



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΤΟΥ
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ
ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΜΥΪΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR
LOCALIZATION IN SKELETAL MUSCLE TISSUE

Όνοματεπώνυμο: Μαγγανή Σύλβια

Πατρώνυμο: Μαγγανής Ιωάννης

ΛΑΡΙΣΑ 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΨΑΡΡΑ ANNA-MΑΡΙΑ: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΨΑΡΡΑ ANNA-MΑΡΙΑ: Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπεύθυνη καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας, τη συνεχή καθοδήγησή της, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο και την Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στην Δρ. Χριστίνα Καρατζαφέρη και Δρ. Γιώργο Σακκά, καθηγητές του Παν/μίου Θεσσαλίας, Τμήμα Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και υποστήριξή τους κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της χρώσης των διαφόρων τύπων σκελετικών μυών.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την άψογη συνεργασία που είχαμε εντός του εργαστηρίου, την υπομονή του, καθώς και τη βοήθειά του σε οτιδήποτε χρειάστηκε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, ένα ευχαριστώ αξίζει στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσφέρουν σε κάθε μου προσπάθεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs).....	9
1.1.1. Γενικά	9
1.1.2. Δομή πυρηνικών υποδοχέων.....	9
1.1.3. Μηχανισμός δράσης – Τύποι πυρηνικών υποδοχέων.....	11
1.2. Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor-GR).....	13
1.2.1. Γενικά	13
1.2.2. Τα γλυκοκορτικοειδή	13
1.2.3. Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και ισομορφές.....	15
1.2.4. Λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	18
1.2.5. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζουν τη λειτουργία του.....	19
1.2.6. Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	21
1.2.6.1. Γενωμική δράση - Άμεση και έμμεση.....	21
1.2.6.2. Μη-γενωμική δράση.....	24
1.2.7. Δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια.....	27
1.2.8. Βιολογικές δράσεις που ελέγχονται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	29
1.3. Σκελετικοί μύες.....	30
1.3.1. Δομή των σκελετικών μυών.....	30
1.3.2. Τύποι σκελετικών μυϊκών ινών.....	31
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	33
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
3.1. Οργανολογία.....	34
3.2. Υλικά.....	34
3.2.1. Χημικά.....	34
3.2.2. Αντισώματα.....	35
3.2.3. Διαλύματα.....	35

3.2.4. Αναλώσιμα.....	37
3.3. Τεχνικές.....	37
3.3.1. Κοπή διαδοχικών τομών σκελετικού μυϊκού ιστού σε κρουστόμο.....	37
3.3.2. Ιστοχημική ανάλυση του τύπου των μυϊκών ινών σκελετικού μυϊκού ιστού....	37
3.3.3. Μονιμοποίηση τομών σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού.....	39
3.3.4. Μπλοκάρισμα μη-ειδικών θέσεων σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού.....	39
3.3.5. Μονιμοποίηση τομών σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου.....	40
3.3.6. Μπλοκάρισμα μη-ειδικών θέσεων σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου.....	40
3.3.7. Ανοσοϊστοχημεία στις τομές σκελετικού μυϊκού ιστού του ποντικού και του χοίρου.....	40
3.3.8. Ανοσοϊστοχημεία – Δείγματα ελέγχου.....	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	44
4.1. Διάκριση των τύπων μυϊκών ινών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού.....	44
4.2. Διάκριση των τύπων μυϊκών ινών σε διαδοχικές τομές πάχους 6μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου.....	45
4.3. Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού.....	45
4.4. Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου.....	47
4.5. Εντόπιση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού.....	49
4.6. Εντόπιση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου.....	50
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών και συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός, η ομοιόσταση, η κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη, ενώ ακόμη επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα, την καρδιαγγειακή λειτουργία, τις γνωστικές λειτουργίες και την αναπαραγωγή. Το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές που εντοπίζεται στον οργανισμό είναι η κορτιζόλη. Όλες αυτές οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) που αποτελεί εξαρτώμενο από προσδέτη μεταγραφικό παράγοντα και ανήκει στην υπερ-οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Ο GR είναι ένας κυτταροπλασματικός υποδοχέας ο οποίος μόλις ενεργοποιηθεί, μετατοπίζεται στον πυρήνα και προκαλεί ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του. Μελέτες γύρω από τον GR και τις δράσεις του έδειξαν την μετατόπιση του υποδοχέα και στα μιτοχόνδρια υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων γονιδίων. Οι μεταβολικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των θηλαστικών κάτω από στρεσογόνες καταστάσεις. Στους σκελετικούς μυς, η κορτιζόλη συμμετέχει στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης, συμβάλλοντας έτσι στην ομοιόσταση του οργανισμού. Οι σκελετικοί μύες αποτελούνται από εκατοντάδες μυϊκές ίνες, οι οποίες ταξινομούνται σε μυϊκές ίνες τύπου I, IIA και IIX. Η ετερογένεια που παρουσιάζουν ως προς τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά επιτρέπει στους μυς μια μεγάλη ποικιλία κινήσεων.

Δεδομένου του σημαντικού ρόλου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση του μεταβολισμού στους σκελετικούς μυς, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να διερευνηθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός του GR σε μυϊκές ίνες σκελετικού μυός ποντικού και χοίρου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του τύπου των σκελετικών μυϊκών ινών, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει κάποιο διαφορετικό πρότυπο κατανομής του υποδοχέα GR στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών και των δύο ειδών. Ακόμη, γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι ο GR μετατοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, σκοπός μας ήταν να οπτικοποιήσουμε τα οργανίδια αυτά σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού και των δύο ειδών, ώστε να ελέγξουμε την πιθανή παρουσία του GR και στα οργανίδια αυτά.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν την παρουσία του GR στο κυτταρόπλασμα των μυϊκών ινών τόσο του ποντικού όσο και του χοίρου, αλλά και τον συνεντοπισμό του GR στον

πυρήνα των μυϊκών ινών. Επιπλέον, φαίνεται πως ο GR δεν εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των αντίστοιχων μυϊκών ινών στους σκελετικούς μυς και των δύο ειδών στη συγκεκριμένη συνθήκη που ελέγξαμε. Τέλος, ο διαχωρισμός των μυϊκών ινών των σκελετικών μυών επιβεβαιώνει την ετερογένεια αυτών και στα δύο είδη, ενώ παράλληλα δεν φαίνεται να παρατηρούμε κάποιο διαφορετικό πρότυπο κατανομής του υποδοχέα GR στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών, στη συνθήκη όπου αυτές εξετάστηκαν.

Abstract

Glucocorticoids are members of the class of steroid hormones and are involved in several processes such as metabolism, homeostasis, cell growth, differentiation and development, and also regulate the immune system, cardiovascular function, cognitive functions and reproduction. Cortisol is the best-known glucocorticoid found in the human body. All these actions of glucocorticoids are mediated by the glucocorticoid receptor (GR), which is a ligand-dependent transcription factor and a member of the nuclear receptor superfamily. In its inactive form, GR is a cytoplasmic receptor but once its activated, translocates to the nucleus and leads to activation or repression of transcription of its target genes. Studies on GR and its actions have revealed the translocation of the receptor also to mitochondria under certain conditions, where it regulates the transcription of mitochondrial-encoded genes. The metabolic actions of glucocorticoids play an essential role in mammalian survival under stressful conditions. In skeletal muscles, cortisol is involved in maintaining normal glucose levels, thus contributing to the homeostasis of the body. Skeletal muscles consist of hundreds of muscle fibres, which are classified as type I, IIA and IIX muscle fibres. The heterogeneity of their metabolic characteristics allows muscles to perform a wide variety of movements.

Given the important role of the glucocorticoid receptor in the regulation of metabolism in skeletal muscles, the aim of this thesis was to investigate the subcellular localization of GR in mouse and porcine skeletal muscle fibers. Additionally, a distinction of skeletal muscle fibre type was performed, in order to determine whether there is a different distributional pattern of GR receptor in the different muscle fibre types of both species. Furthermore, while knowing

from current studies that GR also translocates to mitochondria, our aim was to visualize these organelles in skeletal muscle tissue sections of both species in order to investigate the possible presence of GR in these organelles.

Our results indicate the presence of GR in the cytoplasm of both mouse and porcine muscle fibers, as well as the co-localization of GR in the muscle fibers nucleus. Furthermore, it appears that GR does not localize in the mitochondria of the corresponding muscle fibers in skeletal muscles of both species, under the experimental condition tested. Finally, the distinction of different types of skeletal muscle fibers confirms their heterogeneity in both species, while no differential pattern of GR localization was observed in the different types of muscle fibers.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs)

1.1.1 Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Kininis *et al.* 2008). Ειδικότερα, πρόκειται για προσδετο-επαγόμενους υποδοχείς, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ως απόκριση στη δέσμευση στεροειδών ορμονών και άλλων λιποδιαλυτών μορίων, και έτσι εμπλέκονται στον έλεγχο πολλών βιολογικών διαδικασιών, όπως: η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η ομοιόσταση και η αναπαραγωγή (Sever *et al.* 2013). Στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων ανήκει και ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Nicolaidis *et al.* 2020).

1.1.2 Δομή πυρηνικών υποδοχέων

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούνται από κοινές λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 1). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη δομή τους, αυτή περιλαμβάνει μία μεταβλητή αμινοτελική επικράτεια (N-terminal domain, NTD), μία επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD), μία περιοχή άρθρωσης (hinge region), μία επικράτεια δέσμευσης του προσδέτη (ligand-binding domain, LBD) και μία μεταβλητή καρβοξυ-τελική επικράτεια (C-terminal domain). Οι περιοχές DBD και LBD παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό συντήρησης μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων (Porter *et al.* 2019).

Η αμινο-τελική επικράτεια ή αλλιώς A/B περιοχή περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης AF-1 (Activation Function-1), που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλιώσεις, σουμοϋλιώσεις και ακετυλιώσεις, που φαίνεται να επηρεάζουν τη δραστικότητα της AF-1 περιοχής, επάγοντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (Weikum *et al.* 2018).

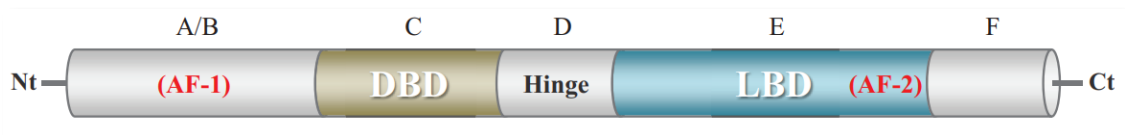
Η δέσμευση των πυρηνικών υποδοχέων στο DNA πραγματοποιείται μέσω της υψηλά συντηρημένης επικράτειας πρόσδεσης στο DNA (περιοχή C), η οποία περιλαμβάνει δύο

μοτίβα δακτύλου ψευδαργύρου (Zinc-fingers). Το πρώτο μοτίβο (P-box) είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών στο DNA, ενώ το δεύτερο (D-box) συμμετέχει στο διμερισμό των υποδοχέων (Weikum *et al.* 2018).

Η περιοχή άρθρωσης, ή αλλιώς περιοχή D, είναι η λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων και βρίσκεται μεταξύ των περιοχών DBD και LBD, λειτουργώντας ως μια μικρή, ευέλικτη άρθρωση μεταξύ τους (Pawlak *et al.* 2012). Αποτελεί, όπως και η αμινοτελική περιοχή, θέση ρυθμιστικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και επιπλέον περιλαμβάνει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), που αποτελεί μια πεπτιδική αλληλουχία υπεύθυνη για τη μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Weikum *et al.* 2018) (Lu *et al.* 2021).

Η επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη ή περιοχή E είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του συγγενούς προσδέτη, συμμετέχει στο διμερισμό του υποδοχέα και επιπλέον περιέχει μια προσδετο-εξαρτώμενη περιοχή ενεργοποίησης AF-2 (Activation Function-2). Η περιοχή αυτή απαιτείται για τη στρατολόγηση μεταγραφικών συν-ρυθμιστών, που συμμετέχουν στην επαγωγή ή στην καταστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων (Yang *et al.* 2014).

Μερικοί υποδοχείς διαθέτουν στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο μια επιπλέον περιοχή, την F, η οποία διαφοροποιείται ανάμεσα στους υποδοχείς και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά, ούτε κάποια γνωστή λειτουργία. Είναι πιθανό ότι μπορεί να συμμετέχει στη στρατολόγηση των συν-ρυθμιστών στην περιοχή LBD (Sever *et al.* 2013).



Εικόνα 1: Δομή και λειτουργικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων (Grimaldi *et al.* 2015).

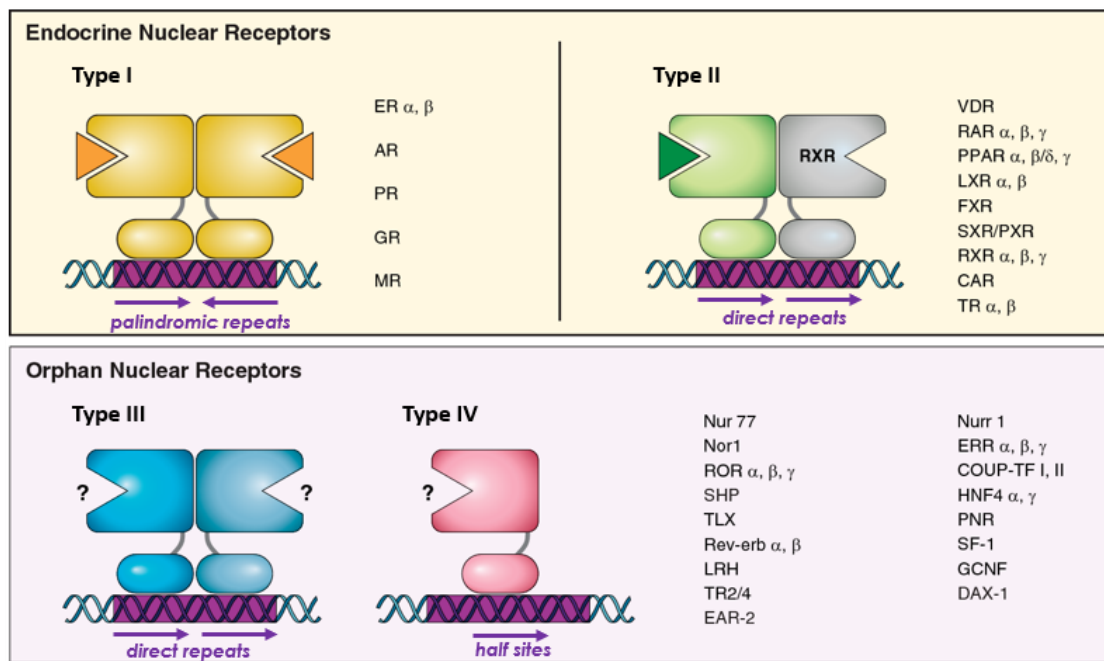
1.1.3 Μηχανισμός δράσης – Τύποι πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να εντοπίζονται ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και αναγνωρίζουν εξειδικευμένες αλληλουχίες στο DNA των γονιδίων-στόχων, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης ορμονών (Hormone Response Elements, HREs). Τα HREs αποτελούνται από δύο συντηρημένες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, οι οποίες μπορεί να είναι παλίνδρομες ή ευθείες (palindromic or direct repeats), δηλαδή να έχουν αντίστροφο ή ίδιο προσανατολισμό. Μεταξύ αυτών των επαναλήψεων παρεμβάλλεται μία ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα HREs μπορεί να περιλαμβάνουν μόνο τη μία από τις δύο επαναληπτικές αλληλουχίες, οπότε αναφέρονται ως half-sites (Sever *et al.* 2013). Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους, οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τέσσερις τύπους (Εικόνα 2):

- **Τύπος I:** περιλαμβάνει υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αγκυροβολημένοι με πρωτεΐνες-συνοδούς (π.χ. πρωτεΐνες θερμικού σοκ) (Sever *et al.* 2013). Η σύνδεση του προσδέτη προκαλεί την απελευθέρωση του υποδοχέα από τις πρωτεΐνες-συνοδούς, και επιτρέπει τη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη συνδέεται με ακόμη ένα σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη, σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και αλληλεπιδρά με συν-ενεργοποιητές, επιτρέποντας έτσι την μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Η δράση του συμπλόκου επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσής του σε παλίνδρομες αλληλουχίες των στοιχείων HREs (Weikum *et al.* 2018). Οι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου I περιλαμβάνουν τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστερόνης (Sever *et al.* 2013).
- **Τύπος II:** περιλαμβάνει υποδοχείς οι οποίοι βρίσκονται στον πυρήνα και μπορούν να συνδέονται στα στοιχεία HREs, ακόμα και απουσία του προσδέτη. Γενικά σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοϊδούς X (RXR) και απουσία του προσδέτη καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με συμπλέγματα NCoR και SMRT, τα οποία σχετίζονται με απακετυλάσες των ιστονών (Watson *et al.* 2012). Η σύνδεση του προσδέτη οδηγεί στην αντικατάσταση των καταστολέων από ενεργοποιητές, οι οποίοι περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών),

επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Οι υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών, του ρετινοϊκού οξέος και της βιταμίνης D ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία (Sever *et al.* 2013).

- **Τύπος III:** οι υποδοχείς αυτοί είναι παρόμοιοι με τους υποδοχείς τύπου I, καθώς συνδέονται στο DNA ως ομοδιμερή. Η διαφορά ωστόσο έγκειται στην οργάνωση των στοιχείων HREs, αφού οι υποδοχείς τύπου III δεσμεύονται σε ευθείες επαναλήψεις (direct repeats) αντί για παλίνδρομες, όπως στην περίπτωση των υποδοχέων τύπου I. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ορφανοί υποδοχείς, για τους οποίους δεν έχουν βρεθεί ακόμη οι ενδογενείς προσδέτες τους (Sever *et al.* 2013).
- **Τύπος IV:** περιλαμβάνει υποδοχείς που συνδέονται ως μονομερή στο DNA και αναγνωρίζουν half sites των στοιχείων HREs. Ενδεικτικά, ο υποδοχέας ήπατος LRH-1 και ο στεροειδικός παράγοντας SF-1 ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, και μάλιστα πρόκειται και σε αυτήν την περίπτωση για ορφανούς υποδοχείς (Sever *et al.* 2013).



Εικόνα 2: Τύποι πυρηνικών υποδοχέων και ο μηχανισμός δράσης τους. Αναφέρονται οι κυριότεροι υποδοχείς κάθε κατηγορίας. Τροποποιημένη εικόνα από (Imai *et al.* 2013).

1.2 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

1.2.1 Γενικά

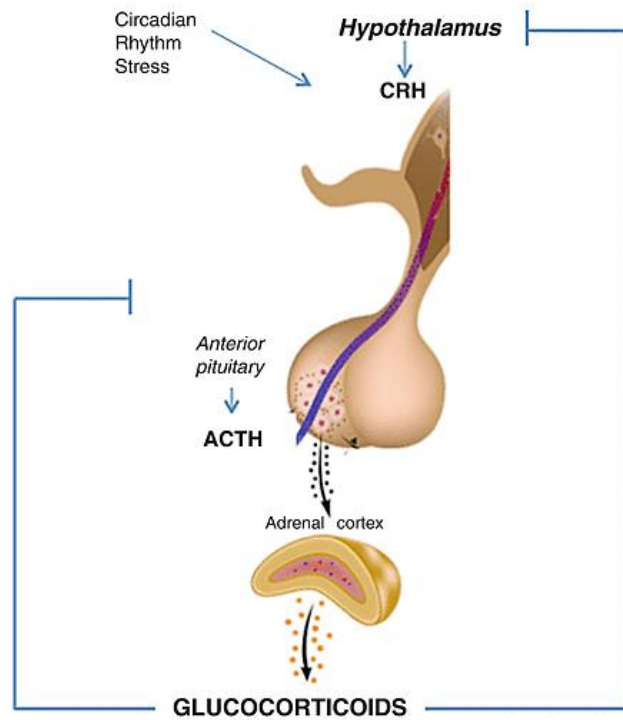
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) είναι μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη της υπερ-οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, που μεσολαβεί στις ποικίλες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας που εξαρτάται από τον προσδέτη. Μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών, όπου εκεί ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους (Nicolaidis *et al.* 2020).

1.2.2 Τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Η ρύθμιση της έκκρισής τους γίνεται μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων και ακολουθεί κινκάρδιους ρυθμούς, με τη μέγιστη έκκρισή τους στον άνθρωπο να παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες. Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα, καθώς και στρεσογόνες καταστάσεις, διεγείρουν τον υποθάλαμο, ο οποίος απελευθερώνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Η CRH με την σειρά της διεγείρει τη σύνθεση και έκκριση της αδρενοκορτικοτροπίνης (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Τέλος, η ACTH διεγείρει την παραγωγή και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων. Τα γλυκοκορτικοειδή με τη σειρά τους αναστέλλουν την έκκριση τόσο της CRH όσο και της ACTH, ασκώντας αρνητική ανατροφοδότηση στον υποθάλαμο και την υπόφυση αντίστοιχα (Εικόνα 3). Με αυτόν τον τρόπο, τα ίδια τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν την έκκρισή τους (Oakley *et al.* 2013).

Το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές που εντοπίζεται στον οργανισμό είναι η κορτιζόλη. Τα γλυκοκορτικοειδή συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός, η ομοιοστάση νερού και ηλεκτρολυτών, η κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη. Επιπλέον, επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα, την καρδιαγγειακή λειτουργία, τη διάθεση και τις γνωστικές λειτουργίες, αλλά και στην αναπαραγωγή. Πέρα από τα επινεφρίδια, έχει επίσης παρατηρηθεί έκκριση γλυκοκορτικοειδών από το θύμο αδένα, τα αγγεία και τον εγκέφαλο. Ωστόσο, τα παραγόμενα αυτά γλυκοκορτικοειδή ασκούν κατά κύριο

λόγο τοπικές επιδράσεις και δεν εισέρχονται σχεδόν καθόλου στην κυκλοφορία του αίματος, και επιπλέον δεν υπόκεινται σε κινκάρδια ρύθμιση (Timmermans *et al.* 2019).



Εικόνα 3: Η ρύθμιση της έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών, μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, σε απόκριση σε εσωτερικά σήματα και στρεσογόνες καταστάσεις (Sradaro *et al.* 2017).

Τα γλυκοκορτικοειδή, ως στεροειδείς ορμόνες, είναι λιπόφιλα μόρια, γι' αυτό μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του πλάσματος. Το μεγαλύτερο ποσοστό (90%) των γλυκοκορτικοειδών συνδέεται στην τρανσκορτίνη, ενώ μικρό ποσοστό (περίπου 10%) συνδέεται με χαμηλότερη συγγένεια στην αλβουμίνη (Timmermans *et al.* 2019). Έτσι, φτάνουν στα κύτταρα-στόχους και, λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση. Αφού εισέλθουν στα κύτταρα, συνδέονται με υψηλή συγγένεια στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους (Hammond 2016).

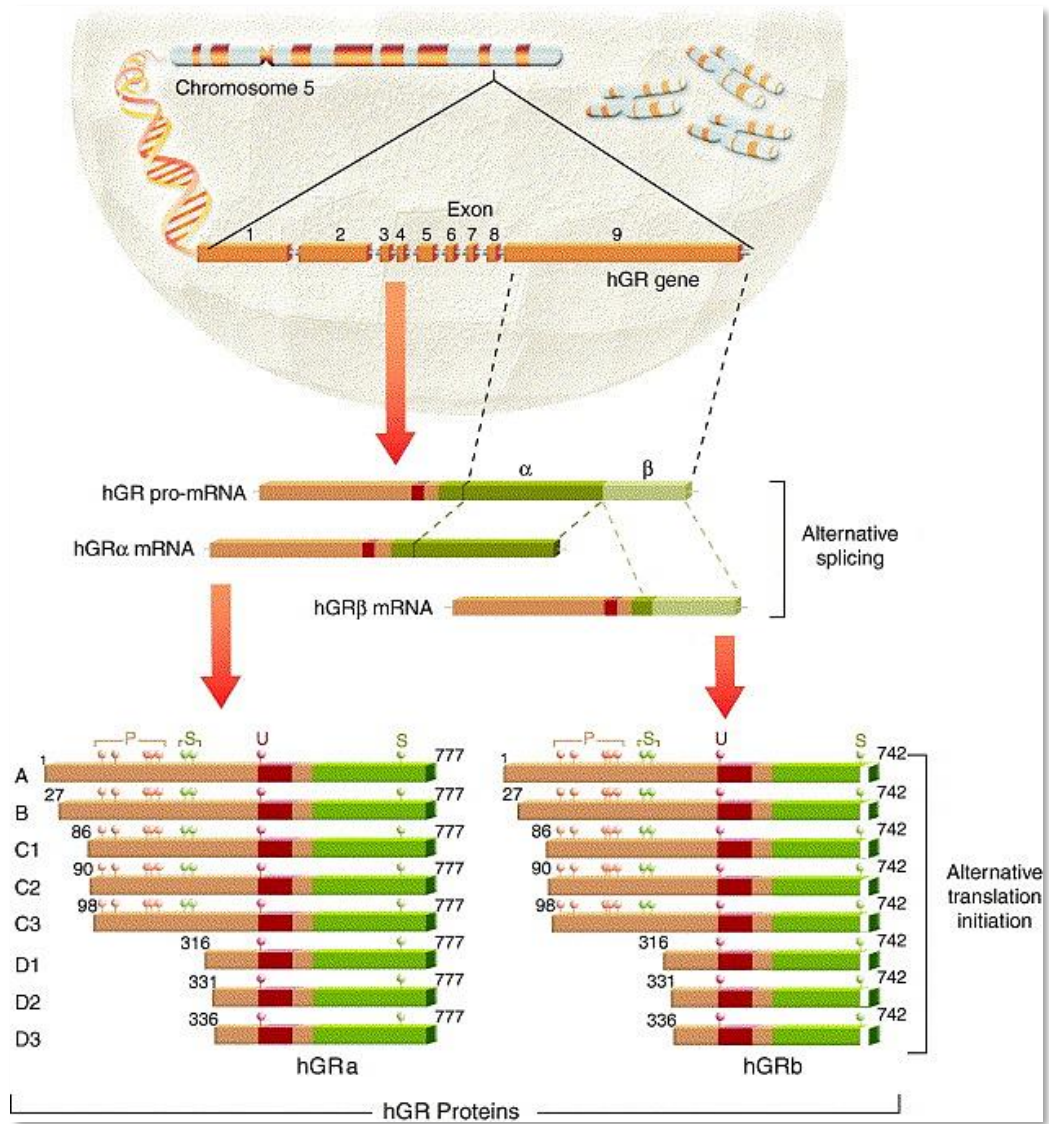
1.2.3 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και ισομορφές

Το cDNA του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ή GR όπως θα αναφέρεται στο εξής, απομονώθηκε μέσω κλωνοποίησης το 1985 (Hollenberg *et al.* 1985). Το γονίδιο *NR3C1* (Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1), που κωδικοποιεί για τον ανθρώπινο GR, αποτελείται από 9 εξόνια και εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q31.3). Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί για την 5' αμετάφραστη περιοχή του (5' UTR), ενώ τα εξόνια 2-9 κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη GR. Το εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου στο εξόνιο 9 έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν δύο ομόλογες ισομορφές του υποδοχέα, GRα και GRβ, με μοριακά βάρη 99 και 94 kD αντίστοιχα. Και οι δύο ισομορφές διαθέτουν 727 κοινά αμινοξέα. Η GRα ισομορφή αποτελείται συνολικά από 777 αμινοξέα, με τα τελευταία 50 να κωδικοποιούνται από το εξόνιο 9α, ενώ η ισομορφή GRβ αποτελείται από 742 αμινοξέα, με τα τελευταία 15 να κωδικοποιούνται από το εξόνιο 9β (Timmermans *et al.* 2019).

Ο hGRα αποτελεί την κυρίαρχη ισομορφή στον άνθρωπο. Βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και, έπειτα από τη σύνδεση ενδογενών και συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Αντίθετα, η ισομορφή hGRβ, που εκφράζεται σε μικρότερα ποσοστά στον οργανισμό, εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα (Oakley *et al.* 2013). Επίσης, δεν φαίνεται να δεσμεύει ενδογενή γλυκοκορτικοειδή, καθώς η επικράτεια LBD είναι μικρότερη σε μήκος από αυτή της ισομορφής hGRα, και έτσι είναι μεταγραφικά ανενεργή. Παρόλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι η ισομορφή hGRβ μπορεί να συνδέεται με ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές (RU-486), το οποίο αποτελεί ανταγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Nicolaidis *et al.* 2010). Επιπλέον, ο hGRβ ασκεί ισχυρή αρνητική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή, καθώς συνδέεται με τον hGRα και σχηματίζει ετεροδιμερή, παρεμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό μεταγραφικά ενεργών ομοδιμερών hGRα (Oakley *et al.* 2013).

Το hGRα mRNA μεταφράζεται σε πολλαπλές πρωτεϊνικές ισομορφές, χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 8 διαφορετικές αμινοτελικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης. Όλες αυτές οι ισομορφές του hGRα είναι λειτουργικοί υποδοχείς, καθώς διαθέτουν ολόκληρη την επικράτεια LBD. Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν διαφορές στην κατανομή τους στους ιστούς, καθώς και στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, μετά την ενεργοποίησή τους από την πρόσδεση

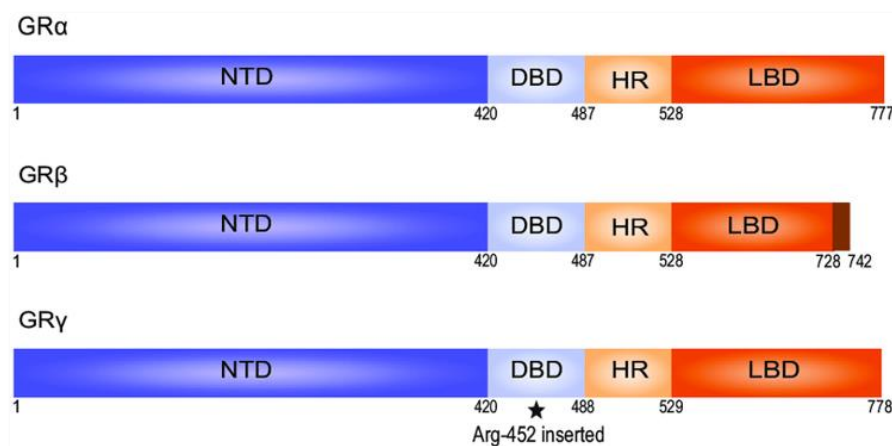
των γλυκοκορτικοειδών (Psarra *et al.* 2008). Εφόσον έχουν την ίδια αμινο-τελική περιοχή, το hGRβ mRNA μπορεί επίσης να μεταφραστεί μέσω των ίδιων θέσεων έναρξης, δίνοντας έτσι ένα πλήθος ισομορφών hGRβ (Kadmiel *et al.* 2013).



Εικόνα 4: Ο γενετικός τόπος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Το εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου οδηγεί σε δύο ομόλογες ισομορφές, GRα και GRβ, και οι διαφορετικές αμινο-τελικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης οδηγούν σε πολλαπλές πρωτεϊνικές ισομορφές των GRα και GRβ (Lu *et al.* 2006).

Μία τρίτη ισομορφή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών είναι η GRγ, η οποία στα θηλαστικά προέρχεται από εναλλακτική 5'-θέση ματίσματος του ιντρονίου που βρίσκεται μεταξύ των εξονίων 3 και 4. Το αποτέλεσμα είναι να προκύπτει μία πρωτεΐνη 778 αμινοξέων,

με την ένθεση ενός επιπλέον αμινοξέος (Arg452) μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου στην επικράτεια DBD. Η ισομορφή GR γ αποτελεί το 10% των συνολικών μεταγράφων του GR και επιπλέον έχει διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των θηλαστικών, γεγονός που υποδεικνύει έναν σημαντικό ρόλο αυτής της ισομορφής. Μελέτες υποστηρίζουν ότι σχετίζεται άμεσα με τη μιτοχονδριακή λειτουργία, καθώς αυξημένα επίπεδά της σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή ATP (Morgan *et al.* 2016).



Εικόνα 5: Δομή των τριών ισομορφών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, GR α , GR β και GR γ , όπου παρουσιάζονται και οι λειτουργικές τους επικράτειες (Zielińska *et al.* 2016).

Στον ποντικό, το γονίδιο *NR3C1* που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα GR εδράζεται στο χρωμόσωμα 18 και μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα. Η GR α αποτελεί τη μεταγραφικά ενεργή ισομορφή και αποτελείται από 792 αμινοξέα, ενώ η GR β προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου εντός του ιντρονίου 8, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια πρωτεΐνη 748 αμινοξέων. Η GR γ ισομορφή προκύπτει, όπως και στον άνθρωπο, με την προσθήκη ενός καταλοίπου αργινίνης στο τέλος του εξονίου 3, επομένως αποτελείται από 793 αμινοξέα. Τέλος, μία διαφορετική αμινο-τελική θέση έναρξης της μετάφρασης οδηγεί σε μία επιπλέον πρωτεϊνική ισομορφή (GR-B) (Čikoš *et al.* 2019).

Στο χοίρο, το γονίδιο *NR3C1* που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα GR εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 και το εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου οδηγεί σε τέσσερις διαφορετικές ισομορφές. Η GR α , η ουσιαστικά ενεργή ισομορφή, κωδικοποιείται από τα εξόνια 2-9 και αποτελείται από 782 αμινοξέα. Η GR β προκύπτει από εναλλακτική επεξεργασία του

μεταγράφου εντός του ιντρονίου 8 και απαλοιφή του εξονίου 9, με αποτέλεσμα να προκύπτει μία πρωτεΐνη 761 αμινοξέων. Η GRγ, με τον ίδιο τρόπο όπως στον άνθρωπο και τον ποντικό, προκύπτει με την προσθήκη ενός καταλοίπου αργινίνης στο τέλος του εξονίου 3, συνεπώς αποτελείται από 783 αμινοξέα. Η τέταρτη ισομορφή, GR-P, προκύπτει από την απαλοιφή των δύο τελευταίων εξονίων (8 και 9), οδηγώντας σε μια πρωτεΐνη 681 αμινοξέων (Reyer *et al.* 2013).

1.2.4 Λειτουργικές περιοχές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Η δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι αυτή ενός τυπικού πυρηνικού υποδοχέα. Αποτελείται δηλαδή από την αμινο-τελική περιοχή, την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA, την περιοχή άρθρωσης και την επικράτεια δέσμευσης του προσδέτη. Ωστόσο, δεν περιλαμβάνεται περιοχή F στην καρβοξυ-τελική του περιοχή (Nicolaidis *et al.* 2020).

Η αμινο-τελική επικράτεια του hGRα κωδικοποιείται από το εξόνιο 2 του γονιδίου *NR3C1* (Timmermans *et al.* 2019). Περιέχει την περιοχή trans-ενεργοποίησης AF-1 (Activation Function-1), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με μόρια που είναι απαραίτητα για την έναρξη της μεταγραφής, όπως συν-ενεργοποιητές, ρυθμιστές χρωματίνης και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της RNA πολυμεράσης II, της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο πλαίσιο TATA του υποκινητή (TATA-Binding Protein, TBP) και του συμπλόκου του μεταγραφικού παράγοντα TFIID (Nicolaidis *et al.* 2020).

Η επικράτεια δέσμευσης στο DNA κωδικοποιείται από τα εξόνια 3 και 4 του γονιδίου *NR3C1*. Περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, μέσω των οποίων ο υποδοχέας συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs), τα οποία βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων-στόχων τους. Μερικά αμινοξέα εντός του πρώτου δακτύλου ψευδαργύρου σχηματίζουν το (P)-box, που είναι υπεύθυνο για την ειδική αναγνώριση των GREs. Ένα άλλο σύνολο αμινοξέων εντός του δεύτερου δακτύλου ψευδαργύρου σχηματίζει το (D)-box, το οποίο συμμετέχει στο διμερισμό των υποδοχέων. Τέλος, η επικράτεια αυτή περιέχει την αλληλουχία NLS1 για την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα (Timmermans *et al.* 2019).

Η περιοχή άρθρωσης είναι μια εύκαμπτη περιοχή μεταξύ των περιοχών δέσμευσης DNA και προσδέτη, και φαίνεται να προσδίδει μία δομική ευελιξία στα μόρια του υποδοχέα, επιτρέποντας έτσι σε ένα διμερές του υποδοχέα να αλληλεπιδρά με πολλαπλά στοιχεία GREs (Nicolaidis *et al.* 2010).

Η επικράτεια δέσμευσης του προσδέτη συνδέεται με τα γλυκοκορτικοειδή και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην επαγόμενη από τον προσδέτη ενεργοποίηση του hGRα. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει μία θέση σύνδεσης του προσδέτη, η οποία αποτελείται από 12 α-έλικες και 4 β-πτυχωτά φύλλα (Timmermans *et al.* 2019). Επιπλέον, περιέχει μια δευτέρα περιοχή trans-ενεργοποίησης, που ονομάζεται AF-2 (Activation Function-2). Ακόμη, περιέχει την αλληλουχία NLS2 για την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα, καθώς και αλληλουχίες σημαντικές για το διμερισμό του υποδοχέα, τη δέσμευση με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ στο κυτταρόπλασμα και την αλληλεπίδραση με συν-ρυθμιστές (Beck *et al.* 2011).

1.2.5 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζουν τη λειτουργία του

Κάθε ισομορφή GR υπόκειται σε μια ποικιλία μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, που ρυθμίζουν περαιτέρω τη λειτουργία του (Εικόνα 6). Η πιο εκτενώς μελετημένη ομοιοπολική τροποποίηση του GR είναι η φωσφορυλίωση (Kumar *et al.* 2008). Ο hGRα φωσφορυλιώνεται σε τουλάχιστον 7 κατάλοιπα σερίνης (Ser113, Ser134, Ser141, Ser203, Ser211, Ser226 και Ser404), τα οποία βρίσκονται όλα στην αμινο-τελική επικράτεια του υποδοχέα. Οι κύριες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον hGRα περιλαμβάνουν τις MAPKs, ERKs, JNKs, κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (CDKs), την κινάση της καζεΐνης II και την GSK-3β. Πολλά από τα παραπάνω κατάλοιπα σερίνης εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης, ενώ υπερφωσφορυλιώνονται μετά τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών στον υποδοχέα. Η δομή του δεσμευμένου γλυκοκορτικοειδούς μπορεί να επηρεάσει τόσο το πρότυπο, όσο και την έκταση της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα (Oakley *et al.* 2013).

Η φωσφορυλίωση του hGRα έχει ως αποτέλεσμα τη ρύθμιση της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Πρώιμες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάγματα του υποδοχέα με έλλειψη φωσφορυλίωσης παρουσίαζαν μειωμένη ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης ορισμένων

γονιδίων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Oakley *et al.* 2013). Πρόσθετες αναφορές έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser211 συσχετίστηκε με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα, ενώ η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser226 μείωσε την ικανότητα σηματοδότησής του. Η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser404 έχει επίσης σημαντικές συνέπειες στις αποκρίσεις των γλυκοκορτικοειδών, καθώς η ικανότητα του hGRα να ενεργοποιεί και να καταστέλλει τα γονίδια-στόχους του μειώνεται μετά από τη φωσφορυλίωση σε αυτή τη θέση (Vandevyver *et al.* 2014).

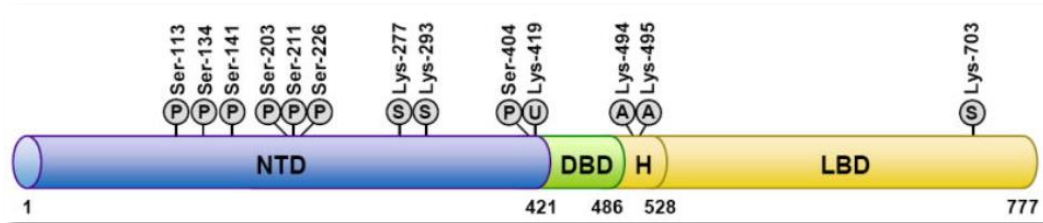
Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του GR επηρεάζει και με άλλους τρόπους τη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών. Η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης hGRα ενισχύεται μέσω - εξαρτώμενης από γλυκοκορτικοειδή - φωσφορυλίωσης του υποδοχέα (Gallagher-Beckley *et al.* 2009). Επίσης, η κυτταρική κατανομή του hGRα μεταβάλλεται έπειτα από τη φωσφορυλίωσή του στα κατάλοιπα Ser203, Ser226 ή Ser404, με αποτέλεσμα ο υποδοχέας να διατηρείται για λιγότερο χρόνο στον πυρήνα, είτε επειδή παραμένει στο κυτταρόπλασμα μετά τη φωσφορυλίωσή του, είτε λόγω μεταφοράς του από τον πυρήνα στον κυτταρόπλασμα. Κατά συνέπεια, η φωσφορυλίωση στα συγκεκριμένα κατάλοιπα οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα στα γονίδια-στόχους (Oakley *et al.* 2013).

Έχουν περιγραφεί πρόσθετες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GR που ρυθμίζουν τη λειτουργία του. Η ουβικουΐτινυλίωση του hGRα σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο λυσίνης (Lys419) έχει δειχθεί ότι οδηγεί στην αποικοδόμηση του υποδοχέα από το πρωτεάσωμα, μειώνοντας έτσι τη μεταγραφική του δραστηριότητα σε γονίδια απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Oakley *et al.* 2011).

Ο hGRα τροποποιείται επίσης μετα-μεταφραστικά με σουμοϋλίωση, μια διαδικασία στην οποία τα πεπτιδία SUMO συνδέονται ομοιοπολικά σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης (Lys277, Lys293, Lys703) της αμινο-τελικής επικράτειας και της επικράτειας δέσμευσης του προσδέτη. Η προσθήκη πεπτιδίων SUMO συμβαίνει απουσία προσδέτη, αλλά αυξάνεται μετά τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών. Ανάλογα με τη θέση της σουμοϋλίωσης, η μεταγραφική δραστηριότητα του hGRα μπορεί να ενισχυθεί ή να κατασταλεί (Druker *et al.* 2013).

Τέλος, ο hGRα ακετυλιώνεται σε κατάλοιπα λυσίνης που βρίσκονται εντός της περιοχής άρθρωσης (Lys480, Lys492, Lys494 και Lys495) από ακετυλοτρανσφεράσες όπως οι p300 και CBP, ως απόκριση στη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να

μειώνεται η ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιεί και να καταστέλλει γονίδια απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Kino *et al.* 2011).



Εικόνα 6: Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ανθρώπινου υποδοχέα GRα, όπου φαίνονται συγκεκριμένα κατάλοιπα που τροποποιούνται, καθώς και το είδος της ομοιοπολικής τροποποίησης (Whitcup *et al.* 2018).

1.2.6 Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή, ως λιπόφιλα μόρια, εισέρχονται στα κύτταρα-στόχους, όπου μπορούν να προσδεθούν στους κυτταροπλασματικούς υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, και συγκεκριμένα στον GRα που αποτελεί τη μεταγραφικά ενεργή ισομορφή. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται και αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα στοιχεία GREs, στα γονίδια-στόχους. Αυτή η περίπτωση αποτελεί τη γενωμική δράση του υποδοχέα. Εναλλακτικά, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μη-γενωμική σηματοδότηση (Scheschowitsch *et al.* 2017).

1.2.6.1 Γενωμική δράση - Άμεση και έμμεση

Οι αποκρίσεις αυτού του είδους χαρακτηρίζονται ως αργές, καθώς περιλαμβάνουν αλλαγές στην έκφραση γονιδίων-στόχων. Απουσία του προσδέτη, ο GR βρίσκεται αδρανισμένος στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, ως μέρος ενός ετερο-ολιγομερούς συμπλέγματος, που περιλαμβάνει διάφορες πρωτεΐνες-συνοδούς, όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP90 και HSP70, η p23, η κινάση Src και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506

(Oakley *et al.* 2013). Η HSP90 διατηρεί τον υποδοχέα σε μια διαμόρφωση που μπορεί να προσδέσει με υψηλή συγγένεια τα γλυκοκορτικοειδή. Επιπλέον, ευθύνεται για την παραμονή του GR στο κυτταρόπλασμα, καλύπτοντας τις δύο αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού. Μετά τη σύνδεση του προσδέτη, ακολουθεί αλλαγή της διαμόρφωσης του GR και η φωσφορυλίωσή του στο κατάλοιπο Ser211 από την κινάση p38 MAP. Τα γεγονότα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος και κατ' επέκταση την έκθεση των αλληλουχιών πυρηνικού εντοπισμού NLS1 και NLS2, καθώς και της επικράτειας διμερισμού του υποδοχέα (Mitre-Aguilar *et al.* 2015). Περαιτέρω στοιχεία έδειξαν ότι η αντικατάσταση της ανοσοφιλίνης FKBP51 από την FKBP52 έχει ως αποτέλεσμα η τελευταία να αλληλεπιδρά με τη δυνεΐνη, μεταφέροντας ολόκληρο το μονομερές σύμπλοκο του GR με τον προσδέτη κατά μήκος των μικροσωληνίσκων σε έναν πυρηνικό πόρο. Μόλις εισέλθει στον πυρήνα, το σύμπλοκο του GR με το προσδεμένο γλυκοκορτικοειδές μπορεί να στρατολογήσει ένα δεύτερο σύμπλοκο GR-γλυκοκορτικοειδούς, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα ομοδιμερές του υποδοχέα, που συνδέεται στα στοιχεία GREs (Scheschowitsch *et al.* 2017). Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι ο GR μπορεί να συνδεθεί στο DNA και ως τετραμερές, ωστόσο η σημασία αυτού του τετραμερούς στη μεταγραφική ρύθμιση δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί και χρήζει περαιτέρω μελέτης (Timmermans *et al.* 2019).

Στον πυρήνα, το ομοδιμερές του GR δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρώντας με τις αλληλουχίες GREs, ρυθμίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Nicolaidis *et al.* 2010). Μετά τη δέσμευση στα GREs, ακολουθούν αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα, που οδηγούν στη στρατολόγηση ρυθμιστικών πρωτεϊνών και παραγόντων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, ελέγχοντας έτσι τη μεταγραφή γονιδίων (Oakley *et al.* 2011).

Η πλειοψηφία των στοιχείων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή αποτελούνται από μία συντηρημένη παλίνδρομη αλληλουχία που αποτελείται από 15 ζεύγη βάσεων, 5'-AGAACA_nnnnTGTTCT- 3', όπου n οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Ο GR δεσμεύεται σε αυτή την αλληλουχία ως ομοδιμερές, με κάθε μισή θέση (6 ζεύγη βάσεων) να καταλαμβάνεται από ένα μονομερές του υποδοχέα. Η απόσταση των τριών νουκλεοτιδίων μεταξύ των δύο μισών θέσεων είναι απαραίτητη ώστε να διμεριστεί ο υποδοχέας. Τα GREs έχει δειχθεί ότι μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από τα γλυκοκορτικοειδή επαγωγή της μεταγραφής πολλών γονιδίων, γι' αυτό αναφέρονται ως θετικά GREs (Oakley *et al.* 2013). Τα γονίδια που

ενεργοποιούνται ανέρχονται περίπου στα 100 και φαίνεται ότι κωδικοποιούν μεταξύ άλλων για αντιφλεγμονώδη μόρια, καθώς και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό μεταβολισμό (Zen *et al.* 2011).

Έχουν περιγραφεί τρεις μηχανισμοί με τους οποίους ο GR μπορεί άμεσα να προάγει την έκφραση των γονιδίων-στόχων του (Εικόνα 7):

- Εάν το στοιχείο GRE βρίσκεται κοντά στο πλαίσιο TATA του υποκινητή, τότε ο GR μπορεί να στρατολογήσει μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο TAFIIID, και να προωθήσει τη γονιδιακή έκφραση (Zen *et al.* 2011).
- Εάν το στοιχείο GRE βρίσκεται μακριά από το πλαίσιο TATA του υποκινητή, τότε ο GR μπορεί να αλληλεπιδράσει με συν-ενεργοποιητές, που χρησιμεύουν για την στρατολόγηση σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων (Mitre-Aguilar *et al.* 2015).
- Ο GR μπορεί να στρατολογήσει σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης για να τροποποιήσει τη δομή των νουκλεοσωμάτων του DNA, επιτρέποντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση (Mitre-Aguilar *et al.* 2015).

Ωστόσο, πρόσφατες αναλύσεις έχουν δείξει ότι η δέσμευση των διμερών του GR σε στοιχεία GREs μπορεί επίσης να οδηγήσει στην άμεση καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του (Uhlenhaut *et al.* 2013). Τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή που μεσολαβούν στην καταστολή της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων αναφέρονται ως αρνητικά GREs (nGREs) (Zen *et al.* 2011). Η συντηρημένη αλληλουχία των nGREs, 5'-CTCC(n)₀₋₂GGAGA-3', είναι παλίνδρομη αλλά διαφέρει από την κλασική ως προς την αλληλουχία, και επιπλέον καταλαμβάνεται από δύο μονομερή του GR που δεν ομοδιμερίζονται (Hudson *et al.* 2013). Τα γονίδια των οποίων η έκφραση καταστέλλεται ανέρχονται περίπου στα 70, ενώ ορισμένα από αυτά φαίνεται να κωδικοποιούν για προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες (Zen *et al.* 2011).

Σε ορισμένα γονίδια, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δε δεσμεύεται άμεσα στο DNA, αλλά αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες που είναι προσδεσμεμένες στο DNA, ασκώντας κατ' αυτόν τον τρόπο έμμεσα τη γενωμική του δράση (Εικόνα 7). Τέτοιες πρωτεΐνες αποτελούν για παράδειγμα το σύμπλοκο της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης-1 (AP-1), ο παράγοντας NF-κB και οι πρωτεΐνες STAT. Έχει δειχθεί ότι το ομοδιμερές του GR σε σύμπλοκο με τα

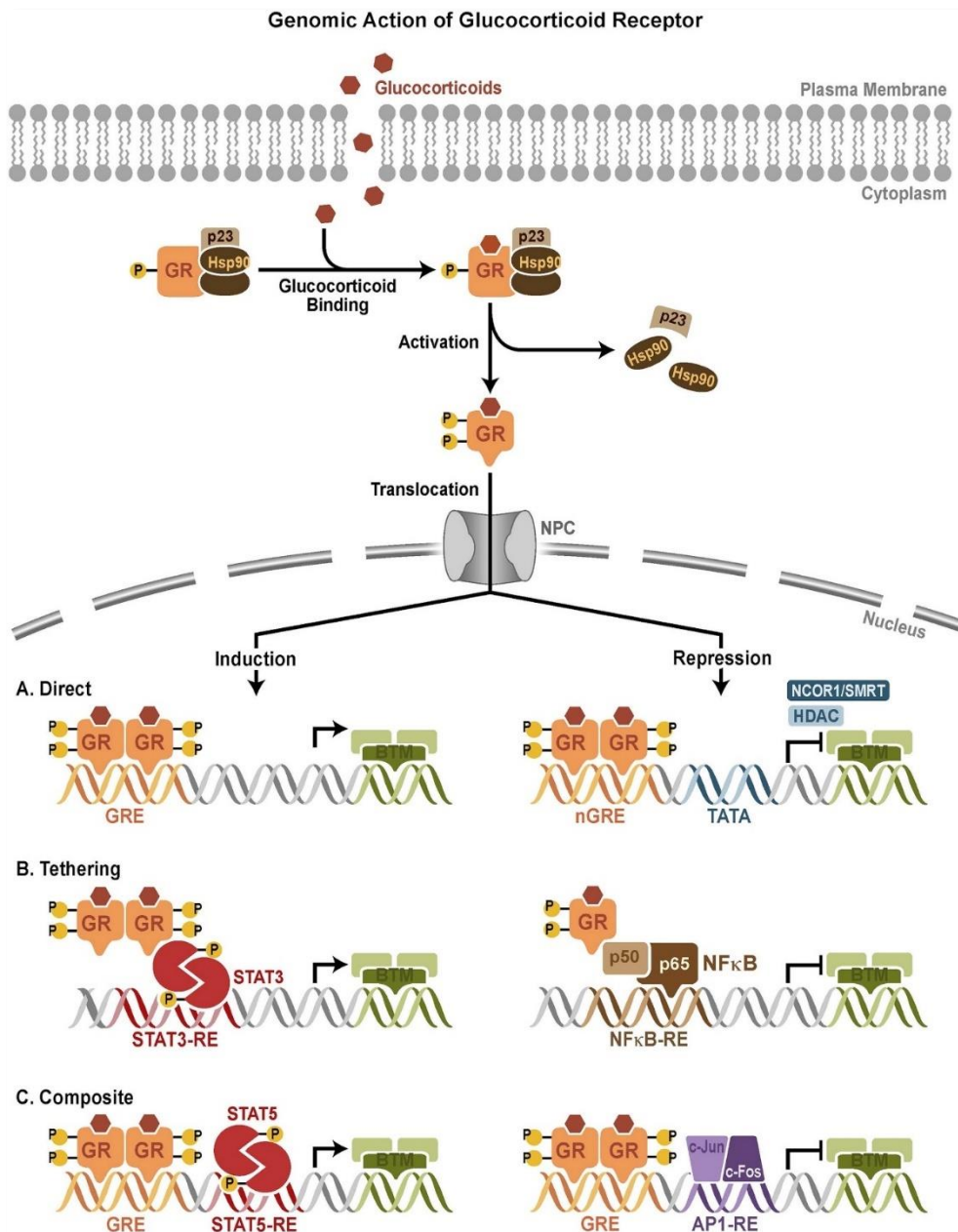
γλυκοκορτικοειδή μπορεί να αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες STAT3, που είναι προσδεμένοι σε στοιχεία STAT3-RE στο DNA. Επιπλέον, ο ενεργοποιημένος GR μπορεί να δεσμεύεται σε στοιχεία GREs και να αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες STAT5, που είναι συνδεδεμένοι σε γειτονικές περιοχές DNA (στα στοιχεία STAT5-RE). Και με τους δύο τρόπους, η αλληλεπίδρασή του με τις πρωτεΐνες STAT επιτρέπει την ενεργοποίηση της μεταγραφής μιας ποικιλίας γονιδίων (Ramamoorthy *et al.* 2015).

Αντίθετα, η αλληλεπίδραση του GR με τους προφλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες, AP-1 και NF-κB, καταστέλλει την έκφραση γονιδίων και θεωρείται ένας πρωταρχικός μηχανισμός με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν τη φλεγμονή. Ο AP-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες c-Jun και c-Fos, και επάγει τη γονιδιακή μεταγραφή. Ωστόσο, ο ενεργοποιημένος GR, συνδεόμενος σε γειτονικά στοιχεία GREs, δεσμεύει την υπομονάδα c-Jun, καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του. Με παρόμοιο τρόπο, ο GR μπορεί να αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p65 του NF-κB και να καταστέλλει και σε αυτή την περίπτωση τη μεταγραφή γονιδίων (Oakley *et al.* 2013).

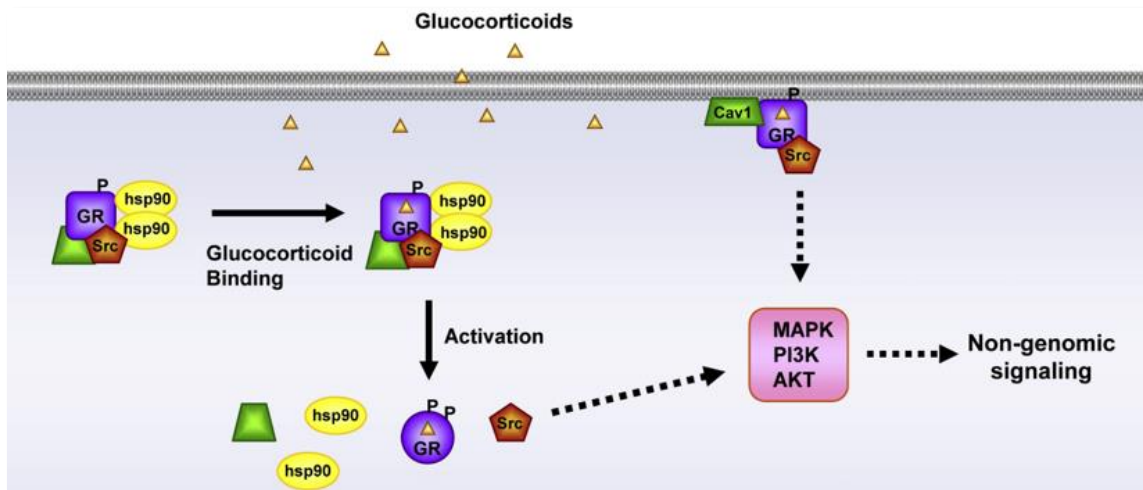
1.2.6.2 Μη-γενωμική δράση

Στην περίπτωση του μη-γενωμικού μηχανισμού δράσης του GR, οι αποκρίσεις που επιτυγχάνονται είναι γρήγορες, της τάξης των δευτερολέπτων έως και λεπτών, καθώς ενεργοποιούνται οδοί μεταγωγής σήματος, και δεν επηρεάζεται άμεσα η έκφραση γονιδίων (Oakley *et al.* 2013).

Πολλαπλοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτού του είδους τη σηματοδότηση, επιδρώντας στη δραστηριότητα διαφόρων κινασών, όπως η PI3K, η AKT και οι MAPKs. Επιπλέον, η κινάση τυροσίνης Src, που απελευθερώνεται από το κυτταροπλασματικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του GR μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, μπορεί να μεσολαβήσει στις μη-γενωμικές δράσεις του υποδοχέα. Η Src ενεργοποιεί έναν καταρράκτη κινασών, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση της αννεξίνης 1, στην αναστολή της δραστηριότητας της κυτταροπλασματικής φωσφολιπάσης A2 και στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος (Εικόνα 8) (Oakley *et al.* 2013).



Εικόνα 7: Γενωμική δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών – Άμεση και έμμεση. Ο GR μπορεί να επάγει αλλά και να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων-στόχων (Ramamoorthy et al. 2015).



Εικόνα 8: Η δράση του GR μέσω μη-γενωμικού μηχανισμού επάγει έναν καταρράκτη ενεργοποίησης κινασών (Oakley *et al.* 2013).

Οι μη-γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών επιτυγχάνονται και μέσω δύο τύπων υποδοχέων που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, τον κλασικό GR και τον μη-κλασικό GR. Ο κλασικός μεμβρανικός GR αναγνωρίστηκε σε λεμφώματα και μονοκύτταρα περιφερικού αίματος ως μια τροποποιημένη μορφή του κυτταροπλασματικού GR α (Mitre-Aguilar *et al.* 2015). Ο μηχανισμός δράσης του στηρίζεται στη ρύθμιση διαφόρων οδών σηματοδότησης. Πρώτον, έχει δειχθεί ότι μπορεί να ενεργοποιήσει την p42 MAPK κινάση. Δεύτερον, αναστέλλει το μονοπάτι των MAPK ERK1/2 κινασών. Μια τρίτη οδός έχει περιγραφεί, η οποία ξεκινά με την ενεργοποίηση πρωτεϊνών με περιοχές SH3, όπως οι κινάσες Src και Ras. Η τελευταία μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι σηματοδότησης MAPK (Mitre-Aguilar *et al.* 2015).

Ο μη-κλασικός μεμβρανικός GR είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που πρωτοαναγνωρίστηκε στις πλασματικές μεμβράνες νευρώνων του αμφίβιου *Taricha granulosa* ως λειτουργικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Mitre-Aguilar *et al.* 2015). Διαφέρει όμως από τον κλασικό μεμβρανικό GR, αφού παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την κορτικοστερόνη, αλλά όχι για ορμόνες που προσδέονται στον κλασικό υποδοχέα, όπως η αλδοστερόνη και η δεξαμεθαζόνη (συνθετικό γλυκοκορτικοειδές) (Mitre-Aguilar *et al.* 2015). Ο μεμβρανικός αυτός GR είναι ένας GPCR υποδοχέας και επομένως είναι συνδεδεμένος με πρωτεΐνες G. Μετά τη δέσμευση του προσδέτη, οι πρωτεΐνες G α_s ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση (AC), η οποία με τη σειρά της συνθέτει cAMP από 5'AMP. Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική

κινάση A (PKA), η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα CREB. Ο φωσφορυλιωμένος CREB μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA και προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες $G_{\alpha q}$ ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC), η οποία διεγείρει την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και διακυλογλυκερόλης (DAG). Η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση PKC και η IP_3 οδηγεί στην απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} που είναι αποθηκευμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Το Ca^{2+} αποτελεί δεύτερο αγγελιαφόρο στην κυτταρική σηματοδότηση (Mitre-Aguilar *et al.* 2015).

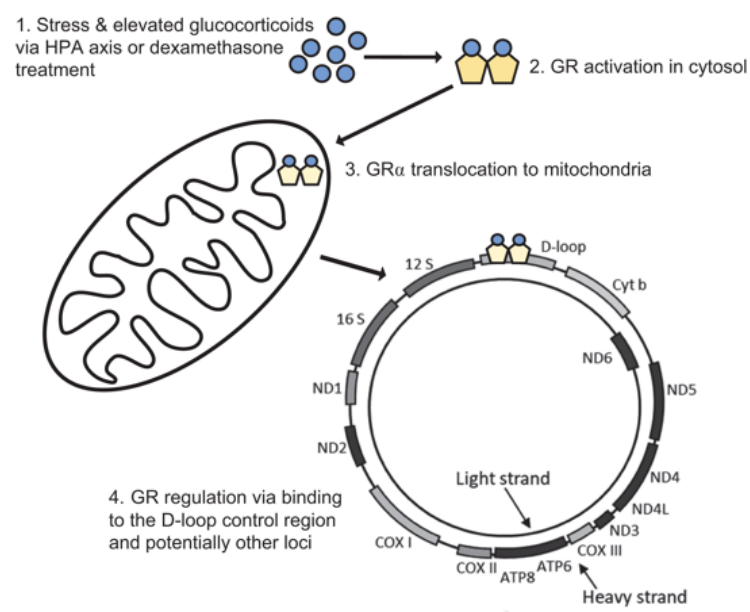
1.2.6 Δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολυλειτουργικά οργανίδια του κυττάρου και περιέχουν πολλά πανομοιότυπα αντίγραφα του δικού τους γονιδιώματος, του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Χαρακτηρίζονται ως «αποθήκες ενέργειας», λόγω της ικανότητάς τους να παράγουν ενέργεια με τη μορφή ATP, η οποία πραγματοποιείται από τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων (OXPHOS) μέσω της οξείδωσης σακχάρων, λιπαρών οξέων και πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπιδίων, ομάδων αίμης, πουρινών και στεροειδών ορμονών, ελέγχουν τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό και ρυθμίζουν τη θερμογένεση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Τέλος, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες, καθώς παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), και έχουν την ικανότητα να παράγουν σήματα που προάγουν την προσαρμοστική απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες (Kokkinoroulou *et al.* 2021).

Ο εντοπισμός του υποδοχέα GR στα μιτοχόνδρια, καθώς και η ταυτοποίηση αλληλουχιών GREs στο μιτοχονδριακό DNA, καταδεικνύουν έναν άμεσο - επαγόμενο από τα γλυκοκορτικοειδή - μηχανισμό που οδηγεί στη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων γονιδίων (Kokkinoroulou *et al.* 2021). Ειδικότερα, προτάθηκε ότι ο GR, και πιο συγκεκριμένα η ισομορφή GR α , μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια ως απόκριση στην πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών, ενώ η ισομορφή GR β εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον πυρήνα (Lapp *et al.* 2019) (Psarra *et al.* 2008). Πρόσφατα στοιχεία κατέδειξαν ότι και η ισομορφή GR γ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και σχετίζεται με τη ρύθμιση των μιτοχονδριακών λειτουργιών

και του ενεργειακού μεταβολισμού (Morgan *et al.* 2016). Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δεν διαθέτει τη συνηθισμένη πεπτιδική αλληλουχία υπεύθυνη για τη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, ως σήμα μιτοχονδριακού εντοπισμού ορίστηκε μια εσωτερική αλληλουχία (αμινοξέα 558-580) του ανθρώπινου GR α , η οποία βρίσκεται εντός της επικράτειας δέσμησης του προσδέτη (Sionon *et al.* 2006).

Ο GR μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρώντας με τα στοιχεία GREs, που εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή της D-loop στο μιτοχονδριακό DNA, διαμεσολαβώντας με αυτόν τον τρόπο στις ποικίλες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 9) (Psarra *et al.* 2009). Η έκφραση των γονιδίων-στόχων του ελέγχει τη ρύθμιση του μεταβολισμού και την παραγωγή ενζύμων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας. Ταυτόχρονα, τα προϊόντα των γονιδίων-στόχων αποτελούν ρυθμιστές της απόπτωσης και του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τα μιτοχόνδρια (Karra *et al.* 2022).



Εικόνα 9: Η δράση του GR στα μιτοχόνδρια. Ο GR α μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, αλληλεπιδρώντας με τα στοιχεία GREs που εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή της D-loop στο mtDNA (Lapp *et al.* 2019).

1.2.7 Βιολογικές δράσεις που ελέγχονται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο GR εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους ανθρώπινους ιστούς και όργανα και λειτουργεί ως προσδετο-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Nicolaidis *et al.* 2020). Τα πρώτα γονίδια-στόχοι των γλυκοκορτικοειδών που μελετήθηκαν σχετίζονται με τις μεταβολικές δράσεις της κορτιζόλης, που έχουν ως σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος. Πιο συγκεκριμένα, το ομοδιμερές του GR προσδένεται στο DNA, όπου προκαλεί αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, βοηθώντας στη στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης II (Caratti *et al.* 2015). Το αποτέλεσμα είναι η αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στην ηπατική γλυκονεογένεση, τη μετατροπή δηλαδή των μη-υδατανθρακικών πηγών σε γλυκόζη. Ταυτόχρονα, αυξάνεται η αποθήκευση του γλυκογόνου, που αποτελεί την αποθηκευμένη μορφή της γλυκόζης, στο ήπαρ.

Επιπλέον, προκειμένου να διατηρείται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σε υψηλά επίπεδα, η κορτιζόλη μειώνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα των μυών και του λιπώδους ιστού, καθώς και τον περαιτέρω καταβολισμό της στα κύτταρα αυτά. Στους μυς διεγείρει την αποικοδόμηση πρωτεϊνών, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων, τα οποία είναι αναγκαία ως υπόστρωμα της γλυκονεογένεσης. Στο λιπώδη ιστό, αντίστοιχα, διεγείρει τη λιπόλυση, απελευθερώνοντας έτσι γλυκερόλη, ένα εναλλακτικό πρόδρομο μόριο για τη γλυκονεογένεση (Kuo *et al.* 2015).

Επίσης, η κορτιζόλη αναστέλλει το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης και με αυτόν τον τρόπο αντιτίθεται στη δράση της. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη μείωση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα. Ταυτόχρονα, επάγει την έκκριση γλυκαγόνης από τα α κύτταρα του παγκρέατος, μιας πεπτιδικής ορμόνης η οποία αυξάνει την ηπατική γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση, καθώς και τη λιπόλυση, και με τον τρόπο αυτό καταστέλλει τη λιπογένεση (Kuo *et al.* 2015).

Ακόμη, η κορτιζόλη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή στο στρες, καθώς οποιαδήποτε στρεσογόνος κατάσταση αποτελεί ερέθισμα για την έκκριση κορτιζόλης μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Όταν μάλιστα το στρες συνδυάζεται με

ιστικές βλάβες, η απόκριση συνδυάζεται με τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις της κορτιζόλης. Ειδικότερα, η κορτιζόλη συμμετέχει σε όλα σχεδόν τα στάδια της φλεγμονής, εμποδίζοντας την παραγωγή φλεγμονωδών χημικών μεσολαβητών. Όσον αφορά τις ανοσολογικές αποκρίσεις, καταστέλλει την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα (Hannibal *et al.* 2014) (Sherwood 2013).

1.3 Σκελετικοί μύες

1.3.1 Δομή των σκελετικών μυών

Οι σκελετικοί μύες αποτελούνται από εκατοντάδες επιμήκη μυϊκά κύτταρα ή μυϊκές ίνες, οι οποίες βρίσκονται σε παράλληλη διάταξη μεταξύ τους και περιβάλλονται από συνδετικό ιστό. Οι μυϊκές ίνες είναι πολυπύρρηνα κύτταρα, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα σωματικά κύτταρα, καθώς προκύπτουν από τη συγχώνευση πολλών μυοβλαστών. Οι μυοβλάστες είναι τα αρχέγονα μυϊκά κύτταρα που διαθέτουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε πιο εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους. Να σημειωθεί ότι οι πυρήνες βρίσκονται τοποθετημένοι στην περιφέρεια της μυϊκής ίνας. Ένα άλλο χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, γεγονός που εξηγεί με ποιό τρόπο τα μυϊκά κύτταρα μπορούν να παράγουν μεγάλα ποσά ενέργειας, προκειμένου οι μύες να επιτελέσουν τις διάφορες κινήσεις του σώματος. Οι μυϊκές ίνες που συνιστούν έναν σκελετικό μυ δεν είναι όλες ίδιες αλλά παρουσιάζουν ετερογένεια, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στους μυς μια μεγάλη ποικιλία κινήσεων.

Κάθε σκελετική μυϊκή ίνα οργανώνεται σε μυϊκά ινίδια, που εκτείνονται σε όλο το μήκος της. Κάθε μυϊκό ινίδιο αποτελείται από δύο τύπους κυτταροσκελετικών μικροϊνιδίων, τα παχέα και τα λεπτά νημάτια. Τα παχιά νημάτια αποτελούνται από εκατοντάδες μόρια μυοσίνης, ενώ τα λεπτά νημάτια αποτελούνται από τις πρωτεΐνες ακτίνη, τροπομυοσίνη και τροπονίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σύσπαση των σκελετικών μυών (Sherwood 2013).

Οι κεφαλές της μυοσίνης αλληλεπιδρούν με τα μόρια της ακτίνης ώστε να επιτευχθεί η σύσπαση των σκελετικών μυών και επιπλέον περιέχουν μία θέση δέσμευσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η υδρόλυση του ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό (Pi) καταλύεται από το ένζυμο ATPάση της μυοσίνης και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη σύσπαση των μυών. Όταν η μυϊκή ίνα δεχτεί ένα ερέθισμα με τη μορφή δυναμικού δράσης από τους κινητικούς νευρώνες, απελευθερώνεται Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το Ca^{2+} προσδένεται στην τροπονίνη των λεπτών νηματίων, προκαλώντας μια αλλαγή στη διαμόρφωση της τροπομυοσίνης και εκθέτοντας με αυτόν τον τρόπο μια θέση δέσμευσης της μυοσίνης στο μόριο της ακτίνης. Έτσι, η κεφαλή της μυοσίνης συνδέεται με την ακτίνη και έλκει το λεπτό νημάτιο κατά μήκος του παχέος νηματίου. Η πρόσδεση ενός μορίου ATP στην κεφαλή της μυοσίνης προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου, μειώνοντας τη συγγένεια της μυοσίνης για την ακτίνη. Το γεγονός αυτό προκαλεί την αποδέσμευση της ακτίνης από τη μυοσίνη. Ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται, επιτρέποντας τη συστολή και τη χάλαση των σκελετικών μυών (Fitts 2008).

1.3.2 Τύποι σκελετικών μυϊκών ινών

Οι μυϊκές ίνες ενός σκελετικού μύος διαφέρουν ως προς τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά. Με βάση την ταχύτητα συστολής τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε μυϊκές ίνες τύπου I (βραδείες μυϊκές ίνες) και μυϊκές ίνες τύπου II (ταχείες μυϊκές ίνες). Οι ταχείες μυϊκές ίνες εμφανίζουν υψηλότερη δραστικότητα του ενζύμου ATPάση της μυοσίνης συγκριτικά με τις βραδείες μυϊκές ίνες. Το ένζυμο αυτό σχετίζεται με την υδρόλυση του ATP, συνεπώς η υψηλότερη δραστικότητά του έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ταχύτητα διάσπασης του ATP, που παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για τον επαναλαμβανόμενο κύκλο δέσμευσης και αποδέσμευσης της ακτίνης με τη μυοσίνη. Έτσι, συσπώνται πιο γρήγορα σε σχέση με τις βραδείες μυϊκές ίνες, που εμφανίζουν χαμηλότερο ρυθμό υδρόλυσης του ATP (Sherwood 2013).

Επιπλέον, οι μυϊκές ίνες τύπου I και τύπου II διαφέρουν ως προς τη δομή του μορίου της μυοσίνης που περιέχουν. Πιο συγκεκριμένα, εκφράζουν διαφορετικές ισομορφές της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *MYH*. Με βάση αυτό το

χαρακτηριστικό, οι μυϊκές ίνες τύπου II διακρίνονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες, τις μυϊκές ίνες τύπου IIA, IIX και IIB. Στον άνθρωπο έχει αναφερθεί ότι δεν υπάρχουν μυϊκές ίνες τύπου IIB. Επιπλέον, η έκφραση διαφορετικών ισομορφών της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης επιτρέπουν πιο σύνθετες κατηγοριοποιήσεις των μυϊκών ινών (Talbot *et al.* 2016).

Οι μυϊκές ίνες διαφέρουν επίσης ως προς τη μεταβολική οδό που χρησιμοποιούν για να παράγουν ενέργεια και έτσι ταξινομούνται σε οξειδωτικές και γλυκολυτικές. Οι πρώτες, όπως δηλώνει και το όνομά τους, διαθέτουν πολλαπλά μιτοχόνδρια και συνθέτουν ATP αερόβια, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επειδή η οξειδωτική φωσφορυλίωση απαιτεί οξυγόνο, αυτές οι μυϊκές ίνες αιματώνονται μέσω ενός δικτύου τριχοειδών και ακόμη περιέχουν μεγάλα ποσά μυοσφαιρίνης, η οποία επίσης δεσμεύει οξυγόνο. Η υψηλή περιεκτικότητα σε μυοσφαιρίνη προσδίδει βαθύ κόκκινο χρώμα στις μυϊκές ίνες, για αυτό αναφέρονται συχνά ως ερυθρές ίνες. Από την άλλη πλευρά, οι γλυκολυτικές μυϊκές ίνες συνθέτουν ATP αναερόβια, μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Αυτές οι μυϊκές ίνες περιέχουν λιγότερα μιτοχόνδρια σε σχέση με τις οξειδωτικές, αλλά είναι πλούσιες σε γλυκολυτικά ένζυμα και γλυκογόνο. Επειδή χρειάζονται λιγότερο οξυγόνο, διαθέτουν χαμηλή περιεκτικότητα σε μυοσφαιρίνη και το δίκτυο των τριχοειδών που τις περιβάλλουν δεν είναι τόσο εκτεταμένο. Συνεπώς, αυτές οι μυϊκές ίνες εμφανίζουν ωχρο χρώμα, για αυτό και ονομάζονται λευκές ίνες. Τα ενεργειακά αποθέματα των οξειδωτικών μυϊκών ινών είναι σημαντικά περισσότερα σε σχέση με εκείνα των γλυκολυτικών ινών και ακόμη, η σύνθεση ATP μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης δεν οδηγεί σε συσσώρευση γαλακτικού οξέος. Επομένως, οι οξειδωτικές μυϊκές ίνες φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικές στην κόπωση σε σχέση με τις γλυκολυτικές. Στην κατηγορία των οξειδωτικών ινών εντάσσονται οι μυϊκές ίνες τύπου I και IIA, ενώ στις γλυκολυτικές εντάσσονται οι μυϊκές ίνες τύπου IIX και IIB (Sherwood 2013).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σε συνέχεια ευρημάτων πρόσφατης βιβλιογραφία και μελετών που αφορούν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και τη δράση του, δικός μας στόχος ήταν να διερευνηθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός του υποδοχέα GR σε μυϊκές ίνες σκελετικού μύος, δύο διαφορετικής προέλευσης ειδών. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του τύπου των σκελετικών μυϊκών ινών, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει κάποιο διαφορετικό πρότυπο κατανομής του υποδοχέα στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών. Ακόμη, γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι ο GR μετατοπίζεται και στα μιτοχόνδρια όπου συμμετέχει σε διάφορες διαδικασίες, σκοπός μας ήταν να οπτικοποιήσουμε τα οργανίδια αυτά σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού, ώστε να ελέγξουμε την πιθανή παρουσία GR στα οργανίδια αυτά. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε σκελετικούς μυς από ποντικό και χοίρο, έτσι ώστε να έχουμε και μία συγκριτική εικόνα των αποτελεσμάτων σε αυτούς τους δύο διαφορετικούς ιστούς.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ιστοχημικής χρώσης (και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Sakkas 2003) για τη διάκριση του διαφορετικού τύπου μυϊκών ινών στον ιστό σκελετικού μύος. Επιπλέον, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας προσπαθήσαμε να ελέγξουμε την υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στις μυϊκές ίνες από μοιρό των προαναφερθέντων ειδών. Με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε και η παρατήρηση των μιτοχονδρίων των μυϊκών ινών και στα δύο είδη ιστών, χρησιμοποιώντας ως μόριο-δείκτη το μιτοχονδριακό ένζυμο COX IV, καθώς εντοπίζεται αποκλειστικά στα συγκεκριμένα οργανίδια.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Οργανολογία

- Κρυστόμος (SLEE MAINZ)
- Ζυγός (KERN EW)
- pHμετρο (Metrohm)
- Απαγωγός (EQUIP)
- Πιπέτες – Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μl, 20-200 μl, 100- 1.000 μl
- Vortex (Bio Vortex V1)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο (ZEISS LSM 800)

3.2 Υλικά

3.2.1 Χημικά

- ATP (Adenine-Triphosphate) (SIGMA)
- Οξικό νάτριο (Sodium Acetate) CH_3COONa , $M_r=82.03$ gr/mol (MERCK)
- Χλωριούχο κάλιο (Potassium Chloride) KCl $M_r=74.55$ gr/mol (EMSURE)
- Γλυκίνη (Glycine) $M_r=75.07$ gr/mol (SERVA)
- Χλωριούχο Ασβέστιο (Calcium Chloride) CaCl_2 $M_r=147.02$ gr/mol (MERCK)
- Χλωριούχο Κοβάλτιο (Cobalt Chloride) CoCl_2 $M_r=98.9161$ g/mol (ALFA AESAR)
- Σουλφίδιο του αμμωνίου (Ammonium Sulphide) $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (SIGMA-ALDRICH)
- Οξικό οξύ (CH_3COOH) 1M (HONEYWELL)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 1M (APPLICHEM)
- OCT (SAKURA FINETEK)
- PVA
- Μεθανόλη (CHEM-LAB)
- Ακετόνη (SIGMA-ALDRICH)
- Χλωροφόρμιο (APPLICHEM)
- Αιθανόλη (HONEYWELL)

- PBS 1X - προκύπτει με αραιώση από PBS 10X (Phosphate-buffered saline) (GIBCO)
- Tween 20 (SIGMA)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO)
- NMS (Normal Mouse Serum)
- Χρωστική Hoechst 33342 (SIGMA)

3.2.2 Αντισώματα

- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR (H-300), πολυκλωνικό (rabbit) (Santa Cruz)
- Πρωτογενές αντίσωμα έναντι του COX IV (11242-1-AP), πολυκλωνικό (rabbit) (Proteintech)
- Δευτερογενές αντίσωμα (α-rabbit), σημασμένο με φθοροφόρο μόριο (Alexa Fluor 488) (Invitrogen)

Σημείωση: τα πολυκλωνικά αντισώματα προέρχονται από πολλούς διαφορετικούς κλώνους Β-κυττάρων, με αποτέλεσμα να αναγνωρίζουν πολλούς διαφορετικούς επιτόπους. Έτσι, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία απ' ό,τι τα μονοκλωνικά αντισώματα, παρόλο που χαρακτηρίζονται από μικρότερη εξειδίκευση.

3.2.3 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa 0.1 M και KCl 0.1 M, pH=4.6

Για τελικό όγκο 100 ml, ζυγίζονται 0.82 gr CH₃COONa και 0.74 gr KCl και συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τα 50 ml. Η ρύθμιση του pH του διαλύματος στην επιθυμητή τιμή γίνεται προσθέτοντας CH₃COOH 1M. Τέλος, συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τον τελικό όγκο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa 0.1 M και KCl 0.1 M, pH=4.4

Παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με το παραπάνω διάλυμα, με τη μόνη διαφορά ότι το pH ρυθμίζεται στην τιμή 4.4 αντί 4.6.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Glycine 20 mM και CaCl₂ 20 mM, pH=9.4

Για τελικό όγκο 100 ml, ζυγίζονται 0.15 gr Glycine και 0.294 gr CaCl₂ και συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τα 50 ml. Η ρύθμιση του pH του διαλύματος στην επιθυμητή τιμή γίνεται προσθέτοντας NaOH 1M. Τέλος, συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τον τελικό όγκο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Glycine 40 mM και CaCl₂ 20 mM, pH=9.4

Για τελικό όγκο 100 ml, ζυγίζονται 0.3 gr Glycine και 0.294 gr CaCl₂ και συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τα 50 ml. Η ρύθμιση του pH του διαλύματος στην επιθυμητή τιμή γίνεται προσθέτοντας NaOH 1M. Τέλος, συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τον τελικό όγκο.

- Ρυθμιστικό διάλυμα glycine 40 mM και CaCl₂ 20 mM, pH=9.4, που περιέχει ATP 2.5 mM

Η συγκέντρωση στο stock του ATP είναι 0.2 M. Για τελικό όγκο 1 ml, προστίθενται 12.5 μl ATP σε 987.5 μl του ρυθμιστικού διαλύματος Glycine 40 mM και CaCl₂ 20 mM, pH=9.4.

- Διάλυμα CaCl₂ 1% w/v

Για τελικό όγκο 100 ml, ζυγίζεται 1 gr CaCl₂ και συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τα 100 ml.

- Διάλυμα CoCl₂ 2% w/v

Για τελικό όγκο 100 ml, ζυγίζονται 2 gr CoCl₂ και συμπληρώνουμε dH₂O μέχρι τα 100 ml.

- Διάλυμα (NH₄)₂S 1% w/v

Παρασκευάζεται με αραιώση του stock (20% w/v). Για τελικό όγκο 500 μl, προστίθενται 25 μl (NH₄)₂S σε 475 μl dH₂O.

- Διάλυμα Blocking 10% v/v NMS

Για τελικό όγκο 1 ml, προστίθενται 0.1 ml NMS σε 0.9 ml PBST 1X και αναμειγνύονται με vortex.

- Διάλυμα Blocking 10% v/v FBS

Για τελικό όγκο 1 ml, προστίθενται 0.1 ml FBS σε 0.9 ml PBST 1X και αναμειγνύονται με vortex.

3.2.4 Αναλώσιμα

- ✓ Αντικειμενοφόροι πλάκες (Slee medical)
- ✓ Ρύγχοι-tips (0.2-10 μL , 20-200 μL και 100- 1000 μL) (Sarstedt)
- ✓ Πλαστικά σωληνάκια τύπου eppendorfs (1.5 ml) (Sarstedt)
- ✓ Καλυπτρίδες (Sigma)

3.3 Τεχνικές

3.3.1 Κοπή διαδοχικών τομών σκελετικού μυϊκού ιστού σε κρουτόμο

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ιστός σκελετικού μυός από ποντικό και χοίρο, από το τμήμα του μοιρού. Αρχικά, ρυθμίζεται η θερμοκρασία του κρουτόμου στους -20°C , η οποία είναι βέλτιστη για τα συγκεκριμένα είδη, προκειμένου οι τομές που θα προκύψουν να είναι συνεχείς και ομοιόμορφες. Λανθασμένη θερμοκρασία οδηγεί σε αλλοίωση του ιστού. Τα δείγματα των ιστών, που βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C , αφήνονται για μικρό χρονικό διάστημα στο θάλαμο του κρουτόμου, έτσι ώστε να εξισορροπηθούν με τη θερμοκρασία του. Στη συνέχεια, ο ιστός στερεώνεται με μία σταγόνα OCT πάνω σε μια ειδική κεφαλή. Αφού περάσουν μερικά λεπτά και ο ιστός έχει κολλήσει πάνω στην επιφάνεια, η ειδική κεφαλή τοποθετείται με τέτοιο τρόπο, ώστε το δείγμα να βρίσκεται κάθετα στη λεπίδα. Ακολουθεί “τριμάρισμα” με σκοπό να λειανθεί η επιφάνεια του δείγματος και έπειτα η συλλογή διαδοχικών τομών πάχους 6 μm των ιστών πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

3.3.2 Ιστοχημική ανάλυση του τύπου των μυϊκών ινών σκελετικού μυϊκού ιστού

Η ιστοχημική χρώση για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων σκελετικών μυϊκών ινών στηρίζεται στο ένζυμο της ATPάσης της μυοσίνης, το οποίο συμμετέχει στη σύσπαση των μυών. Το πρωτόκολλο (Sakkas 2003) που χρησιμοποιήθηκε, πραγματοποιήθηκε σε μη-

μονιμοποιημένες τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού και χορινού και έχει ως εξής:

Αρχικά, οι τομές προεπώζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COONa 0.1 M και KCl 0.1 M με $\text{pH}=4.6$, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, επώζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα CH_3COONa 0.1 M και KCl 0.1 M με $\text{pH}=4.4$, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των δειγμάτων στα διαλύματα όξινου pH έχει ως αποτέλεσμα να δραστηριοποιείται η ATPάση της μυοσίνης στις μυϊκές ίνες τύπου I, ενώ να αδρανοποιείται στις μυϊκές ίνες τύπου II. Ακολουθεί εμφάνιση των τομών για 30 δευτερόλεπτα σε ρυθμιστικό διάλυμα Glycine 20 mM και CaCl_2 20 mM με $\text{pH}=9.4$. Έπειτα, οι τομές επώζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Glycine 40 mM και CaCl_2 20 mM που περιέχει ATP 2.5 mM, με $\text{pH}=9.4$, για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ανόργανο φωσφορικό από την υδρόλυση του ATP , το οποίο καθιζάνει ως φωσφορικό ασβέστιο. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 30 δευτερολέπτων σε διάλυμα CaCl_2 1% (w/v) και μετά τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα CoCl_2 2% (w/v) για 3 λεπτά στο σκοτάδι. Σε αυτό το σημείο, το ασβέστιο του φωσφορικού ασβεστίου αντικαθίσταται από κοβάλτιο, δίνοντας έτσι φωσφορικό κοβάλτιο. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 30 δευτερολέπτων σε dH_2O και οι τομές αφήνονται για λίγο στον απαγωγό να στεγνώσουν. Τέλος, ακολουθεί επώαση σε διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 1% (w/v), για 5 δευτερόλεπτα στον απαγωγό. Αυτό αποτελεί το στάδιο της χρώσης, κατά το οποίο ο φώσφορος του φωσφορικού κοβαλτίου αντικαθίσταται, αφήνοντας ένα ίζημα σουλφιδικού κοβαλτίου με χρώμα καφέ-μαύρο. Κατ' αυτόν τον τρόπο επομένως, χρωματίζονται τα σημεία δράσης του ενζύμου της ATPάσης της μυοσίνης, στις μυϊκές ίνες που είναι ακόμη ενεργό και έχει καταλύσει την αντίδραση υδρόλυσης του ATP . Οι τομές αφήνονται για λίγο στον απαγωγό να στεγνώσουν και τέλος τοποθετούνται καλυπτρίδες πάνω στα δείγματα, οι οποίες κολλούνται με PVA και αφήνονται να στεγνώσουν για 2-3 ώρες στο σκοτάδι (επειδή το PVA είναι φωτοευαίσθητο). Οι αντικειμενοφόροι πλάκες μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C , μέχρι να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

	pH 4,37	pH 4,6	pH 10,3
I	●	●	○
IIA	○	○	●
IIX	○	●	●

Εικόνα 10: Πρότυπο ιστολογικής χρώσης για τη διάκριση του τύπου μυϊκών ινών σκελετικού μυϊκού ιστού με βάση το pH του ρυθμιστικού διαλύματος CH₃COONa 0.1 M και KCl 0.1 M της προεπώασης των τομών σκελετικού μυός (Sakkas 2003).

3.3.3 Μονιμοποίηση τομών σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού

Πριν την πραγματοποίηση της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές από σκελετικό μυ του ποντικού υφίστανται μονιμοποίηση. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με τις τομές επωάζεται σε διάλυμα μεθανόλης 100% για 10 λεπτά στους -20°C και έπειτα σε διάλυμα ακετόνης 100% για 5 λεπτά στους -20°C. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις των τομών με διάλυμα PBS 1X.

3.3.4 Μπλοκάρισμα μη-ειδικών θέσεων σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού

Μετά τη μονιμοποίηση, οι τομές επωάζονται σε διάλυμα 10% NMS (v/v) σε PBST 1X για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ο ορός του ποντικού φέρει αντισώματα που συνδέονται σε πρωτεΐνες του ιστού και αποτρέπουν τη μη-ειδική δέσμευση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα, διαδικασία που αναφέρεται ως blocking. Στη συνέχεια, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X.

3.3.5 Μονιμοποίηση τομών σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου

Αντίστοιχα, και οι τομές από σκελετικό μυ του χοίρου πρέπει αρχικά να μονιμοποιηθούν, πριν πραγματοποιηθεί η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Η αντικειμενοφόρος πλάκα με τις τομές επωάζεται αρχικά σε διάλυμα ακετόνης/χλωροφορμίου 100% σε αναλογία 1:1 για 10 λεπτά στους 4°C και έπειτα σε διάλυμα αιθανόλης 100% για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις των τομών με διάλυμα PBS 1X.

3.3.6 Μπλοκάρισμα μη-ειδικών θέσεων σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου

Μετά τη μονιμοποίηση, οι τομές επωάζονται σε διάλυμα 10% FBS (v/v) σε PBST 1X για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως ο ορός του ποντικού, έτσι και ο εμβρυϊκός βόειος ορός φέρει αντισώματα που συνδέονται σε πρωτεΐνες του ιστού του χοίρου και αποτρέπουν τη μη-ειδική δέσμευση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Στη συνέχεια, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X.

3.3.7 Ανοσοϊστοχημεία στις τομές σκελετικού μυϊκού ιστού του ποντικού και του χοίρου

Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Η βασική αρχή της ανοσοϊστοχημείας στηρίζεται στην ειδική σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ως αντιγόνο θεωρείται το μόριο που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Αρχικά, ένα πρωτογενές αντίσωμα συνδέεται ειδικά στο επιθυμητό μόριο. Στη συνέχεια, ένα δευτερογενές αντίσωμα συνδέεται στο πρωτογενές. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με κάποια φθορίζουσα χρωστική, η οποία, όταν διεγερθεί, εκπέμπει φθορισμό σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και επιτρέπει έτσι τον εντοπισμό της υποκυτταρικής θέσης του υπό μελέτη μορίου, μετά από παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην προκειμένη περίπτωση, το μόριο που θέλουμε να εντοπίσουμε είναι ο υποδοχέας GR.

Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR διαλύεται σε PBST 1X, έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1:50. Γενικά τα αντισώματα προτιμάται να διαλύονται σε PBST και όχι σε PBS, διότι το Tween που περιέχεται στο PBST είναι απορρυπαντικό και, λόγω των λιποδιαλυτών του χαρακτηριστικών, βοηθά τα αντισώματα να διεισδύσουν στις μεμβράνες των κυττάρων. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (στο σκοτάδι) και σε συνθήκες υγρασίας, ώστε να μην εξατμιστεί το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το χρονικό διάστημα, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X, ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια του αντισώματος που δεν έχουν συνδεθεί ειδικά στον υποδοχέα GR. Ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από το πολυκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα (H-300) αντιστοιχεί σε μια εσωτερική περιοχή του GR ανθρώπινης προέλευσης, και πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζονται τα αμινοξέα 121-420 της αμινο-τελικής επικράτειας του υποδοχέα.

Το δευτερογενές αντίσωμα (α-rabbit Alexa Fluor 488) διαλύεται και αυτό σε PBST 1X, έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1:500. Στο διάλυμα αυτής της επώασης (master mix) προστίθεται και η χρωστική Hoechst 33342, η οποία συνδέεται σε περιοχές της μικρής αύλακας του DNA, πλούσιες σε αδερίνη και θυμίνη (Chazotte 2011). Έτσι, η χρώση με Hoechst απεικονίζει ουσιαστικά τους πυρήνες των μυϊκών ινών. Η συγκέντρωση της Hoechst στο διάλυμα πρέπει να είναι 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Η επώαση με το διάλυμα αυτό διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιείται στο σκοτάδι, επειδή το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488, η οποία είναι φωτοευαίσθητη. Το laser που χρησιμοποιείται ως πηγή φωτός στο συνεστιακό μικροσκόπιο, όπου γίνεται η παρατήρηση των τομών, διεγείρει την χρωστική σε μήκος κύματος 488 nm, η οποία εκπέμπει φως πράσινου χρώματος σε μήκος κύματος 520 nm. Μετά το πέρας της 1 ώρας, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος. Τέλος, οι τομές αφήνονται για λίγο να στεγνώσουν και τοποθετούνται καλυπτρίδες πάνω στα δείγματα, οι οποίες κολλούνται με PVA και αφήνονται να στεγνώσουν για 2-3 ώρες στο σκοτάδι. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C, μέχρι να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

Για την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε επίσης η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, όπου σε αυτήν την περίπτωση το μόριο-δείκτης που χρησιμοποιήσαμε

ήταν η υπομονάδα IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COX IV). Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται μόνο στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα, βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Καταλύει το τελευταίο βήμα στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς δέχεται ηλεκτρόνια από το ανηγμένο κυτόχρωμα c και τα μεταφέρει στον τελικό δέκτη, το O₂, ανάγοντάς το σε H₂O (Zong *et al.* 2018).

Αρχικά, το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του COX IV διαλύεται σε PBST 1X, έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1:50. Η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (στο σκοτάδι) και σε συνθήκες υγρασίας. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X, ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια του αντισώματος που δεν έχουν συνδεθεί ειδικά στο μόριο COX IV.

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιείται είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο πείραμα (a-rabbit Alexa Fluor 488). Διαλύεται, όπως προαναφέρθηκε, σε PBST 1X έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1:500. Στο διάλυμα της επώασης (master mix) προστίθεται και η χρωστική Hoechst 33342, η συγκέντρωση της οποίας πρέπει να είναι 1 μg/ml. Η επώαση με το διάλυμα αυτό διαρκεί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της 1 ώρας, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος που βρίσκεται σε περίσσεια. Τέλος, οι τομές αφήνονται για λίγο να στεγνώσουν και τοποθετούνται καλυπτρίδες πάνω στα δείγματα, οι οποίες κολλούνται με PVA και αφήνονται να στεγνώσουν για 2-3 ώρες στο σκοτάδι. Οι αντικειμενοφόροι πλάκες μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C, μέχρι να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

3.3.8 Ανοσοϊστοχημεία – Δείγματα ελέγχου

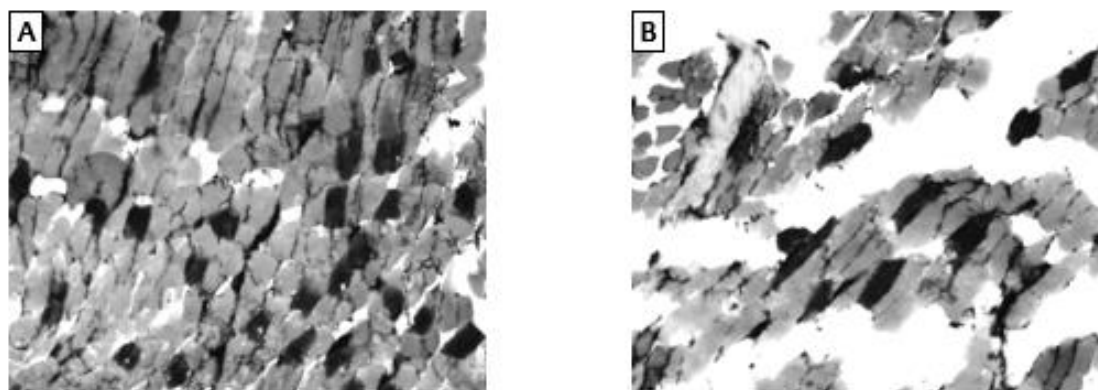
Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το σήμα που παρατηρούμε στο μικροσκόπιο οφείλεται πράγματι στην παρουσία του υποδοχέα, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ελέγχου (control). Σε αυτά, οι τομές του σκελετικού μυϊκού ιστού του ποντικού και του χοίρου, αφού μονιμοποιηθούν με τη χρήση των οργανικών διαλυτών που αναφέρθηκαν και παραπάνω, επωάζονται με το διάλυμα του Blocking για 1 ώρα (με το διάλυμα που αναφέρθηκε προηγουμένως για τον κάθε ιστό), ώστε να μπλοκαριστούν οι μη-ειδικές θέσεις σύνδεσης. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X και στη συνέχεια, επώαση για 1 ώρα με το διάλυμα το

οποίο περιέχει το ειδικό δευτερογενές αντίσωμα (α-rabbit Alexa Fluor 488) και τη χρωστική Hoechst 33342. Αφού ολοκληρωθεί αυτό το χρονικό διάστημα, ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1X και τέλος τοποθετούνται καλυπτρίδες πάνω στα δείγματα, οι οποίες κολλούνται με PVA και αφήνονται να στεγνώσουν για 2-3 ώρες στο σκοτάδι. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιείται προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το σήμα είναι ειδικό και στο πείραμα για την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων. Στα δείγματα control, όπου δεν πραγματοποιείται επώαση με πρωτογενές αντίσωμα αλλά μόνο με το δευτερογενές, δεν αναμένεται σήμα παρά μόνο αν το δευτερογενές αντίσωμα αλληλεπιδρά με κάποιες από τις πρωτεΐνες του ιστού. Στην περίπτωση αυτή, το συγκεκριμένο δευτερογενές αντίσωμα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, διότι ευθύνεται για την ύπαρξη μη-ειδικού σήματος.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Διάκριση των τύπων μυϊκών ινών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού

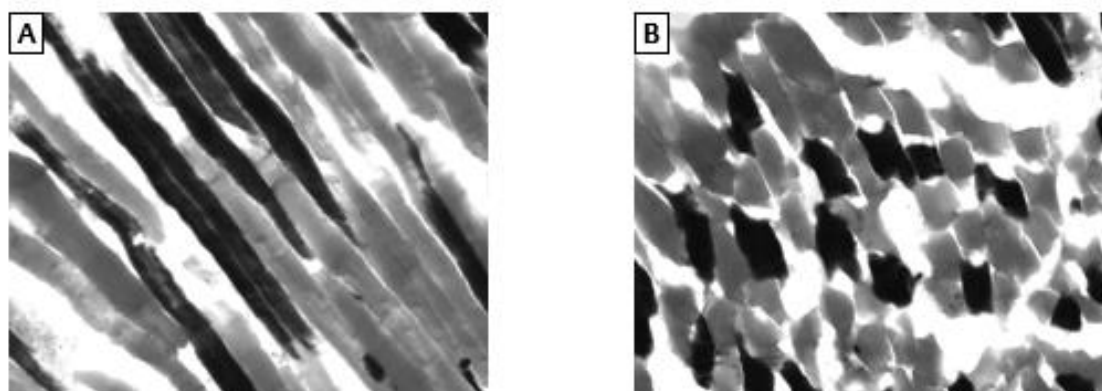
Οι τομές σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού παρατηρούνται, μετά τη χρώση, στο οπτικό μικροσκόπιο και οι φωτογραφίες που ακολουθούν λήφθηκαν με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση φακού 40x, στο ορατό πεδίο. Η προεπάση των δειγμάτων σε όξινο διάλυμα (pH=4.6) έχει ως αποτέλεσμα να δραστηριοποιείται το ένζυμο της ΑΤΡάσης της μυοσίνης στις μυϊκές ίνες τύπου I, ενώ να αδρανοποιείται στις μυϊκές ίνες τύπου II. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, παρατηρούμε το αναμενόμενο πρότυπο ιστολογικής χρώσης των μυϊκών ινών, με βάση το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε (Sakkas, 2003). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνουμε μυϊκές ίνες με πολύ σκούρο χρώμα (μαύρο), οι οποίες αντιστοιχούν στις μυϊκές ίνες τύπου I, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούμε μυϊκές ίνες με πολύ ανοιχτό χρώμα, οι οποίες αντιστοιχούν στις μυϊκές ίνες τύπου IIA. Επιπλέον, εντοπίζουμε μυϊκές ίνες με ένα ενδιάμεσο χρώμα (γκρι), οι οποίες φαίνεται να αντιστοιχούν στις μυϊκές ίνες τύπου IIX.



Εικόνα 11: Απεικόνιση διαδοχικών τομών πάχους 6 μm σκελετικού μυός ποντικού έπειτα από ιστολογική χρώση με το πρωτόκολλο Sakkas 2003 για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών. Η χρώση έγινε σε μη-μονιμοποιημένες τομές σκελετικού μυϊκού ιστού.

4.2. Διάκριση των τύπων μυϊκών ινών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου

Οι τομές σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου παρατηρούνται, έπειτα από τη χρώση, στο οπτικό μικροσκόπιο και οι παρακάτω φωτογραφίες λήφθηκαν με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σε μεγέθυνση φακού 40x, στο ορατό πεδίο. Όπως και στην περίπτωση του ποντικού, η διάκριση του τύπου των μυϊκών ινών γίνεται με βάση το pH του διαλύματος της προεπάσης των δειγμάτων. Το όξινο pH διατηρεί την ενεργότητα του ενζύμου της ΑΤΡάσης της μυοσίνης στις μυϊκές ίνες τύπου I, ενώ απενεργοποιεί το ένζυμο στις μυϊκές ίνες τύπου II. Στην εικόνα 12, διακρίνουμε μυϊκές ίνες με πολύ σκούρο χρώμα (μαύρο), οι οποίες αντιστοιχούν στις μυϊκές ίνες τύπου I, και ταυτόχρονα παρατηρούμε μυϊκές ίνες με γκρι χρώμα, οι οποίες φαίνεται να αντιστοιχούν στις μυϊκές ίνες τύπου IIA και IIX.



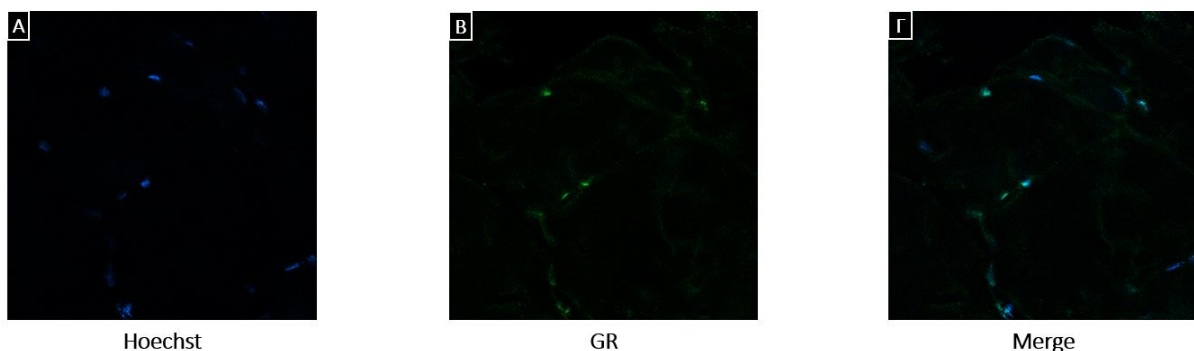
Εικόνα 12: Απεικόνιση διαδοχικών τομών πάχους 6 μm σκελετικού μυός χοίρου έπειτα από ιστολογική χρώση με το πρωτόκολλο Sakkas 2003 για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών. Η χρώση έγινε σε μη-μονιμοποιημένες τομές σκελετικού μυϊκού ιστού.

4.3. Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού

Η παρατήρηση των τομών σκελετικού μυός του ποντικού μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο και οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν σε μεγέθυνση φακού 40x. Στην εικόνα 13(A) απεικονίζονται με μπλε χρώμα οι πυρήνες των μυϊκών ινών, έπειτα από

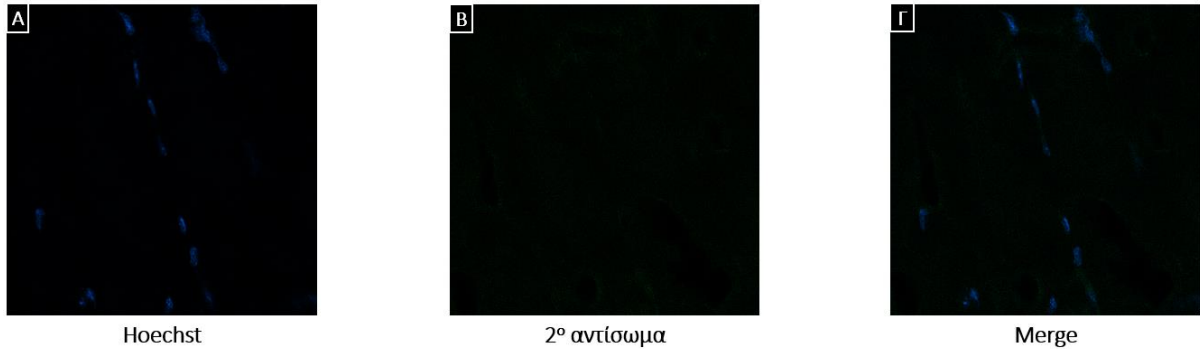
τη χρώση με την χρωστική Hoechst 33342. Στην εικόνα 13(B) απεικονίζεται με πράσινο χρώμα ο υποδοχέας GR, έπειτα από την επώαση με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για τον υποδοχέα, και στη συνέχεια δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με τη φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Αυτό που παρατηρούμε είναι κάποια διακριτά σημεία που φθορίζουν ειδικά, τα οποία αντιστοιχούν στον υποδοχέα GR. Στην εικόνα 13(Γ) έχουμε τη συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων, τη μία ακριβώς πάνω στην άλλη (Merge). Εστιάζοντας στην εικόνα Merge, παρατηρούμε το συνεντοπισμό αρκετών από αυτά τα διακριτά σημεία με τους αντίστοιχους πυρήνες, γεγονός που φαίνεται να υποδεικνύει την πυρηνική εντόπιση ορισμένων μορίων του υποδοχέα. Επιπλέον, παρατηρούμε σήμα περιμετρικά των πυρήνων, το οποίο φαίνεται να αντιστοιχεί στα μόρια του υποδοχέα που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Αυτό είναι λογικό, αν σκεφτούμε ότι πρόκειται για έναν υποδοχέα που βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα και μετατοπίζεται, μετά τη σύνδεση του προσδέτη του, στον πυρήνα, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας.

Στην εικόνα 14 απεικονίζεται το αντίστοιχο δείγμα control, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την χρωστική Hoechst 33342. Εστιάζοντας στην εικόνα 14(B), δεν παρατηρούμε σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα, γεγονός που σημαίνει ότι το αντίσωμα αυτό δεν προσδέεται σε κάποια θέση μη-ειδικά, και έτσι μπορούμε να σιγουρευτούμε ότι το σήμα που παρατηρούμε στην εικόνα 13 οφείλεται πράγματι στον GR και είναι ειδικό.



Εικόνα 13: Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα GR σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού, μετά από Blocking μίας ώρας με 10% NMS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst 33342. (B) Εντόπιση του GR μετά από επώαση με πολυκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR και δευτερογενές αντίσωμα α-rabbit Alexa Fluor 488. (Γ) Συγχώνευση των

δύο προηγούμενων εικόνων και παρατήρηση συνεντοπισμού του GR με τον πυρήνα, αλλά και του κυτταροπλασματικού σήματος περιμετρικά των πυρήνων.

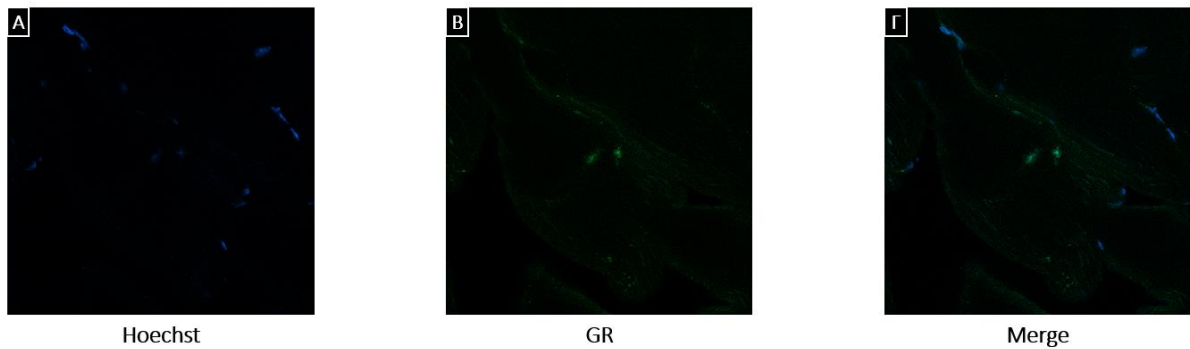


Εικόνα 14: Δείγμα control για τον έλεγχο ύπαρξης μη-ειδικού σήματος, μετά από Blocking μίας ώρας με 10% NMS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst 33342. (B) Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *a-rabbit Alexa Fluor 488*. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.

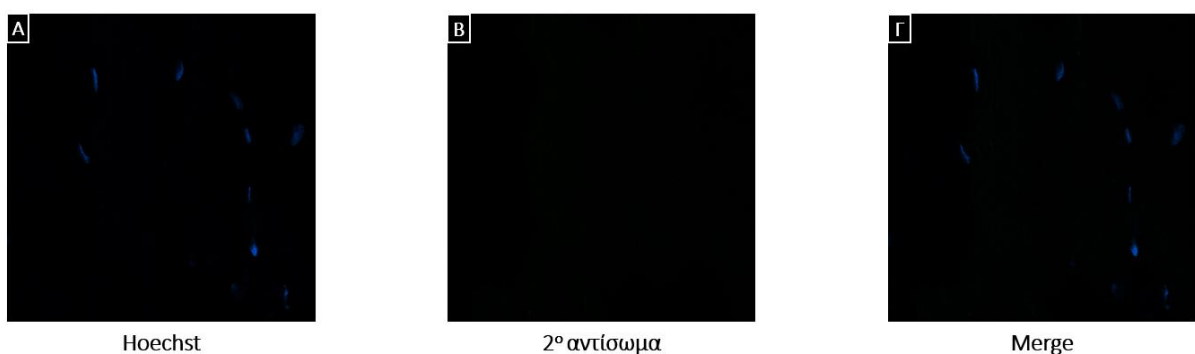
4.4. Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου

Η παρατήρηση των τομών σκελετικού μύος του χοίρου μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο και οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν σε μεγέθυνση φακού 40x. Όπως και στην περίπτωση του ποντικού, στην εικόνα 15(B) παρατηρούμε κάποια ειδικά διακριτά σημεία που φθορίζουν, τα οποία αντιστοιχούν στον υποδοχέα GR. Επιπλέον, εστιάζοντας στην εικόνα 15(Γ), παρατηρούμε το συνεντοπισμό ορισμένων από αυτά τα διακριτά σημεία με τους αντίστοιχους πυρήνες, γεγονός που φαίνεται να υποδεικνύει και σε αυτήν την περίπτωση την πυρηνική εντόπιση των μορίων του υποδοχέα GR. Ακόμη, διακρίνουμε σήμα περιμετρικά των πυρήνων, το οποίο φαίνεται να αντιστοιχεί σε κυτταροπλασματική εντόπιση του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, αφού γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία για την υποκυτταρική εντόπιση του GR στο κυτταρόπλασμα στην ανενεργή του μορφή, και τη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Στην εικόνα 16 απεικονίζεται το αντίστοιχο δείγμα control, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την χρωστική Hoechst 33342. Δεν φαίνεται μη-ειδικό σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα, επομένως επαληθεύεται ότι το σήμα που παρατηρούμε στην εικόνα 15 αντιπροσωπεύει τον υποδοχέα GR.



Εικόνα 15: Υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα GR σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου, μετά από Blocking μίας ώρας με 10% FBS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst 33342. (B) Εντόπιση του GR μετά από επώαση με πολυκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR και δευτερογενές αντίσωμα *a-rabbit* Alexa Fluor 488. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων και παρατήρηση συνεντοπισμού του GR με τον πυρήνα, αλλά και του κυτταροπλασματικού σήματος περιμετρικά των πυρήνων.

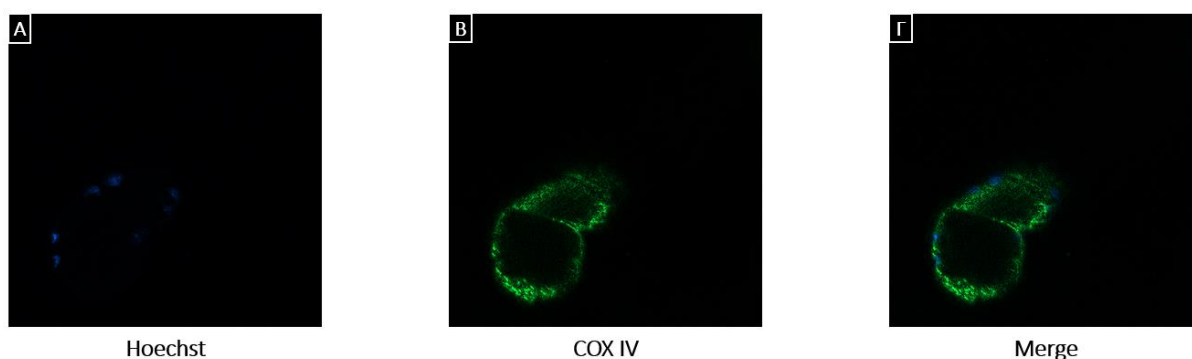


Εικόνα 16: Δείγμα control για τον έλεγχο ύπαρξης μη-ειδικού σήματος, μετά από Blocking μίας ώρας με 10% FBS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst 33342. (B) Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *a-rabbit* Alexa Fluor 488. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.

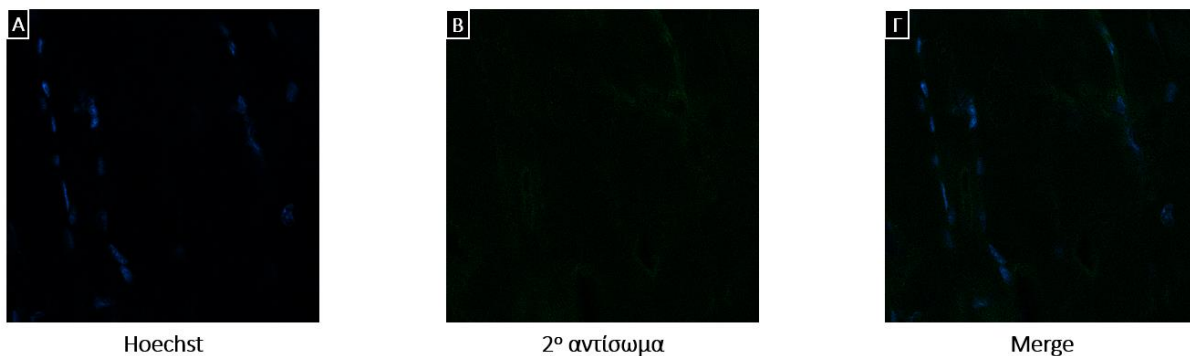
4.5. Εντόπιση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού

Η παρατήρηση των τομών σκελετικού μυός του ποντικού μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο και οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν σε μεγέθυνση φακού 40x. Στην εικόνα 17(B) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα τα μιτοχόνδρια, έπειτα από επώαση με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για το μόριο COX IV, και στη συνέχεια δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Χαρακτηριστικό στην εικόνα των μιτοχονδρίων είναι η κοκκιώδης εμφάνισή τους. Στην εικόνα 17(Γ) έχουμε τη συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων, όπου παρατηρούμε ότι το πράσινο σήμα είναι ειδικό, περιμετρικά των πυρήνων, υποδηλώνοντας έτσι τη σωστή εντόπιση των μιτοχονδρίων.

Στην εικόνα 18, παρατίθεται το αντίστοιχο δείγμα control, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την χρωστική Hoechst 33342. Δεν φαίνεται μη-ειδικό σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα, επομένως το σήμα που παρατηρούμε στην εικόνα 17 είναι ειδικό και αντιστοιχεί πράγματι στα μιτοχόνδρια του μυϊκού ιστού.



Εικόνα 17: Οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού, μετά από *Blocking* μίας ώρας με 10% NMS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική *Hoechst* 33342. (B) Εντόπιση των μιτοχονδρίων μετά από επώαση με πολυκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι του COX IV και δευτερογενές αντίσωμα *α-rabbit* Alexa Fluor 488. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.

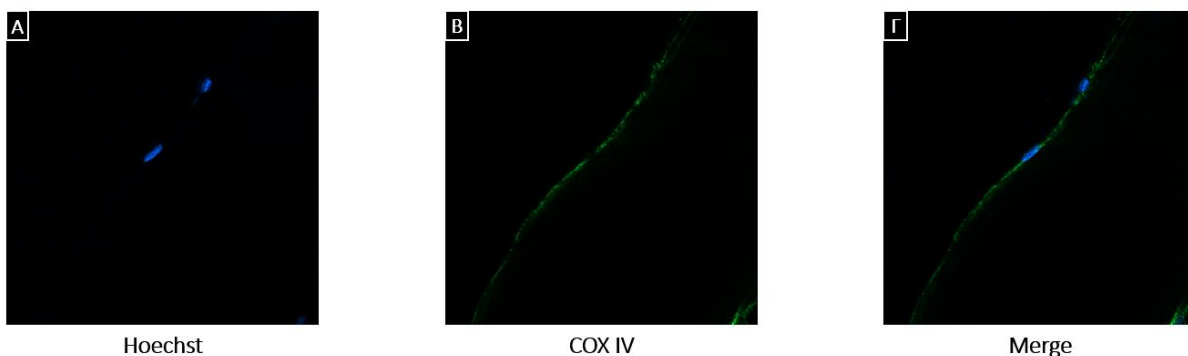


Εικόνα 18: Δείγμα control για τον έλεγχο ύπαρξης μη-ειδικού σήματος, μετά από Blocking μίας ώρας με 10% NMS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst 33342. (B) Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *a-rabbit Alexa Fluor 488*. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.

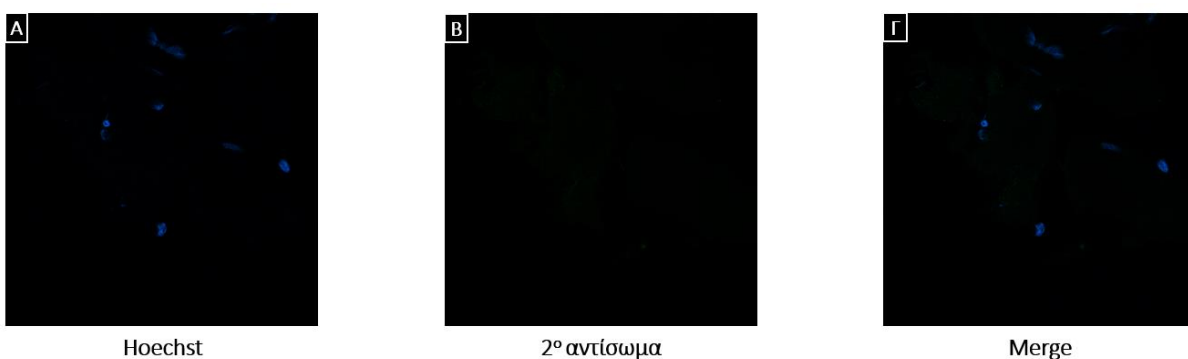
4.6. Εντόπιση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου

Η παρατήρηση των τομών σκελετικού μυός του χοίρου μετά την ανοσοϊστοχημεία έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο και οι παρακάτω εικόνες λήφθηκαν σε εστίαση 40x. Στην εικόνα 19(B) απεικονίζονται με πράσινο χρώμα τα μιτοχόνδρια, έπειτα από επώαση με πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για το μόριο COX IV, και στη συνέχεια δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488. Χαρακτηριστική και σε αυτήν την εικόνα είναι η κοκκώδης εμφάνιση των μιτοχονδρίων, τα οποία εντοπίζονται περιμετρικά των πυρήνων, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα 19(Γ).

Στην εικόνα 20, παρατίθεται το αντίστοιχο δείγμα control, στο οποίο πραγματοποιήθηκε επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με την φθορίζουσα χρωστική Alexa Fluor 488 και την χρωστική Hoechst 33342. Δεν φαίνεται μη-ειδικό σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα, επομένως το σήμα που παρατηρούμε στην εικόνα 19 είναι ειδικό και αντιστοιχεί πράγματι στα μιτοχόνδρια του μυϊκού ιστού.



Εικόνα 19: Οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων σε διαδοχικές τομές πάχους 6 μm σκελετικού μυϊκού ιστού χοίρου, μετά από *Blocking* μίας ώρας με 10% FBS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική *Hoechst 33342*. (B) Εντόπιση των μιτοχονδρίων μετά από επώαση με πολυκλωνικό πρωτογενές αντίσωμα έναντι του *COX IV* και δευτερογενές αντίσωμα *α-rabbit Alexa Fluor 488*. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.



Εικόνα 20: Δείγμα *control* για τον έλεγχο ύπαρξης μη-ειδικού σήματος, μετά από *Blocking* μίας ώρας με 10% FBS. (A) Απεικόνιση των πυρήνων με τη χρωστική *Hoechst 33342*. (B) Επώαση μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα *α-rabbit Alexa Fluor 488*. (Γ) Συγχώνευση των δύο προηγούμενων εικόνων.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών και συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός, η ομοιόσταση, η κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και ανάπτυξη. Ακόμη, επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα, την καρδιαγγειακή λειτουργία, τη διάθεση και τις γνωστικές λειτουργίες, αλλά και στην αναπαραγωγή. Το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές στον οργανισμό είναι η κορτιζόλη. Οι δράσεις τους διαμεσολαβούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), ο οποίος ανήκει στην υπερ-οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών κωδικοποιείται από το γονίδιο *NR3C1* και το εναλλακτικό μάτισμα του μεταγράφου οδηγεί σε δύο ομόλογες ισομορφές, GRα και GRβ. Ο GRα αποτελεί τη μεταγραφικά ενεργή ισομορφή, και, έπειτα από τη σύνδεση ενδογενών και συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του. Αντίθετα, η ισομορφή GRβ δεν φαίνεται να δεσμεύει ενδογενή γλυκοκορτικοειδή και αποτελεί τη μεταγραφικά ανενεργή ισομορφή. Μια τρίτη ισομορφή, GRγ, προκύπτει από εναλλακτική θέση ματίσματος και φαίνεται να σχετίζεται με τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβεί στη δράση των γλυκοκορτικοειδών μέσω γενωμικών και μη-γενωμικών μηχανισμών δράσης.

Μελέτες γύρω από τον GR και τις δράσεις του έδειξαν την μετατόπιση του GR και στα μιτοχόνδρια υπό συγκεκριμένες συνθήκες, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων γονιδίων. Η έκφραση των γονιδίων-στόχων ελέγχει τη ρύθμιση του μεταβολισμού και την παραγωγή ενζύμων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση για την παραγωγή ενέργειας. Ταυτόχρονα, κωδικοποιούνται ρυθμιστές της απόπτωσης και του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τα μιτοχόνδρια.

Οι μεταβολικές δράσεις που ασκούν τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των θηλαστικών κάτω από στρεσογόνες καταστάσεις. Στους σκελετικούς μύες η κορτιζόλη διεγείρει την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και ταυτόχρονα μειώνει την πρωτεϊνοσύνθεση, παρέχοντας έτσι υποστρώματα για την ηπατική γλυκονεογένεση. Με αυτόν τον τρόπο, οι σκελετικοί μύες συμμετέχουν στην αναπλήρωση των αποθεμάτων

γλυκογόνου στο ήπαρ και επομένως στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης, συμβάλλοντας έτσι στην ομοιόσταση του οργανισμού.

Οι σκελετικοί μύες αποτελούνται από εκατοντάδες μυϊκές ίνες, οι οποίες μάλιστα παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά, επιτρέποντας έτσι στους μύες μια μεγάλη ποικιλία κινήσεων. Πιο συγκεκριμένα, με βάση την ταχύτητα συστολής τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε μυϊκές ίνες τύπου I (βραδείες) και τύπου II (ταχείες). Επίσης, διαφέρουν ως προς τη δομή του μορίου της μυοσίνης που περιέχουν, καθώς εκφράζουν διαφορετικές ισομορφές της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης. Με βάση αυτό το χαρακτηριστικό, οι μυϊκές ίνες τύπου II διακρίνονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες, τις μυϊκές ίνες τύπου IIA, IIX και IIB. Τέλος, διαφέρουν ως προς τη μεταβολική οδό που χρησιμοποιούν για να παράγουν ενέργεια, και έτσι ταξινομούνται σε οξειδωτικές και γλυκολυτικές.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, έγινε προσπάθεια υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα GR σε κύτταρα σκελετικών μυών από ποντικό και χοίρο. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του τύπου των σκελετικών μυϊκών ινών, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν υπάρχει κάποιο διαφορετικό πρότυπο κατανομής του υποδοχέα στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών. Ακόμη, γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι ο GR μετατοπίζεται και στα μιτοχόνδρια όπου συμμετέχει σε διάφορες διαδικασίες, σκοπός μας ήταν να οπτικοποιήσουμε τα οργανίδια αυτά σε τομές σκελετικού μυϊκού ιστού, ώστε να ελέγξουμε την πιθανή παρουσία GR και στα οργανίδια αυτά. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε σκελετικούς μύες από ποντικό και χοίρο, έτσι ώστε να έχουμε και μία συγκριτική εικόνα των αποτελεσμάτων σε αυτούς τους δύο διαφορετικούς ιστούς. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν την ιστοχημική χρώση (και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Sakkas 2003) για το διαχωρισμό των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών στον ιστό σκελετικού μύος και στα δύο είδη. Επιπλέον, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας ελέγξαμε την υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στις μυϊκές ίνες από μοιρό ποντικού και χοίρου. Για την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε επίσης η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας, χρησιμοποιώντας το μόριο-δείκτη COX IV, το οποίο εντοπίζεται ειδικά και μόνο στα οργανίδια αυτά.

Από τα αποτελέσματα, συμπεραίνουμε καταρχήν ότι ο τρόπος μονιμοποίησης του δείγματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ποιότητα της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης,

καθώς διαφορετικός τρόπος μονιμοποίησης αποδείχτηκε καλύτερος στην περίπτωση του ποντικού και διαφορετικός στην περίπτωση του χοίρου. Ακόμη, ο συνεντοπισμός του υποδοχέα GR στους πυρήνες καθώς και ο εντοπισμός του περιμετρικά των πυρήνων, στο κυτταρόπλασμα, φαίνεται να αποτελούν αναμενόμενα αποτελέσματα, καθώς γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία για την παρουσία του υποδοχέα τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στον πυρήνα. Επιπλέον, με την βοήθεια του COX IV, που αποτελεί μόριο-δείκτη για τον εντοπισμό των μιτοχονδρίων, φαίνεται πως ο υποδοχέας GR δεν εντοπίζεται στα οργανίδια αυτά, τουλάχιστον στη συγκεκριμένη συνθήκη μελέτης των σκελετικών μυϊκών ιστών και των δύο ειδών. Ωστόσο, η απεικόνιση των μιτοχονδρίων στους σκελετικούς μυϊκούς ιστούς ποντικού και χοίρου μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο σε μελλοντικές μελέτες, υπό συνθήκες στις οποίες ενεργοποιείται η μετακίνηση του GR στα μιτοχόνδρια.

Όσον αφορά την ιστολογική χρώση των τομών σκελετικού μυός, επιβεβαιώνουμε αρχικά το γεγονός ότι οι σκελετικοί μύες αποτελούνται από διαφορετικού τύπου μυϊκές ίνες, οι οποίες παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τα μεταβολικά τους χαρακτηριστικά, καθώς παρατηρούμε σχετικές διαβαθμίσεις κατά μήκος όλης της τομής. Οι διαφορετικοί τύποι μυϊκών ινών επιτρέπουν στους σκελετικούς μυς μία μεγάλη ποικιλία κινήσεων. Επιπλέον, από το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε (Sakkas 2003) για το διαχωρισμό του τύπου των μυϊκών ινών, φαίνεται ότι στις τομές σκελετικού μυός του ποντικού διακρίνουμε το αναμενόμενο πρότυπο ιστολογικής χρώσης των μυϊκών ινών και αποτυπώνονται και οι τρεις κατηγορίες με μεγάλη ευκρίνεια (τύπος I, IIA και IIX). Ωστόσο, στις τομές σκελετικού μυός του χοίρου παρατηρούμε ότι οι μυϊκές ίνες τύπου IIA και IIX εμφανίζονται σχεδόν με το ίδιο χρώμα (γκρι) και δεν υπάρχει σε μεγάλο βαθμό η σχετική διαβάθμιση χρώματος που παρατηρείται στις αντίστοιχες μυϊκές ίνες του ποντικού. Συνεπώς, μελλοντικά η αλλαγή κάποιων παραμέτρων φαίνεται να είναι χρήσιμη, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί το πρότυπο χρώσης των μυϊκών ινών σε ιστούς σκελετικών μυών διαφορετικών ειδών.

Συμπερασματικά λοιπόν από τα παραπάνω πειράματα, και εφόσον οι τομές σκελετικού μυϊκού ιστού ποντικού και χοίρου που έχουμε πάρει είναι διαδοχικές, δεν φαίνεται να παρατηρούμε κάποιο διαφορετικό πρότυπο κατανομής του υποδοχέα GR στις διαφορετικές μυϊκές ίνες, στη συνθήκη όπου αυτές εξετάστηκαν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Beck Ilse M, De Bosscher Karolien, Haegeman Guy (2011). Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 22, Issue 8, 295-310. doi:10.1016/j.tem.2011.03.009
- Caratti Giorgio, Matthews Laura, Poolman Toryn, Kershaw Stephen, Matthew Baxter and David Ray (2015). Glucocorticoid receptor function in health and disease. *Clinical Endocrinology*, 83, 441-448. doi: 10.1111/cen.12728
- Chazotte Brad (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. doi:10.1101/pdb.prot5557
- Čikoš Štefan, Babelová Janka, Špírková Alexandra, Burkuš Ján, Kovaříková Veronika, Šefčíková Zuzana, Fabian Dušan, Koppel Juraj (2019). Glucocorticoid receptor isoforms and effects of glucocorticoids in ovulated mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 100(2):351-364. doi: 10.1093/biolre/i0y196
- Druker J, Liberman AC, Antunica-Noguerol M, Gerez J, Paez-Pereda M, Rein T, Iñiguez-Lluhí J.A, Holsboer F, Arzt E (2013). RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol Cell Biology*, 3(11):2116-2127. doi: 10.1128/MCB.01470-12
- Fitts Robert H. (2008). The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology*, 104: 551-558. doi:10.1152/jappphysiol.01200.2007
- Gallier-Beckley Amy J, Cidlowski John A (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life*, 61(10):979-86. doi: 10.1002/iub.245
- Grimaldi Marina, Boulahtouf Abdelhay, Delfosse Vanessa, Thouennon Erwan, Bourguet William, Patrick Balaguer (2015). Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Frontiers in Endocrinology*, 11;6:62. doi: 10.3389/fendo.2015.00062
- Hammond Geoffrey L (2016). Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *The Journal of Endocrinology*, 230(1): R13-R25. doi: 10.1530/JOE-16-0070
- Hannibal Kara E, Bishop Mark D. (2014). Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. *Physical therapy*, 94(12): 1816-1825. doi: 10.2522/ptj.20130597
- Hollenberg S M, Weinberger C, Ong E S, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson E B, Rosenfeld M G, Evans R M (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318(6047):635-41. doi: 10.1038/318635a0
- Hudson William H., Youn Christine, Ortlund Eric A. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(1): 53-58. doi: 10.1038/nsmb.2456
- Imai Yuuki, Youn Min-Young, Inoue Kazuki, Takada Ichiro, Kouzmenko Alexander, Kato Shigeaki (2013). Nuclear receptors in bone physiology and diseases. *Physiology Reviews*, 93(2):481-523. doi: 10.1152/physrev.00008.2012
- Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *The Journal of experimental medicine*, 203(1):7-13. doi: 10.1084/jem.20050466
- Kadmiel Mahita and Cidlowski John A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 34, Issue 9, 518-530. doi: 10.1016/j.tips.2013.07.003

- Karra Aikaterini G, Sioutopoulou Aikaterini, Gorgogietas Vyron, Samiotaki Martina, Panayotou George, Psarra Anna-Maria G. (2022). Proteomic analysis of the mitochondrial glucocorticoid receptor interacting proteins reveals pyruvate dehydrogenase and mitochondrial 60 kDa heat shock protein as potent binding partners. *Journal of proteomics*, 257:104509. doi: 10.1016/j.jprot.2022.104509
- Kininis Miltiadis, Kraus W. Lee (2008). A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nuclear Receptor Signaling*, 6: e005. doi: 10.1621/nrs.06005
- Kino Tomoshige and Chrousos George P. (2011). Acetylation-mediated Epigenetic Regulation of Glucocorticoid Receptor Activity: Circadian Rhythm-associated Alterations of Glucocorticoid Actions in Target Tissues. *Mol Cell Endocrinology*, 336(1-2): 23–30. doi: 10.1016/j.mce.2010.12.001
- Kokkinopoulou Ioanna and Moutsatsou Paraskevi (2021). Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11): 6054. doi: 10.3390/ijms22116054
- Kumar R, Calhoun WJ. (2008) Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics*, 2(4): 845–854. doi: 10.2147/btt.s3820
- Kuo Taiyi, McQueen Allison, Chen Tzu-Chieh, Wang Jen-Chywan (2015). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol.*, 872: 99–126. doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_5
- Lapp Hannah E, Bartlett Andrew A, and Hunter Richard G (2019). Stress and glucocorticoid receptor regulation of mitochondrial gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, 62:2, R121–R128. doi: 10.1530/JME-18-0152
- Lu Juane, Wu Tao, Zhang Biao, Liu Suke, Song Wenjun, Qiao Jianjun and Ruan Haihua (2021). Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Communication and Signaling*, 19:60 doi: 10.1186/s12964-021-00741-y
- Lu Nick Z, Cidlowski John A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends in Cell Biology*, Vol.16, No.6, 301-307. doi: 10.1016/j.tcb.2006.04.005
- Mitre-Aguilar Irma B, Cabrera-Quintero Alberto J, Zentella-Dehesa Alejandro (2015). Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1): 1–10.
- Morgan David J., Poolman Toryn M., Williamson Andrew J. K., Wang Zichen, Clark Neil R., Ma'ayan Avi, Whetton Anthony D., Brass Andrew, Matthews Laura C. & Ray David W. (2016). Glucocorticoid receptor isoforms direct distinct mitochondrial programs to regulate ATP production. *Scientific Reports*, 6: 26419. doi: 10.1038/srep26419
- Nicolaides Nicolas C., Chrousos George and Kino Tomoshige (2020). Glucocorticoid Receptor. *Endotext*
- Nicolaides Nicolas C., Galata Zoi, Kino Tomoshige, Chrousos George P., and Charmanda Evangelia (2010). The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. *Steroids*, 75(1): 1. doi: 10.1016/j.steroids.2009.09.002
- Oakley RH, Cidlowski JA (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, 132(5): 1033–1044. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007
- Oakley Robert H, Cidlowski John A (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(5):3177-84. doi: 10.1074/jbc.R110.179325
- Porter Baylee A., Ortiz Maria A., Bratslavsky Gennady, and Kotula Leszek (2019). Structure and Function of the Nuclear Receptor Superfamily and Current Targeted Therapies of Prostate Cancer. *Cancers*, 11(12):1852. doi:10.3390/cancers11121852

- Psarra AM, Sekeris CE (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, Vol. 1787, Issue 5, 431-436. doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.011
- Psarra Anna-Maria G., Sekeris Constantine E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life*, 60(4): 210–223. doi.org/10.1002/iub.37
- Ramamoorthy S, Cidlowski JA (2016). Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 42(1):15-31, vii. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002
- Reyer Henry, Ponsuksili Siriluck, Wimmers Klaus, Murani Eduard (2013). Transcript variants of the porcine glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *General and comparative Endocrinology*, 189:127-33. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.04.038
- Sakkas Giorgos K, Ball Derek, Mercer Thomas H, Naish Patrick F (2003). An alternative histochemical method to simultaneously demonstrate muscle nuclei and muscle fibre type. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 89(5), 503-505. doi: 10.1007/s00421-003-0829-z
- Scheschowitsch Karin, Leite Jacqueline Alves, Assreuy Jamil (2017). New Insights in Glucocorticoid Receptor Signaling—More Than Just a Ligand-Binding Receptor. *Frontiers in Endocrinology*, 8:16. doi: 10.3389/fendo.2017.00016
- Sever Richard, Glass Christopher K. (2013). Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Bio*, 5(3): a016709. doi: 10.1101/cshperspect.a016709
- Sherwood Lauralee (2013). Οι περιφερικοί ενδοκρινείς αδένες – Επινεφρίδια. *Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου*, 8^η έκδοση, σελ. 875-876
- Sherwood Lauralee (2013). Φυσιολογία των μυών – Δομή των σκελετικών μυών. *Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου*, 8^η έκδοση, σελ. 330-332 και 355-357
- Sionov Ronit Vogt, Cohen Orly, Kfir Shlomit, Zilberman Yael, Yefenof Eitan (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 203(1): 189–201. doi: 10.1084/jem.20050433
- Spadaro Luisa, Privitera Graziella, Fede Giuseppe, Meli Giovanni, Purrello Francesco (2017). Cortisol as Biomarkers in Cirrhosis. *Biomarkers in Liver Disease*, pp. 387–406. doi: 10.1007/978-94-007-7675-3_39
- Talbot Jared and MavesLisa (2016). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdisciplinary reviews. Developmental Biology*, 5(4):518-534. doi: 10.1002/wdev.230
- Timmermans Steven, Souffriau Jolien and Libert Claude (2019). A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in Immunology*, 10:1545. doi: 10.3389/fimmu.2019.01545
- Uhlenhaut N. Henriette, Barish Grant D., Yu Ruth T., Downes Michael, Karunasiri Malith, Liddle Christopher, Schwalie Petra, Hübner Norbert, Evans Ronald M. (2013). Insights into Negative Regulation by the Glucocorticoid Receptor from Genome-Wide Profiling of Inflammatory Cistromes. *Mol Cell*, 49(1): 158–171. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.013
- Vandevyver Sofie, Dejager Lien, Libert Claude (2014). Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocrine Reviews*, Vol. 35, Issue 4, 671–693. doi: 10.1210/er.2014-1010
- Watson PJ, Fairall L, Schwabe JW (2012). Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. *Mol. Cell Endocrinology*, 348-135(2-3): 440–449. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.033
- Weikum Emily R., Liu Xu and Ortlund Eric A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science*, 27(11): 1876–1892. doi: 10.1002/pro.3496

- Whitcup Scott M, Cidlowski John A, Csaky Karl G, Ambati Jayakrishna (2018). Pharmacology of Corticosteroids for Diabetic Macular Edema. *Investigate Ophthalmology and visual science*, 59(1):1-12. doi: 10.1167/iovs.17-22259
- Yang Chunyan, Li Qianrong and Li Yong (2014). Targeting Nuclear Receptors with Marine Natural Products. *Marine Drugs*, 12(2): 601–635. doi: 10.3390/md12020601
- Zen Margherita, Canova Mariagrazia, Campana Carla, Bettio Silvano, Nalotto Linda, Rampudda Mariaelisa, Ramonda Roberta, Iaccarino Luca, Doria Andrea (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity Reviews*, Vol. 10, Issue 6, 305-310. doi:10.1016/j.autrev.2010.11.009
- Zielińska Karolina A., Van Moortel Laura, Opdenakker Ghislain, De Bosscher Karolien, Van den Steen Philippe E. (2016). Endothelial Response to Glucocorticoids in Inflammatory Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 7: 592. doi: 10.3389/fimmu.2016.00592
- Zong Shuai, Wu Meng, Gu Jinke, Liu Tianya, Guo Runyu & Yang Maojun (2018). Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase. *Cell Research*, 28:1026–1034. doi: 10.1038/s41422-018-0071-1