που παρουσιάζονται στο παραπάνω σχήμα, ενώ τα κόκκινα βέλη παρουσιάζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία επηρεάζονται παρουσία του mtGR.

Δεδομένου ότι στην *in vivo* μελέτη διερεύνησης του ρόλου του mtGR στα μιτοχόνδρια και ιδιαίτερα στην ανάπτυξη όγκων, συμμετέχει και το φαινόμενο της υποξίας, ένα καλό μοντέλο για να ελέγξουμε την επίδραση του mtGR στον ενεργειακό μεταβολισμό, ανεξάρτητα από συνθήκες υποξίας, θεωρήθηκαν τα κύτταρα HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR σε καλλιέργεια, όπου υπάρχει πλήρης διαθεσιμότητα τροφής και οξυγόνου. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων SDH, β-ακτίνης και GAPDH, καθώς και της νουκλεολίνης που παρουσιάζει αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση, μεταξύ ίσου αριθμού των HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR κυττάρων. Τα επίπεδα των μορίων αυτών δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μόρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μόρια κανονικοποίησης.

Όσον αφορά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της COX II, τόσο σε ολικό εκχύλισμα όσο και σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα κυττάρων HepG2, HepG2mtGFP και HepG2mtGFPGR, δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της μιτοχονδριακής PEPCK, αλλά και της κυτταροπλασματικής υπομονάδας p65 στα κύτταρα HepG2mtGFPGR, σε σύγκριση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα *in vivo* πειράματα στους μύες. Η παρατηρούμενη μείωση της PEPCK και στην περίπτωση των κυττάρων σε καλλιέργεια, ενισχύει την αρχική μας υπόθεση, ότι η υπερέκφραση του GR στα μιτοχόνδρια πιθανόν να οδηγεί σε αλλαγή του μεταβολισμού, η οποία οδηγεί τελικά σε καταστολή της βιοσυνθετικής γλυκονεογενετικής πορείας και ενίσχυσης της καταβολικής γλυκολυτικής πορείας. Επίσης, δεδομένου ότι τόσο ο πυρηνικός όσο και ο μιτοχονδριακός GR μπορούν να καταστείλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, μέσω άμεσης σύνδεσης του τελευταίου στον υποδοχέα [60], η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της υπομονάδας p65 του NF-κB στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των κυττάρων HepG2mtGFPGR και όχι στα μιτοχονδριακά, πιθανόν να υποδηλώνει συνομιλία μεταξύ των σηματοδοτικών οδών των δύο μεταγραφικών παραγόντων, που ελέγχεται μεταξύ άλλων και από τον μιτοχονδριακό συνεντοπισμό τους, όπως έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση άλλων μεταγραφικών παραγόντων [265].

Επιπρόσθετα, τα σταθερά επίπεδα του BINIP3L/NIX μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών, τα οποία έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τους εμβολιασμένους μύες NOD-SCID με την κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR υποδηλώνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του mtGR δεν αποτελούν ικανή και αναγκαία συνθήκη για την ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτοφαγίας. Τα

αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας λαμβάνει χώρα όταν “συνυπάρχουν” συνθήκες υποξίας.

Για τον έλεγχο της ορμονοεξαρτώμενης διαφορικής έκφρασης μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, υπό τον έλεγχο του mtGR, κύτταρα από τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές, αναπτύχθηκαν σε DMEM, απουσία phenol red και απουσία ή παρουσία δεξαμεθαζόνης 10^{-7} M, για 6,16 ή 36 ώρες. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα επίπεδα των διαφόρων μιτοχονδριακών μορίων υφίστανται αλλαγές, οι οποίες εξαρτώνται από τον χρόνο επώασης των κυττάρων με τη δεξαμεθαζόνη. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επώασης με τη δεξαμεθαζόνη (βλέπε 36 ώρες επώασης με DEX), κατά συνέπεια αύξηση της χρονικής διάρκειας έκθεσης σε στρεσογόνο κατάσταση, τα επίπεδα διαφόρων μορίων παρατηρούνται μειωμένα, γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους μύες NOD-SCID και NSG. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα της PEPCK παραμένουν μειωμένα στην καρκινική κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR τόσο απουσία δεξαμεθαζόνης, όσο και μετά την επώαση των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη για 6 ή 16 ώρες. Γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αυξημένα επίπεδα του GR αρκούν να επιφέρουν αυτήν την αλλαγή και πιθανόν η αλληλεπίδραση του mtGR με την PDH, η οποία λαμβάνει χώρα ανεξαρτήτως επιπλέον συνθηκών, να παίζει καίριο ρόλο στην επιφερόμενη αυτήν αλλαγή. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του P65, τόσο απουσία όσο και παρουσία δεξαμεθαζόνης (6,16, 36 ώρες), δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Αντίθετα, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του COXII, αυτά παρουσιάζουν μια μικρή αύξηση, απουσία DEX, στην κυτταρική σειρά HepG2mtGFPGR, η οποία ενισχύεται λίγο στο βωρο επώασης με την DEX, ενώ στο δεκαεξάωρο και τριανταεξάωρο επώασης με δεξαμεθαζόνη, τα επίπεδα του συγκεκριμένου μορίου μειώνονται σημαντικά στη προαναφερθείσα κυτταρική σειρά. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση του mtGR στην βιοσύνθεση OXPHOS σχετίζεται με τον χρόνο επώασης, και πιθανόν και με τα επίπεδα DEX, γεγονός που έχει αναφερθεί και στο παρελθόν για μηχανισμούς που σχετίζονται τόσο με ενεργοποίηση μιτοχονδριακής μεταγραφής όσο και με επαγωγή μιτοχονδριακή επαγόμενης απόπτωσης [68,266]. Κατά αντιστοιχία, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου COX5B, απουσία και παρουσία δεξαμεθαζόνης για 6 ώρες, δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής αυξάνονται στο 16ωρο επώασης με DEX, ενώ στη συνέχεια δεν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στο 36ωρο επώασης με DEX, μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Επίσης, τα επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού οξέος δεν διαφοροποιούνται μεταξύ των τριών κυτταρικών είτε απουσία είτε παρουσία δεξαμεθαζόνης για 6 και 16 ώρες, ενώ μειώνονται σημαντικά στο 36ωρο επώασης με DEX, δράση η οποία θα μπορούσε να συσχετιστεί με όμοιά της κατά τη στρεσογόνα κατάσταση ανάπτυξης των όγκων στο in vivo μοντέλο μελέτης. Τέλος, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του p53, απουσία DEX, είναι αυξημένα στην κυτταρική HepG2mtGFPGR (σε σύγκριση με τις άλλες κυτταρικές σειρές). Παρουσία DEX για 6 ώρες, επάγεται η έκφραση του p53 σε όλες τις κυτταρικές σειρές, όπου πλέον δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Ωστόσο, όταν τα κύτταρα επωάζονται με DEX για 16 ώρες, ενώ τα επίπεδα του μορίου αυτού συνεχίζουν να αυξάνονται

στις κυτταρικές σειρές HepG2 και HepG2mtGFP, η δράση του mtGR δεν ενισχύεται περαιτέρω με την DEX.

Συνεπώς, με βάση όλα τα παραπάνω αλλά και με βάση τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας [67], η <<διαφορετική θεραπεία>>, ο διαφορετικός χρόνος επώασης των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη αλλά και οι διαφορετικές περιοχές του mtDNA που κωδικοποιούν την έκφραση των διαφόρων πρωτεϊνών οδηγούν στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης τους, όπως φαίνεται και από τα παραπάνω αποτελέσματα.

Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, κατά την παρούσα διδακτορική διατριβή επιτεύχθηκε η εύρεση εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), οι οποίοι ενεργοποιούν επιλεκτικά τις δράσεις του GR που σχετίζονται με την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων (πχ. NF-κB), ενώ καταστέλλουν άλλες που σχετίζονται με ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων από τον GR (πχ. PEPCK). Μάλιστα, οι ενώσεις αυτές είχαν και αντικαρκινική δράση. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η πιθανή αλληλεπίδραση του GR, στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, με μια σειρά μορίων που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, στην απόπτωση, αλλά και στη μεταφορά του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Επίσης, κατά την παρούσα διατριβή βρέθηκε ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη όγκων, μειώνοντας τα επίπεδα των OXPLOS, γεγονός το οποίο οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω ενίσχυσης της γλυκόλυσης, μείωση της γλυκονεογένεσης και ενίσχυση του βιοσυνθετικού ρόλου του κύκλου του κιτρικού οξέος. Στην όλη διαδικασία, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η αυτοφαγία, η οποία έχει ως σκοπό την παραγωγή πρόδρομων μορίων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας για τα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, εξετάζοντας τη διαφορετική έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων διαφόρων μιτοχονδριακών μορίων, παρουσία του mtGR και παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης, φαίνεται ότι τα επίπεδα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη διαφορετική επώαση με τη δεξαμεθαζόνη, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η όλη ρύθμιση είναι ορμονοεξαρτώμενη. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον και αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω.

Βιβλιογραφία

1. Alexander SP, Cidlowski JA, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, et al. (2017) THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Nuclear hormone receptors. *Br J Pharmacol* 174 Suppl 1: S208-S224.
2. Escriva H, Delaunay F, Laudet V (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22: 717-727.
3. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V (2003) The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116: 585-586.
4. Ortsater H, Sjöholm A, Rafacho A (2012) Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess.
5. He Y, Yi W, Suino-Powell K, Zhou XE, Tolbert WD, et al. (2014) Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids. *Cell Res* 24: 713-726.
6. Oakley RH, Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132: 1033-1044.
7. Vegiopoulos A, Herzig S (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol* 275: 43-61.
8. Buttgerit F, Mehta D, Kirwan J, Szechinski J, Boers M, et al. (2013) Low-dose prednisone chronotherapy for rheumatoid arthritis: a randomised clinical trial (CAPRA-2). *Ann Rheum Dis* 72: 204-210.
9. Kadmiel M, Cidlowski JA (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34: 518-530.
10. Miesfeld R, Okret S, Wikstrom AC, Wrangé O, Gustafsson JA, et al. (1984) Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. *Nature* 312: 779-781.
11. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839.
12. Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
13. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C (2013) New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154: 993-1007.
14. Ma H, Hong H, Huang SM, Irvine RA, Webb P, et al. (1999) Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol Cell Biol* 19: 6164-6173.
15. Ismaili N, Garabedian MJ (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024: 86-101.
16. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20: 321-344.
17. McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474.
18. Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298: 416-419.
19. Revollo JR, Cidlowski JA (2009) Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1179: 167-178.
20. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA (1999) The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274: 27857-27866.

21. Zhou J, Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70: 407-417.
22. Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, et al. (2009) Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381: 671-675.
23. Lefstin JA, Yamamoto KR (1998) Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392: 885-888.
24. Schacke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K (2007) Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* 275: 109-117.
25. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, et al. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541.
26. Rogatsky I (2003) Drug discovery for inflammatory diseases. *Expert Opin Biol Ther* 3: 1001-1004.
27. Granner DK, Beale EG (1985) Regulation of the synthesis of tyrosine aminotransferase and phosphoenolpyruvate carboxykinase by glucocorticoid hormones. *Biochemical actions of hormones* 12: 89-138.
28. Ruppert S, Boshart M, Bosch FX, Schmid W, Fournier RE, et al. (1990) Two genetically defined trans-acting loci coordinately regulate overlapping sets of liver-specific genes. *Cell* 61: 895-904.
29. Dostert A, Heinzl T (2004) Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 10: 2807-2816.
30. Philips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, et al. (1997) Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17: 5952-5959.
31. Meyer T, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J (1997) Glucocorticoid-dependent transcriptional repression of the osteocalcin gene by competitive binding at the TATA box. *DNA Cell Biol* 16: 919-927.
32. Andrew C.B. Cato HS, Wolfram Sterry and Khusru Asadullah (2004) The Glucocorticoid Receptor as Target for Classic and Novel Anti-Inflammatory Therapy. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 3: 347-353.
33. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, et al. (1994) A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13: 4087-4095.
34. Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schutz G, et al. (1999) The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol* 147: 1365-1370.
35. Reily MM, Pantoja C, Hu X, Chinenov Y, Rogatsky I (2006) The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J* 25: 108-117.
36. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, et al. (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122: 707-721.
37. Nissen RM, Yamamoto KR (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14: 2314-2329.
38. Refojo D, Liberman AC, Holsboer F, Arzt E (2001) Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* 79: 385-394.

39. Bladh LG, Liden J, Dahlman-Wright K, Reimers M, Nilsson S, et al. (2005) Identification of endogenous glucocorticoid repressed genes differentially regulated by a glucocorticoid receptor mutant able to separate between nuclear factor-kappaB and activator protein-1 repression. *Mol Pharmacol* 67: 815-826.
40. Caelles C, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A (1997) Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* 11: 3351-3364.
41. Bruna A, Nicolas M, Munoz A, Kyriakis JM, Caelles C (2003) Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J* 22: 6035-6044.
42. Rogatsky I, Ivashkiv LB (2006) Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68: 1-12.
43. Feige JN, Auwerx J (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol* 17: 292-301.
44. Xu J, O'Malley BW (2002) Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord* 3: 185-192.
45. Rogatsky I, Zarembek KA, Yamamoto KR (2001) Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *EMBO J* 20: 6071-6083.
46. Tasker JG, Herman JP (2011) Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress* 14: 398-406.
47. Psarra AM, Sekeris CE (2008) Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1-11.
48. Psarra AM, Sekeris CE (2008) Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life* 60: 210-223.
49. Demonacos C, Tsawdaroglou NC, Djordjevic-Markovic R, Papalopoulou M, Galanopoulos V, et al. (1993) Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46: 401-413.
50. Scheller K, Sekeris CE, Krohne G, Hock R, Hansen IA, et al. (2000) Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur J Cell Biol* 79: 299-307.
51. Moutsatsou P, Psarra AM, Tsiapara A, Paraskevaki H, Davaris P, et al. (2001) Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 386: 69-78.
52. Psarra AM, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Sekeris CE, Tsacopoulos M (2003) Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Muller) cells in the salamander retina. *Glia* 41: 38-49.
53. Psarra AM, Solakidi S, Trougakos IP, Margaritis LH, Spyrou G, et al. (2005) Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2544-2558.
54. Sionov R, Kfir S, Zafrir E, Cohen O, Zilberman Y, et al. (2006) Glucocorticoid-Induced Apoptosis Revisited. *5: 1017-1026.*
55. Bhangoo MK, Tzankov S, Fan AC, Dejgaard K, Thomas DY, et al. (2007) Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import. *Mol Biol Cell* 18: 3414-3428.
56. Wiedemann N, Pfanner N (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem* 86: 685-714.

57. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41-50.
58. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 781-791.
59. Bonawitz ND, Clayton DA, Shadel GS (2006) Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell* 24: 813-825.
60. Psarra AM, Sekeris CE (2009) Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim Biophys Acta* 1787: 431-436.
61. Yu FL, Feigelson P (1970) Effects of cortisone on orotic acid transport and RNA synthesis in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 141: 662-667.
62. Schmid W, Sekeris CE (1972) Sequential stimulation of extranucleolar and nucleolar RNA synthesis in rat liver by cortisol. *FEBS Lett* 26: 109-112.
63. Schmid W, Sekeris CE (1975) Nucleolar RNA synthesis in the liver of partially hepatectomized and cortisol-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 402: 244-252.
64. Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG (2016) Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 85: 133-160.
65. Psarra AM, Sekeris CE (2011) Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1814-1821.
66. Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE (2006) The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol* 246: 21-33.
67. Lapp HE, Bartlett AA, Hunter RG (2019) Stress and glucocorticoid receptor regulation of mitochondrial gene expression. *J Mol Endocrinol* 62: R121-R128.
68. Hunter RG, Seligsohn M, Rubin TG, Griffiths BB, Ozdemir Y, et al. (2016) Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9099-9104.
69. Bose R, Moors M, Tofighi R, Cascante A, Hermanson O, et al. (2010) Glucocorticoids induce long-lasting effects in neural stem cells resulting in senescence-related alterations. *Cell Death Dis* 1: e92.
70. Datson NA, van der Perk J, de Kloet ER, Vreugdenhil E (2001) Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur J Neurosci* 14: 675-689.
71. Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, Guttridge DC, Reuther JY, et al. (2003) NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. *J Biol Chem* 278: 2963-2968.
72. Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-16212.
73. Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM (2001) Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* 488: 110-115.
74. Abramova NE, Davies KJ, Crawford DR (2000) Polynucleotide degradation during early stage response to oxidative stress is specific to mitochondria. *Free Radic Biol Med* 28: 281-288.
75. Donahue RJ, Razmara M, Hoek JB, Knudsen TB (2001) Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. *FASEB J* 15: 635-644.
76. Ibrahim MM, Razmara M, Nguyen D, Donahue RJ, Wubah JA, et al. (1998) Altered expression of mitochondrial 16S ribosomal RNA in p53-deficient mouse embryos revealed by differential display. *Biochim Biophys Acta* 1403: 254-264.

77. Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, et al. (2003) P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 63: 3729-3734.
78. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012) *Biochemistry*. Basingstoke: W.H. Freeman.
79. Zhang H, Feng YW, Yao YM (2018) Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis. *Mil Med Res* 5: 41.
80. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
81. Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-474.
82. Paweletz N (2001) Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 72-75.
83. Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
84. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35: 495-516.
85. Norbury CJ, Hickson ID (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401.
86. Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2: 277-288.
87. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 4: 138-144.
88. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM (1998) Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273: 29648-29653.
89. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103.
90. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1150-1154.
91. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J (2002) Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9: 1115-1125.
92. Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, Fisher J, LaBarge M, et al. (1998) Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 8: 461-471.
93. Gruver-Yates AL, Cidlowski JA (2013) Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells* 2: 202-223.
94. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, et al. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554.
95. Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99.
96. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, et al. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192: 571-580.
97. Herr I, Buchler MW, Mattern J (2009) Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. *Results Probl Cell Differ* 49: 191-218.
98. Smith LK, Cidlowski JA (2010) Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog Brain Res* 182: 1-30.
99. Evans-Storms RB, Cidlowski JA (2000) Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* 141: 1854-1862.

100. Zhang J (2013) Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol* 1: 19-23.
101. Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 7: 29-39.
102. Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma VR (2019) The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Med Res Rev* 39: 517-560.
103. Wang RC, Levine B (2010) Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett* 584: 1417-1426.
104. Hietakangas V, Cohen SM (2009) Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43: 389-410.
105. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, et al. (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981-1991.
106. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, et al. (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20: 1992-2003.
107. Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 23: 3898-3904.
108. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB (2005) Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 439-448.
109. Bernales S, Papa FR, Walter P (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 487-508.
110. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
111. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, et al. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287: 664-666.
112. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, et al. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26: 9220-9231.
113. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, et al. (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182: 685-701.
114. Kubli DA, Gustafsson AB (2012) Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111: 1208-1221.
115. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, et al. (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 33: 505-516.
116. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-24145.
117. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, et al. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* 24: 8055-8068.
118. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S, Nazio F, Florenzano F, et al. (2011) Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J* 30: 1195-1208.
119. Van Humbeek C, Cornelissen T, Hofkens H, Mandemakers W, Gevaert K, et al. (2011) Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* 31: 10249-10261.
120. Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 12: 831-835.

121. Lee Y, Lee HY, Hanna RA, Gustafsson AB (2011) Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1924-1931.
122. Feng W, Huang S, Wu H, Zhang M (2007) Molecular basis of Bcl-xL's target recognition versatility revealed by the structure of Bcl-xL in complex with the BH3 domain of Beclin-1. *J Mol Biol* 372: 223-235.
123. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, et al. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939.
124. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, et al. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9: 1142-1151.
125. Molejon MI, Ropolo A, Re AL, Boggio V, Vaccaro MI (2013) The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci Rep* 3: 1055.
126. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, et al. (2010) Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* 190: 881-892.
127. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, et al. (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29: 2570-2581.
128. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, et al. (2008) Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4: 669-679.
129. Germain M, Nguyen AP, Le Grand JN, Arbour N, Vanderluit JL, et al. (2011) MCL-1 is a stress sensor that regulates autophagy in a developmentally regulated manner. *EMBO J* 30: 395-407.
130. Malik SA, Orhon I, Morselli E, Criollo A, Shen S, et al. (2011) BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene* 30: 3918-3929.
131. Pedro JM, Wei Y, Sica V, Maiuri MC, Zou Z, et al. (2015) BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy. *Autophagy* 11: 452-459.
132. Hollville E, Carroll RG, Cullen SP, Martin SJ (2014) Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy. *Mol Cell* 55: 451-466.
133. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, et al. (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 378-383.
134. Boya P, Kroemer G (2009) Beclin 1: a BH3-only protein that fails to induce apoptosis. *Oncogene* 28: 2125-2127.
135. Marquez RT, Xu L (2012) Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* 2: 214-221.
136. Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, et al. (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 1: e18.
137. Luo S, Rubinsztein DC (2010) Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ* 17: 268-277.
138. Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, et al. (2009) Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett* 274: 95-100.
139. Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 29: 1717-1719.

140. Betin VM, Lane JD (2009) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 122: 2554-2566.
141. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, et al. (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8: 1124-1132.
142. Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, et al. (2009) FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 11: 1355-1362.
143. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M (2011) The complex interplay between autophagy and NF-kappaB signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res* 1: 629-649.
144. White E (2015) The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* 125: 42-46.
145. Avalos Y, Canales J, Bravo-Sagua R, Criollo A, Lavandero S, et al. (2014) Tumor suppression and promotion by autophagy. *Biomed Res Int* 2014: 603980.
146. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672-676.
147. Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, et al. (2007) Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int J Oncol* 30: 429-436.
148. Wei Y, Zou Z, Becker N, Anderson M, Sumpter R, et al. (2013) EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell* 154: 1269-1284.
149. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, et al. (2011) Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 147: 223-234.
150. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, et al. (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432: 1032-1036.
151. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, et al. (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434.
152. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, et al. (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456: 264-268.
153. Saitoh T, Naonobu F, Yoshimori T, Akira S (2009) [Regulation of inflammation by autophagy]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 54: 1119-1124.
154. Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, et al. (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19: 4762-4775.
155. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, et al. (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25: 795-800.
156. Kashuba VI, Gizatullin RZ, Protopopov AI, Allikmets R, Korolev S, et al. (1997) NotI linking/jumping clones of human chromosome 3: mapping of the TFRC, RAB7 and HAUSP genes to regions rearranged in leukemia and deleted in solid tumors. *FEBS Lett* 419: 181-185.
157. Laddha SV, Ganesan S, Chan CS, White E (2014) Mutational landscape of the essential autophagy gene BECN1 in human cancers. *Mol Cancer Res* 12: 485-490.
158. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, et al. (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51-64.
159. Goldsmith J, Levine B, Debnath J (2014) Autophagy and cancer metabolism. *Methods Enzymol* 542: 25-57.
160. Egawa Y, Saigo C, Kito Y, Moriki T, Takeuchi T (2018) Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma. *PLoS One* 13: e0198940.

161. Hsu PP, Sabatini DM (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134: 703-707.
162. Lv L, Li D, Zhao D, Lin R, Chu Y, et al. (2011) Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol Cell* 42: 719-730.
163. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, et al. (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498: 109-112.
164. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11-20.
165. Gaglio D, Metallo CM, Gameiro PA, Hiller K, Danna LS, et al. (2011) Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol Syst Biol* 7: 523.
166. Burgess DJ (2013) Metabolism: Glutamine connections. *Nat Rev Cancer* 13: 293.
167. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, et al. (2012) Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* 15: 110-121.
168. Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT (2010) Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci Signal* 3: ra31.
169. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, et al. (2011) Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481: 380-384.
170. Solaini G, Sgarbi G, Baracca A (2011) Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1807: 534-542.
171. Strohecker AM, White E (2014) Targeting mitochondrial metabolism by inhibiting autophagy in BRAF-driven cancers. *Cancer Discov* 4: 766-772.
172. Sinha RA, Singh BK, Yen PM (2017) Reciprocal Crosstalk Between Autophagic and Endocrine Signaling in Metabolic Homeostasis. *Endocr Rev* 38: 69-102.
173. Troncoso R, Paredes F, Parra V, Gatica D, Vasquez-Trincado C, et al. (2014) Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle* 13: 2281-2295.
174. Shen G, Ren H, Shang Q, Qiu T, Yu X, et al. (2018) Autophagy as a target for glucocorticoid-induced osteoporosis therapy. *Cell Mol Life Sci* 75: 2683-2693.
175. Stahn C, Buttgereit F (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 525-533.
176. Maranzano E, Feyer P, Molassiotis A, Rossi R, Clark-Snow RA, et al. (2005) Evidence-based recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. *Radiother Oncol* 76: 227-233.
177. Baschant U, Lane NE, Tuckermann J (2012) The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 8: 645-655.
178. Rockall AG, Sohaib SA, Evans D, Kaltsas G, Isidori AM, et al. (2003) Computed tomography assessment of fat distribution in male and female patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 149: 561-567.
179. Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F (2004) Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4: S45-52.
180. Taskinen MR, Nikkila EA, Pelkonen R, Sane T (1983) Plasma lipoproteins, lipolytic enzymes, and very low density lipoprotein triglyceride turnover in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 619-626.

181. Rafacho A, Giozzet VA, Boschero AC, Bosqueiro JR (2008) Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas* 36: 284-293.
182. Debons AF, Zurek LD, Tse CS, Abrahamsen S (1986) Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity: dependence on adrenal glucocorticoids. *Endocrinology* 118: 1678-1681.
183. Prelovsek O, Mars T, Jevsek M, Podbregar M, Grubic Z (2006) High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1651-1656.
184. Schacke H, Docke WD, Asadullah K (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96: 23-43.
185. Carballo-Jane E, Pandit S, Santoro JC, Freund C, Luell S, et al. (2004) Skeletal muscle: a dual system to measure glucocorticoid-dependent transactivation and transrepression of gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88: 191-201.
186. Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM (2015) Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther* 152: 28-41.
187. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IM, Van Molle W, Hennuyer N, et al. (2005) A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15827-15832.
188. Chairez-Ramirez MH, Moreno-Jimenez MR, Gonzalez-Laredo RF, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzman NE (2016) Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI J* 15: 758-771.
189. Patlolla JM, Rao CV (2012) Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 147-155.
190. Poeckel D, Werz O (2006) Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* 13: 3359-3369.
191. Karra AG, Konstantinou M, Tzortziou M, Tsialtas I, Kalousi FD, et al. (2018) Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol. *Int J Mol Sci* 20.
192. Georgatzka D, Gorgogietas VA, Kylindri P, Charalambous MC, Papadopoulou KK, et al. (2016) The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists. *Int J Biochem Cell Biol* 79: 277-287.
193. Haridas V, Xu ZX, Kitchen D, Jiang A, Michels P, et al. (2011) The anticancer plant triterpenoid, avicin D, regulates glucocorticoid receptor signaling: implications for cellular metabolism. *PLoS One* 6: e28037.
194. Bai L, Gao J, Wei F, Zhao J, Wang D, et al. (2018) Therapeutic Potential of Ginsenosides as an Adjuvant Treatment for Diabetes. *Front Pharmacol* 9: 423.
195. Leung KW, Leung FP, Mak NK, Tombran-Tink J, Huang Y, et al. (2009) Protopanaxadiol and protopanaxatriol bind to glucocorticoid and oestrogen receptors in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 156: 626-637.
196. Mohanan P, Subramaniyam S, Mathiyalagan R, Yang DC (2018) Molecular signaling of ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3 and their mode of actions. *J Ginseng Res* 42: 123-132.
197. Liu YL, Jang S, Wang SM, Chen CH, Li FY (2016) Investigation on critical structural motifs of ligands for triggering glucocorticoid receptor nuclear migration through molecular docking simulations. *J Biomol Struct Dyn* 34: 1214-1231.

198. Scior T, Verhoff M, Gutierrez-Aztatzi I, Ammon HP, Laufer S, et al. (2014) Interference of boswellic acids with the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor. *J Chem Inf Model* 54: 978-986.
199. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.
200. ArgusLab 4.0. Mark AT Planaria Software LLC. Seattle.
201. Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
202. Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14: 33-38, 27-38.
203. L. Ke, R. S. M. B, R. B, A. G, et al. (1999) NAMD2: Greater Scalability for Parallel Molecular Dynamics. *Journal of Computational Physics* 151: 283–312.
204. Suino-Powell K, Xu Y, Zhang C, Tao YG, Tolbert WD, et al. (2008) Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol. *Mol Cell Biol* 28: 1915-1923.
205. Schoch GA, D'Arcy B, Stihle M, Burger D, Bar D, et al. (2010) Molecular switch in the glucocorticoid receptor: active and passive antagonist conformations. *J Mol Biol* 395: 568-577.
206. Shibuya M, Katsube Y, Otsuka M, Zhang H, Tansakul P, et al. (2009) Identification of a product specific beta-amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 47: 26-30.
207. CANNON WRNaJW (1968) CONCERNING THE MECHANISM AND CONTROL OF a-AMYRIN BIOSYNTHESIS. *Phytochemistry* 7: 1321-1323.
208. Santos FA, Frota JT, Arruda BR, de Melo TS, da Silva AA, et al. (2012) Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of alpha, beta-amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Dis* 11: 98.
209. Rios JL, Manez S (2018) New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta Med* 84: 8-19.
210. Laszczyk MN (2009) Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med* 75: 1549-1560.
211. Eyassu F, Angione C (2017) Modelling pyruvate dehydrogenase under hypoxia and its role in cancer metabolism. *R Soc Open Sci* 4: 170360.
212. Sionov RV, Cohen O, Kfir S, Zilberman Y, Yefenof E (2006) Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *J Exp Med* 203: 189-201.
213. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR, Agard DA (2014) Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157: 1685-1697.
214. Dittmar KD, Pratt WB (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 272: 13047-13054.
215. Kersten S (2014) Integrated physiology and systems biology of PPARalpha. *Mol Metab* 3: 354-371.
216. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, et al. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489-1498.
217. Benz R (1994) Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim Biophys Acta* 1197: 167-196.

218. Mannella CA (1992) The 'ins' and 'outs' of mitochondrial membrane channels. *Trends Biochem Sci* 17: 315-320.
219. Dihanich M (1990) The biogenesis and function of eukaryotic porins. *Experientia* 46: 146-153.
220. Forte M, Guy HR, Mannella CA (1987) Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J Bioenerg Biomembr* 19: 341-350.
221. Hiller S, Abramson J, Mannella C, Wagner G, Zeth K (2010) The 3D structures of VDAC represent a native conformation. *Trends Biochem Sci* 35: 514-521.
222. Hardwick JM, Soane L (2013) Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
223. Dong H, Shertzer HG, Genter MB, Gonzalez FJ, Vasiliou V, et al. (2013) Mitochondrial targeting of mouse NQO1 and CYP1B1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 727-732.
224. Ross D, Siegel D (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* 382: 115-144.
225. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A (2009) Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 16: 966-975.
226. Gump JM, Thorburn A (2011) Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends Cell Biol* 21: 387-392.
227. Tanida I, Ueno T, Kominami E (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445: 77-88.
228. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, et al. (2009) Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 452: 181-197.
229. Chen G, Cizeau J, Vande Velde C, Park JH, Bozek G, et al. (1999) Nix and Nip3 form a subfamily of pro-apoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 274: 7-10.
230. Ohi N, Tokunaga A, Tsunoda H, Nakano K, Haraguchi K, et al. (1999) A novel adenovirus E1B19K-binding protein B5 inhibits apoptosis induced by Nip3 by forming a heterodimer through the C-terminal hydrophobic region. *Cell Death Differ* 6: 314-325.
231. Diwan A, Matkovich SJ, Yuan Q, Zhao W, Yatani A, et al. (2009) Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in NIX-mediated murine cell death. *J Clin Invest* 119: 203-212.
232. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, et al. (2013) Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem* 288: 1099-1113.
233. Lin CC, Cheng TL, Tsai WH, Tsai HJ, Hu KH, et al. (2012) Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Sci Rep* 2: 785.
234. Lo YW, Lin ST, Chang SJ, Chan CH, Lyu KW, et al. (2015) Mitochondrial proteomics with siRNA knockdown to reveal ACAT1 and MDH2 in the development of doxorubicin-resistant uterine cancer. *J Cell Mol Med* 19: 744-759.
235. Jaluria P, Betenbaugh M, Konstantopoulos K, Shiloach J (2007) Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog. *BMC Biotechnol* 7: 71.
236. Endrizzi L, Fiorentino MV, Salvagno L, Segati R, Pappagallo GL, et al. (1982) Serum lactate dehydrogenase (LDH) as a prognostic index for non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18: 945-949.
237. Epstein T, Gatenby RA, Brown JS (2017) The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLoS One* 12: e0185085.

238. Luo S, Li Y, Ma R, Liu J, Xu P, et al. (2017) Downregulation of PCK2 remodels tricarboxylic acid cycle in tumor-repopulating cells of melanoma. *Oncogene* 36: 3609-3617.
239. Cheng X, Liu F, Liu H, Wang G, Hao H (2018) Enhanced glycometabolism as a mechanism of NQO1 potentiated growth of NSCLC revealed by metabolomic profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 496: 31-36.
240. Srijiwangsa P, Na Bangchang K (2017) Roles of NAD (P) H-Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) On Cancer Progression and Chemoresistance. *Journal of Clinical & Experimental Oncology* 06.
241. Sengupta S, Wasylyk B (2004) Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1024: 54-71.
242. Grad I, Picard D (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275: 2-12.
243. Li ZY, Jiang YM, Liu YM, Guo Z, Shen SN, et al. (2014) Saikosaponin D acts against corticosterone-induced apoptosis via regulation of mitochondrial GR translocation and a GR-dependent pathway. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 53: 80-89.
244. Levine B, Abrams J (2008) p53: The Janus of autophagy? *Nat Cell Biol* 10: 637-639.
245. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G (2019) Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ* 26: 199-212.
246. Sengupta S, Vonesch JL, Waltzinger C, Zheng H, Wasylyk B (2000) Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J* 19: 6051-6064.
247. Kumar A, Shah BA, Singh S, Hamid A, Singh SK, et al. (2012) Acyl derivatives of boswellic acids as inhibitors of NF-kappaB and STATs. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 431-435.
248. Yuan SY, Liu J, Zhou J, Lu W, Zhou HY, et al. (2016) AMPK Mediates Glucocorticoids Stress-Induced Downregulation of the Glucocorticoid Receptor in Cultured Rat Prefrontal Cortical Astrocytes. *PLoS One* 11: e0159513.
249. Shen L, Haas M, Wang DQ, May A, Lo CC, et al. (2015) Ginsenoside Rb1 increases insulin sensitivity by activating AMP-activated protein kinase in male rats. *Physiol Rep* 3.
250. Clarisse D, Van Wesemael K, Tavernier J, Offner F, Beck IM, et al. (2018) Effect of combining glucocorticoids with Compound A on glucocorticoid receptor responsiveness in lymphoid malignancies. *PLoS One* 13: e0197000.
251. Cidlowski JA, Cidlowski NB (1981) Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured HeLa S3 cells. *Endocrinology* 109: 1975-1982.
252. Hwang YP, Jeong HG (2010) Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 242: 18-28.
253. Shang W, Yang Y, Zhou L, Jiang B, Jin H, et al. (2008) Ginsenoside Rb1 stimulates glucose uptake through insulin-like signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Endocrinol* 198: 561-569.
254. Schlossmacher G, Platt E, Davies A, Meredith S, White A (2013) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis in small-cell lung cancer requires interaction with BCL2. *Endocr Relat Cancer* 20: 785-795.
255. Li ZY, Li QZ, Chen L, Chen BD, Zhang C, et al. (2016) HPOB, an HDAC6 inhibitor, attenuates corticosterone-induced injury in rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells by inhibiting mitochondrial GR translocation and the intrinsic apoptosis pathway. *Neurochem Int* 99: 239-251.

256. Zhuang X, Chen Y, Wu Z, Xu Q, Chen M, et al. (2019) Mitochondrial miR-181a-5p promotes glucose metabolism reprogramming in liver cancer by regulating the electron transport chain. *Carcinogenesis*.
257. Al-Shammari AM, Abdullah AH, Allami ZM, Yaseen NY (2019) 2-Deoxyglucose and Newcastle Disease Virus Synergize to Kill Breast Cancer Cells by Inhibition of Glycolysis Pathway Through Glyceraldehyde3-Phosphate Downregulation. *Front Mol Biosci* 6: 90.
258. Yan L, Raj P, Yao W, Ying H (2019) Glucose Metabolism in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 11.
259. Ryan MT, Hoogenraad NJ (2007) Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76: 701-722.
260. Goffart S, Wiesner RJ (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88: 33-40.
261. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18: 54-61.
262. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, et al. (2009) Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 323: 793-797.
263. Wang B, Hsu SH, Frankel W, Ghoshal K, Jacob ST (2012) Stat3-mediated activation of microRNA-23a suppresses gluconeogenesis in hepatocellular carcinoma by down-regulating glucose-6-phosphatase and peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. *Hepatology* 56: 186-197.
264. Saleem A, Adihetty PJ, Hood DA (2009) Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* 37: 58-66.
265. Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, et al. (2005) Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. *Mol Cell Biol* 25: 7432-7440.
266. Evans-Storms RB, Cidlowski JA (1995) Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 1-8.

Δημοσιεύσεις

Δημοσιεύσεις στο επιστημονικό πεδίο της διδακτορικής διατριβής

- **Karra, A.G.**, Konstantinou, M., Tzortziou, M., Tsialtas, I., Kalousi, F., Garagounis, C., Hayes, J.M, Psarra A.M. Potential dissociative glucocorticoid receptor activity for protopanaxadiol and protopanaxatriol. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20,1, 94.
- **Karra, A.G.**, Kylindri, P., Tzortziou, M., Gorgogietas, V.A., Georgatza, D., Makiou, A., Krokida, A., Tsialtas, I., Kalousi, F.D., Papadopoulos, G.E., Papadopoulou, K., Psarra A.M.G. Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions. Submitted to *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
- **Karra et al.** Mitochondrial glucocorticoid receptor promote growth of cancer cells via interaction with pyruvate dehydrogenase and regulation of oxidative phosphorylation enzymes biosynthesis (υπό συγγραφή).

Δημοσιεύσεις σε συναφή επιστημονικά πεδία

- Kyriakis, E., **Karra, A.G.**, Papaioannou, O., Solovou, T., Skamnaki, V., Liggri, P., Zographos, S., Szennyes, E., Bokor, E., Kun, S., Psarra, A.M., Somsák, L. The architecture of hydrogen and sulfur σ -hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C- β -D-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N- β -D glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase and offer new insights to structure-based design. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2020, 28, 1,115196.
- Tsialtas, I., Gorgogietas, V.A, Michalopoulou, M., Komninou, A., Liakou, E., Georgantopoulos, A., Kalousi, F.D., **Karra, A.G.**, Protopapa, E., Psarra, A.M. Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling. *Neurotoxicology*. 2019 (Under revision).
- Szabó, K.T., Kyriakis, E., Psarra, A.M.G, **Karra, A.G.**, Sipos, A., Docsa, T., Stravodimos, G.A., Katsidou, E., Skamnaki, V.T., Liggri, P.G.V., Zographos, S.E., Mándi, A., Király, S.B., Kurtán, T., Leonidas, D.D. and Somsák, L. Glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones, a New Ring System: Synthesis and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography. *J. Med. Chem.* 2019, 62, 13, 6116-6136.
- Gorgogietas, V.A., Tsialtas, I., Sotiriou, N., Laschou, V., **Karra, A.G.**, Leonidas, D.D., Chrousos, G.P., Protopapa, E., Psarra, A.M. (2018). Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signalling in breast cancer cells. *J. Mol. Biochem*, 7, 1-13.

Συμμετοχή σε επιστημονικά συνέδρια

- **Karra, A.G.**, Sereti, E., Dimas, K., Psarra A.M. The role of mitochondrial glucocorticoid receptor in tumor development. 70th National Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology November 2019, Larissa, Greece.
- Kalousi, F.D., **Karra, A.G.**, Christodoulou, S., Theodosi, A., Appendino, G., Psarra, A.M. Biological activities of resin and leaves from Chios Mastiha tree- Interference with glucocorticoid receptor signaling. 70th National Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology November 2019, Larissa, Greece.
- **Karra, A.G.**, Konstantinou, M., Tzortziou, M., Tsialtas, I., Kalousi, F., Hayes, J.M., Garagounis, C. and Psarra A.M.G. Potential dissociative glucocorticoid receptor activity for protopanaxadiol and protopanaxatriol. 69 National Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology, 6th Panhellenic Forum for Young Scientists, November 2018, Larissa, Greece.
- Kalousi, F.D., **Karra A.G.**, Appendino, G., Psarra, A.M.G. Potential dissociative glucocorticoid receptor activity for extracts from resin and leaves of Chios Mastiha tree, 69 th National Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology, 6 th Hellenic Young Forum 2018, Larissa, Greece
- Kalousi, F.D., **Karra, A.G.**, Psarra, A.M.G. Assesment of the biological action of extracts from Chios Mastic gum. 40th Scientific Conference of Hellenic Society of Biological Sciences. 2018, Veria, Greece.
- **Karra, A.G.**, Tziortziou, M., Zormpas, S., Papadopoulou, E., Papadopoulou, K., Psarra A.M.G. Evaluation of biological activities of betulinic acids and amyryn derivatives potential interference with glucocorticoid receptor signaling. 68 th National Conference of Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology, 10-12 November 2017, Athens, Greece.
- Kalousi, F., **Karra, A.G.**, Psarra A.M.G. Evaluation of biological activities of Chios mastiha gum extract: potential interference with glucocorticoid receptor signaling. 68th National Conference of Hellenic Society of Biochemistry and molecular biology, 10-12 November 2017, Athens, Greece.
- **Karra, A.G.**, Konstantinou, M., Georgatza, D., Gorgogietas, V., Papadopoulou, K., Psarra, A.M.G. Protopanaxadiol and Protopanaxatriol as potent selective glucocorticoid receptor activators. 38o Scientific Conference EEBE, 26-28 May, 2016, Kavala, Greece.