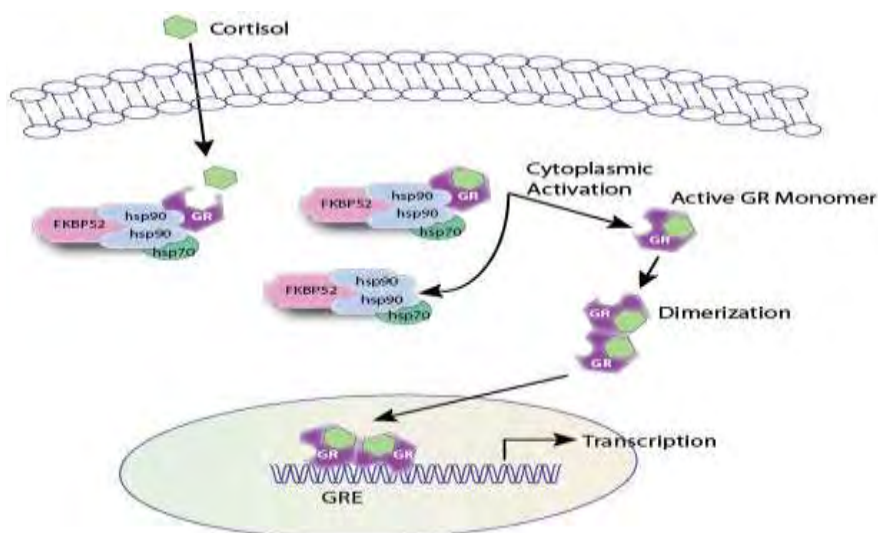




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών  
στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών  
κυττάρων HepG2**



**Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor in cell  
proliferation of hepatocarcinoma HepG2 cells**

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια:** Ψαρρά Άννα-Μαρία

**Επιμέλεια εργασίας:** Κλήμου Ζωή

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

**Δήμας Κωνσταντίνος**, Λέκτορας Τμήματος Ιατρικής, Π.Θ.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την καθηγήτριά μου, κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόησή της, τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο που μου επέτρεψε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και τον κύριο Δήμα Κωνσταντίνο για την άψογη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή και βοήθειά του.

Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερα τις προπτυχιακές φοιτήτριες Αντρούλλα Μηλιώτου και Μαρία Χαραλάμπους και τον υποψήφιο διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα για τη βοήθειά τους, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής Βιοχημείας για την αρμονική συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου προσφέρουν.

# Περιεχόμενα

	<b>Περίληψη</b> .....	6
<b>1.</b>	<b>Εισαγωγή</b> .....	8
<b>1.1</b>	<b>Πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear receptors, NRs)</b> .....	8
1.1.1	Γενικά.....	8
1.1.2	Δομή των πυρηνικών υποδοχέων .....	8
1.1.3	Μηχανισμός δράσης και τύποι των πυρηνικών υποδοχέων .....	10
<b>1.2</b>	<b>Στεροειδείς ορμόνες</b> .....	12
1.2.1	Γενικά.....	14
1.2.2	Τα γλυκοκορτικοειδή .....	12
<b>1.3</b>	<b>Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)</b> .....	14
1.3.1	Γενικά.....	14
1.3.2	Δομή του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (human Glucocorticoid Receptor, hGR) .....	15
1.3.3	Ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) που παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα .....	15
1.3.4	Λειτουργικές περιοχές του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	17
<b>1.4</b>	<b>Μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)</b> .....	22
1.4.1	Γενικά.....	22
1.4.2	Σύνδεση του προσδέτη και αποσύνδεση από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs).....	23
1.4.3	Φωσφορυλίωση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	24
1.4.4	Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.....	25
1.4.5	Διμερισμός και πρόσδεση στο DNA του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	25
1.4.6	Αλληλεπίδραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με ρυθμιστικές περιοχές στο DNA - Ρύθμιση της μεταγραφής .....	26
<b>1.5</b>	<b>Βιολογικές διεργασίες που ελέγχονται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών</b> .....	32
1.5.1	Γενικά.....	32
1.5.2	Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση.....	33
1.5.3	Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.....	34
1.5.4	Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό μεταβολισμό, τη φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα.....	35

<b>1.6</b>	<b>Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor, mtGR)</b> .....	36
1.6.1	Γενικά.....	36
1.6.2	Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη μεταγραφή των μιτοχονδρίων και το συντονισμό της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) .....	37
1.6.3	Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση .....	40
<b>1.7</b>	<b>Καρκίνος</b> .....	41
1.7.1	Γενικά.....	41
1.7.2	Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	42
1.7.3	Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων.....	43
1.7.4	Ρόλος του ενζύμου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH) στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων .....	45
1.7.5	Ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός σε καρκινικά κύτταρα .....	46
<b>2.</b>	<b>Σκοπός</b> .....	47
<b>3.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	49
<b>3.1</b>	<b>Υλικά</b> .....	49
3.1.1	Διαλύματα .....	49
3.1.2	Χημικά .....	57
3.1.3	Αντισώματα.....	58
3.1.4	Κυτταρικές σειρές.....	59
3.1.5	Όργανα .....	58
<b>3.2</b>	<b>Μέθοδοι</b> .....	62
3.2.1	Διαδικασίες για καλλιέργεια, μέτρηση, επιλογή, συλλογή και λύση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR .....	63
3.2.2	Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford .....	71
3.2.3	Ηλεκτροφόρηση .....	73
3.2.4	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου σε αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (SDS-PAGE) .....	74
3.2.5	Ανοσοανίχνευση κατά Western (Western Blot) .....	81
3.2.6	Εμβολιασμός αρσενικών μυών με κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR για την ανάπτυξη και μέτρηση in vivo αναπτυσσόμενων ηπατοκυτταρικών όγκων.....	85
<b>4.</b>	<b>Αποτελέσματα</b> .....	86
4.1	Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford.....	86
4.2	Μέτρηση του αριθμού και του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR.....	88

4.3	Έλεγχος επιπέδων έκφρασης μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαφορετικές αποικίες κυττάρων HepG2-mtGFPGR με ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	101
4.4	Μέτρηση των in vivo αναπτυσσόμενων όγκων μετά τον εμβολιασμό αρσενικών μυών με κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR.....	102
5.	<b>Συζήτηση</b> .....	103
6.	<b>Βιβλιογραφία</b> .....	108

## Περίληψη

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει και ρυθμίζει ποικιλία φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών και βιολογικών μονοπατιών ασκώντας τη δράση του κυρίως ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας. Μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες στην οποία εμπλέκεται είναι ο έλεγχος του ενεργειακού μεταβολισμού μέσω της επαγωγής ενζύμων της γλυκονεογένεσης, όπως επίσης, και ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των γλυκοκορτικοειδών στην επαγωγή πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν τόσο υπομονάδες ενζύμων OXPHOS όσο και μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες που μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο για την επαγωγή εκεί OXPHOS υπομονάδων που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Πρόσφατα διατυπώθηκε η θεωρία της απευθείας δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην επαγωγή OXPHOS γονιδίων. Αυτό τεκμηριώνεται με την παρουσία των υποδοχέων στα μιτοχόνδρια και των παρόμοιων με τα στοιχεία GREs αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, καθώς και με την ικανότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών να προσδένεται σε αυτές της αλληλουχίες και να ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, βιοσύνθεση OXPHOS και παραγωγή ATP. Έτσι, μέσω της συνδυαστικής δράσης του υποδοχέα στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα, είναι εφικτός ο σχηματισμός των πλήρως ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων που αποτελούνται από μιτοχονδριακά και πυρηνικά κωδικοποιούμενες υπομονάδες, οι οποίες εκφράζονται υπό την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά προκειμένου να πολλαπλασιαστούν, γεγονός που απαιτεί την αυξημένη παραγωγή ενεργειακών μονάδων ATP.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HepG2, κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν σταθερά τη με μιτοχονδριακή στόχευση πράσινη πρωτεΐνη που φθορίζει (HepG2-mtGFP) και κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν σταθερά τη με μιτοχονδριακή στόχευση πράσινη πρωτεΐνη που φθορίζει υβριδοποιημένη με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (HepG2-mtGFPGR). Τα κύτταρα αυτά αξιολογήθηκαν συγκριτικά ως προς το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης έδειξαν ότι τα κύτταρα HepG2-

mtGFPGR πολλαπλασιάζονταν πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου σε καλλιέργεια. Ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού μεταξύ διαφορετικών αποικιών των κυττάρων HepG2-mtGFPGR συσχετίστηκε, επίσης, με τα επίπεδα έκφρασης του μιτοχονδριακά στοχευμένου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στις αποικίες αυτές. Τα κύτταρα με αυξημένα επίπεδα έκφρασης mtGFPGR παρουσίασαν μικρότερο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σχέση με αυτόν των κυττάρων που εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα mtGFPGR. Η συγκριτική ικανότητα των τριών διαφορετικών κυτταρικών τύπων ως προς την ανάπτυξη όγκων *in vivo* ελέγχθηκε, επίσης, μέσω εμβολιασμού αρσενικών μυών με ίσο αριθμό κυττάρων από τον αντίστοιχο τύπο κυττάρων. Σε αντίθεση με τα *in vitro* πειράματα, τα κύτταρα HepG2-mtGFPGR οδήγησαν στην ανάπτυξη μικρότερου αριθμού όγκων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Αυτό υποδεικνύει ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι πιθανό να σχετίζεται με την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε *in vitro* σύστημα κυττάρων, όπου υπάρχει ικανοποιητική διαθεσιμότητα οξυγόνου. Αντίθετα, σε *in vivo* συνθήκες ανάπτυξης όγκων, υπό συνθήκες υποξίας, να οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη όγκων πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της αναπνευστικής αλυσίδας και του αερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να επιδιορθώνονται διαταραχές του ενεργειακού μεταβολισμού, τύπου Warburg, που εμφανίζονται σε καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας το μεταβολισμό του κυττάρου σε συνθήκες αξιοποίησης της γλυκόζης για την παραγωγή μέγιστης ενέργειας μέσω ενεργοποίησης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης της αναπνευστικής αλυσίδας και όχι μέσω της γλυκολυτικής πορείας που σκοπό έχει την παράλληλη εξασφάλιση πρόδρομων βιοσυνθετικών μορίων, που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη όγκων.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs)

### 1.1.1 Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες μεταγραφικών ρυθμιστών στα ζώα (μετάζωα). Ρυθμίζουν ποικίλες λειτουργίες, όπως την ομοιόσταση, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό (Laudet et al, 2002). Οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από τον προσδέτη, και έτσι παρέχουν μια άμεση σύνδεση μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες και των μεταγραφικών αποκρίσεων. Έχει προσδιοριστεί ένας μεγάλος αριθμός πυρηνικών υποδοχέων μέσω της ομοιότητας ακολουθίας με γνωστούς υποδοχείς, αλλά δεν έχουν εντοπιστεί οι φυσικοί προσδέτες τους, και για αυτό αναφέρονται ως «ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς». Η αναζήτηση των προσδετών των ορφανών υποδοχέων, καθώς και η ταυτοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που αυτοί ενεργοποιούν έχει γίνει ένα πολύ ενεργό πεδίο έρευνας (Gustafsson, 1999; Kliewer et al., 1999).

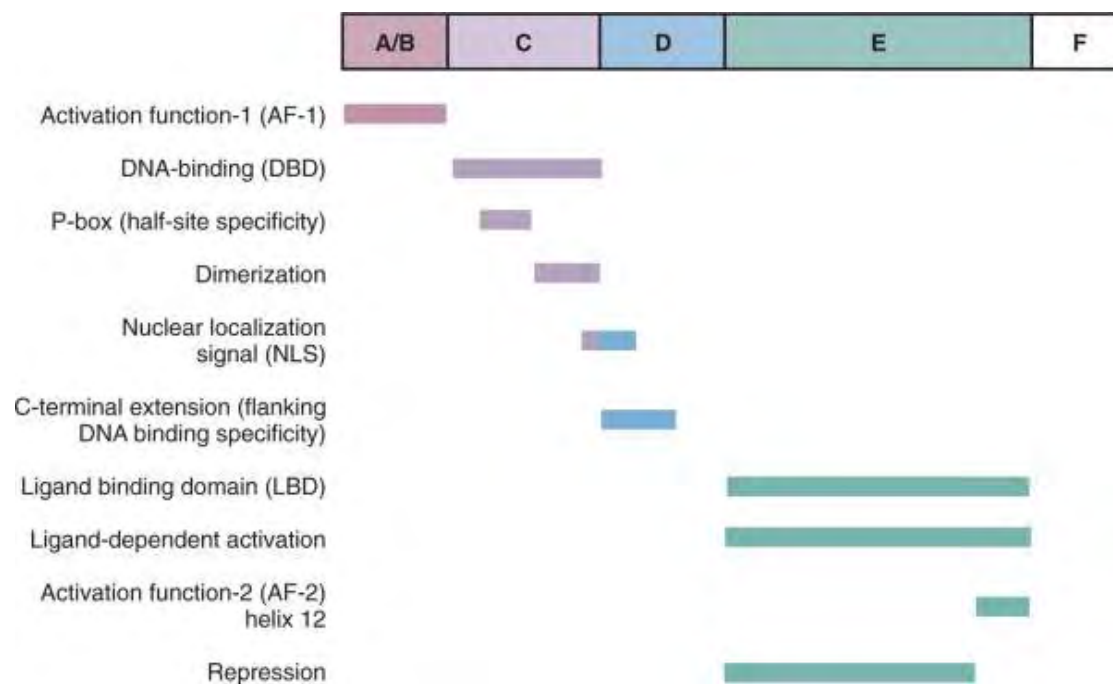
### 1.1.2 Δομή των πυρηνικών υποδοχέων

Ένα τυπικός πυρηνικός υποδοχέας αποτελείται από μια μεταβλητή αμινο (N)-τελική περιοχή (A/B περιοχή) και μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD, ή περιοχή C) (Tata, 2002; Robinson-Rechavi et al, 2003; Bain et al., 2006). Η περιοχή DBD περιέχει ένα P-box, ένα μικρό μοτίβο υπεύθυνο για την εξειδίκευση δέσμευσης στο DNA, που συμμετέχει στο διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού τόσο των ετεροδιμερών όσο και των ομοδιμερών. Η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της περιοχής DBD αποκάλυψε την παρουσία δύο μοτίβων δακτύλου ψευδαργύρου (zinc fingers).

Μια περιοχή σύνδεσης, γνωστή ως D, βρίσκεται μεταξύ των περιοχών DBD και σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD). Αυτή η περιοχή



λειτουργεί ως μια ευέλικτη άρθρωση και περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Φωσφορυλίωση της περιοχής αυτής συνδυάζεται με αυξημένη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD ή περιοχή E) είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση του συγγενούς προσδέτη ή των ορμονών. Αυτή η περιοχή περιέχει, επίσης, μια προσδετο-εξαρτώμενη λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (Activation-Fuction 2, AF-2) που απαιτείται για τη στρατολόγηση των μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και τη γενική μηχανή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς περιέχουν μία αμινοξική ακολουθία N-τελικά της περιοχής DBD, στη μεταβλητή περιοχή A/B, η οποία διαθέτει λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (Activation-Fuction 1, AF-1). Σε αντίθεση με τη μέτρια συντηρημένη AF-2, η περιοχή AF-1 δείχνει μικρή συντήρηση μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων της υπερ-οικογένειας και μπορεί να μεσολαβήσει στη διαφορική ρύθμιση του υποκινητή *in vivo*. Η ακολουθία AF-1 λειτουργεί ως ανεξάρτητος από τον προσδέτη μεταγραφικός ενεργοποιητής, αλλά μπορεί, επίσης, να συνεργαστεί λειτουργικά με την AF-2. Εκτός από τις περιοχές που περιγράφηκαν, ορισμένοι υποδοχείς περιέχουν μια υψηλά μεταβλητή καρβοξυ (C)-τελική περιοχή (περιοχή F) άγνωστης λειτουργίας (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Δομή και λειτουργικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων (Lazar, Chapter 4).

### 1.1.3 Μηχανισμός δράσης και τύποι των πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NRs) μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους και την υποκυτταρική τους κατανομή απουσία προσδέτη. Οι μικρές λιπόφιλες ουσίες, όπως οι φυσικές ορμόνες, διαχέονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και δεσμεύονται σε πυρηνικούς υποδοχείς που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (τύπου I) ή στον πυρήνα (τύπου II) του κυττάρου. Αυτό προκαλεί μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία, ανάλογα με την κατηγορία (τύπου I ή II), πυροδοτεί μια σειρά καθοδικών γεγονότων που τελικά οδηγούν στη θετική ή αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ακόμη, δύο πρόσθετες τάξεις υποδοχέων έχουν προσδιοριστεί: οι τύπου III, που είναι μια παραλλαγή των τύπου I, και οι τύπου IV που δεσμεύονται στο DNA ως μονομερή. Κατά συνέπεια, οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να υποδιαιρεθούν στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες (Mangelsdorf et al 1995; Novac et al, 2004).

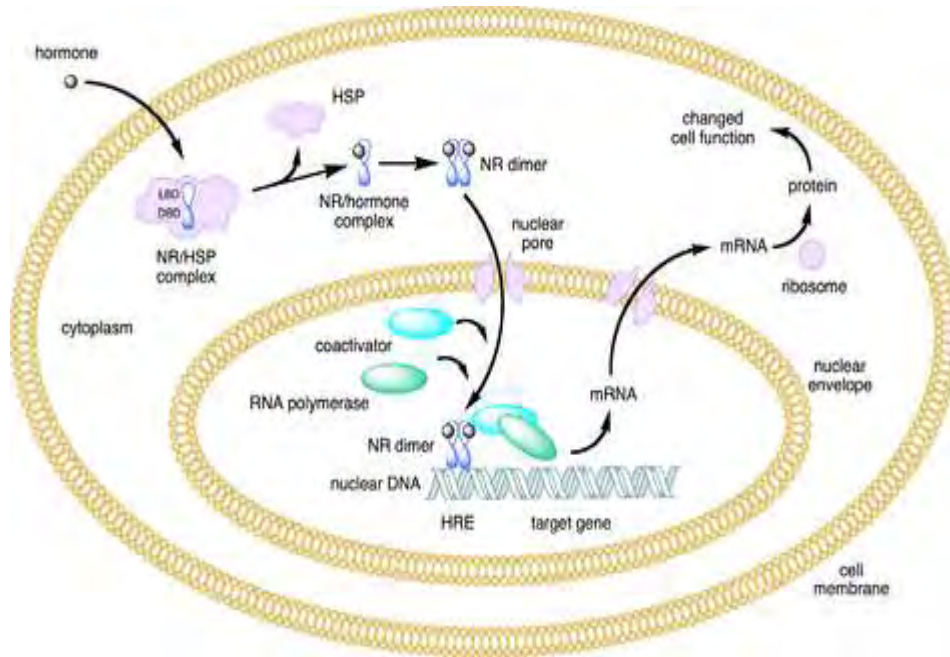
Η σύνδεση του προσδέτη στους πυρηνικούς υποδοχείς **τύπου I** στο κυτταρόπλασμα πυροδοτεί μια σειρά καθοριστικών γεγονότων. Αρχικά, ο υποδοχέας αποσυνδέεται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs), ομοδιμερίζεται, μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και δεσμεύεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements, HREs). Οι τύπου I πυρηνικοί υποδοχείς δεσμεύονται σε HREs που αποτελούνται από δύο μισές αλληλουχίες οι οποίες χωρίζονται από ένα μεταβλητού μήκους DNA, και η δεύτερη μισή αλληλουχία έχει την ανάστροφη ακολουθία της πρώτης (ανεστραμμένη επανάληψη). Οι τύπου I πυρηνικοί υποδοχείς περιλαμβάνουν τα μέλη της υποοικογένειας 3, όπως τον υποδοχέα ανδρογόνων, τους υποδοχείς οιστρογόνων, τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και τους υποδοχείς προγεστερόνης (Εικόνα 2).

Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένοι από τους πυρηνικούς υποδοχείς της υποοικογένειας 2 μπορούν να δεσμευτούν σε ευθεία επανάληψη αντί για ανεστραμμένη των στοιχείων HREs. Το σύμπλοκο υποδοχέα / DNA στρατολογεί άλλες πρωτεΐνες που μεταγράφουν το DNA καθοδικά της ακολουθίας HRE σε mRNA και τελικά σε πρωτεΐνη, η οποία μεταβάλλει τη λειτουργία των κυττάρων.

Οι **τύπου II** πυρηνικοί υποδοχείς περιλαμβάνουν κυρίως μέλη της υποοικογένειας 1, για παράδειγμα, τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος, του ρετινοειδούς X και της ορμόνης του θυρεοειδούς (Klinge et al, 1997).

Οι **τύπου III** πυρηνικοί υποδοχείς (κυρίως της υποοικογένειας 2) είναι παρόμοιοι με τους τύπου I υποδοχείς δεδομένου ότι και οι δύο αυτές κατηγορίες συνδέονται στο DNA ως ομοδιμερή. Ωστόσο, οι τύπου III πυρηνικοί υποδοχείς, σε αντίθεση με τους τύπου I, δεσμεύονται σε ευθείες επαναλήψεις αντί για ανεστραμμένες των στοιχείων HREs.

Οι **τύπου IV** υποδοχείς δεσμεύονται είτε ως μονομερή είτε ως διμερή στο DNA.



Εικόνα. 2. Μηχανισμός δράσης των πυρηνικών υποδοχέων. Απεικονίζεται ο μηχανισμός της κατηγορίας I των πυρηνικών υποδοχέων (NRs), οι οποίοι, απουσία προσδέτη, βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Η δέσμευση της ορμόνης στον υποδοχέα προκαλεί την αποσύνδεση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), το διμερισμό και τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα, όπου συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (HREs). Το σύμπλοκο του πυρηνικού υποδοχέα με το DNA στρατολογεί άλλες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή καθοδικά του DNA σε mRNA, το οποίο τελικά μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και οδηγεί σε αλλαγές στη λειτουργία των κυττάρων (Από Michael C. Scally, Steroid Hormone Receptors and Nuclear Receptors).

## 1.2 Στεροειδείς ορμόνες

### 1.2.1 Γενικά

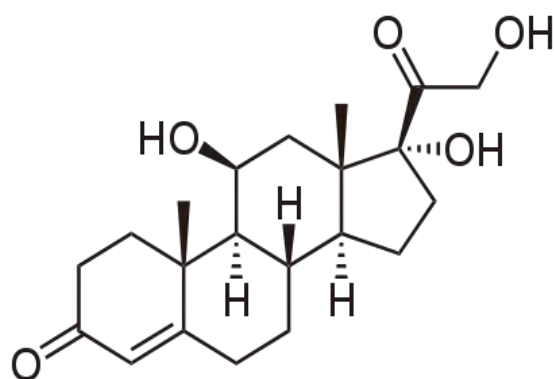
Οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να ταξινομηθούν σε πέντε ομάδες ανάλογα με τους υποδοχείς στους οποίους προσδένονται: γλυκοκορτικοειδή, αλατοκορτικοειδή, ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεσταγόνα. Συμβάλλουν στον έλεγχο του μεταβολισμού, της φλεγμονής, της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, του υδατικού και οσμωτικού ισοζυγίου, της ανάπτυξης των σεξουαλικών χαρακτηριστικών και της ικανότητας αντίστασης σε ασθένειες και τραυματισμούς. Ο όρος περιγράφει τόσο τις ορμόνες που παράγονται φυσιολογικά από το σώμα όσο και τα τεχνητά παραγόμενα φάρμακα που καλύπτουν τη δράση των φυσικών στεροειδών.

Οι φυσικές στεροειδείς ορμόνες συντίθενται από τη χοληστερόλη στις γονάδες και τα επινεφρίδια. Οι ορμόνες αυτές έχουν λιπόφιλο χαρακτήρα και στο αίμα μεταφέρονται συνδεδεμένες με πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη του πλάσματος, η τρανσκορτίνη κ. α. (Ballard, 1979). Με τον τρόπο αυτό φτάνουν στα κύτταρα-στόχους, εισέρχονται σε αυτά πιθανώς με διάχυση, διαπερνώντας την κυτταρική τους μεμβράνη, και, στη συνέχεια, δεσμεύονται με υψηλή χημική συγγένεια στους αντίστοιχους ειδικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Οι υποδοχείς αυτοί μπορεί να είναι πυρηνικοί ή κυτταροπλασματικοί ανάλογα με την ορμόνη, και αυτή η αλληλεπίδραση συμβάλλει στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων, επιφέροντας αλλαγές στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι περαιτέρω μεταβολές και ο καταβολισμός των στεροειδών ορμονών πραγματοποιούνται στο ήπαρ, σε άλλους περιφερειακούς ιστούς, καθώς και στους ιστούς-στόχους.

### 1.2.2 Τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν κύριες στεροειδείς ορμόνες που λειτουργούν σε συνεργασία με τα αλατοκορτικοειδή για να διατηρήσουν την ομοιόσταση του οργανισμού, ελέγχοντας μεταξύ άλλων το μεταβολισμό του γλυκογόνου και τη συγκέντρωση των αλάτων. Συντίθενται και απελευθερώνονται από το φλοιό των επινεφριδίων με την έκκρισή τους να ρυθμίζεται από τον άξονα υποθαλάμου-

υπόφυσης, ενώ η δράση τους επηρεάζει σχεδόν κάθε όργανο και ιστό του σώματος. Γνωστά για τις επιπτώσεις τους στο μεταβολισμό της γλυκόζης, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν, επίσης, πληθώρα βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της λειτουργίας του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος, της σκελετικής ανάπτυξης, της αναπαραγωγής, της γνωστικής λειτουργίας, της συμπεριφοράς, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των κυττάρων σε καλλιέργεια. Λόγω των ισχυρών τους αντι-φλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών τους δράσεων, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή συνταγογραφούνται ευρέως για τη θεραπεία των οξείων και χρόνιων φλεγμονωδών νόσων, αυτοάνοσων νοσημάτων, οργανικής απόρριψης μοσχεύματος, καθώς και κακοηθειών του λεμφικού συστήματος (Rhen et al, 2005).



Εικόνα 3. Χημική δομή της κορτιζόλης, ενός γλυκοκορτικοειδούς.

Τόσο οι φυσιολογικές όσο και οι φαρμακολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα τους (Glucocorticoid Receptor, GR), ένα μέλος της υπερικογένειας των πυρηγικών υποδοχέων των προσδετο-εξαρτώμενων μεταγραφικών παραγόντων (Evans, 1988). Ο υποδοχέας αυτός προέρχεται από ένα και μόνο γονίδιο, και η επικρατούσα παραδοχή από την κλωνοποίηση του το 1985 ήταν ότι ένας μοναδικός πρωτεϊνικός υποδοχέας είναι υπεύθυνος για τις ποικίλες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Αυτό το απλό μοντέλο "ένα γονίδιο-ένας υποδοχέας" έχει αμφισβητηθεί από σχετικά πρόσφατες μελέτες που αποκαλύπτουν μια μεγάλη ομάδα διακριτών, λειτουργικών υποτύπων του GR που προκύπτουν από την εναλλακτική επεξεργασία του γονιδίου του. Με τη σειρά τους, αυτές οι ισομορφές του υποδοχέα υπόκεινται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις που διαμορφώνουν περαιτέρω τη δραστικότητά τους. Τέτοιοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί χρησιμεύουν για την επέκταση του ανθρώπινου πρωτεώματος σε ένα τεράστιο μέγεθος, ίσως αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από το κωδικεύον γονιδίωμα των 25.000 γονιδίων (Nilsen et al, 2010; Walsh et al, 2005).

## **1.3 Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)**

### **1.3.1 Γενικά**

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιείται μετά τη σύνδεση της αντίστοιχης ορμόνης (γλυκοκορτικοειδές). Μαζί με τους υποδοχείς οιστρογόνων, προγεσταγόνων, ανδρογόνων και αλατοκορτικοειδών ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Οι παραπάνω υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία, ιδιαίτερα στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Evans, 1988). Επιπλέον, έχει δειχθεί ομολογία των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών και οιστρογόνων με το προϊόν του ογκογονιδίου v-erb-A του ιού ερυθροβλάστωσης πτηνών (Weinberger et al., 1985; Green et al., 1986), το κυτταρικό ομόλογο (c-erb-A) του οποίου κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της θυροξίνης T<sub>3</sub> (Koenig et al., 1989). Παρόμοια ομολογία διαπιστώθηκε και με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (Giguere et al., 1987). Τα παραπάνω δηλώνουν ότι τόσο οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών όσο και οι υποδοχείς της θυροξίνης, της βιταμίνης D<sub>3</sub> και του ρετινοϊκού οξέος προέρχονται από το ίδιο αρχέγονο πρωτο-ογκογονίδιο και ανήκουν σε μια ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών που αριθμεί περίπου 50 μέλη (Evans, 1988), τα περισσότερα από τα οποία λειτουργούν ως παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής.

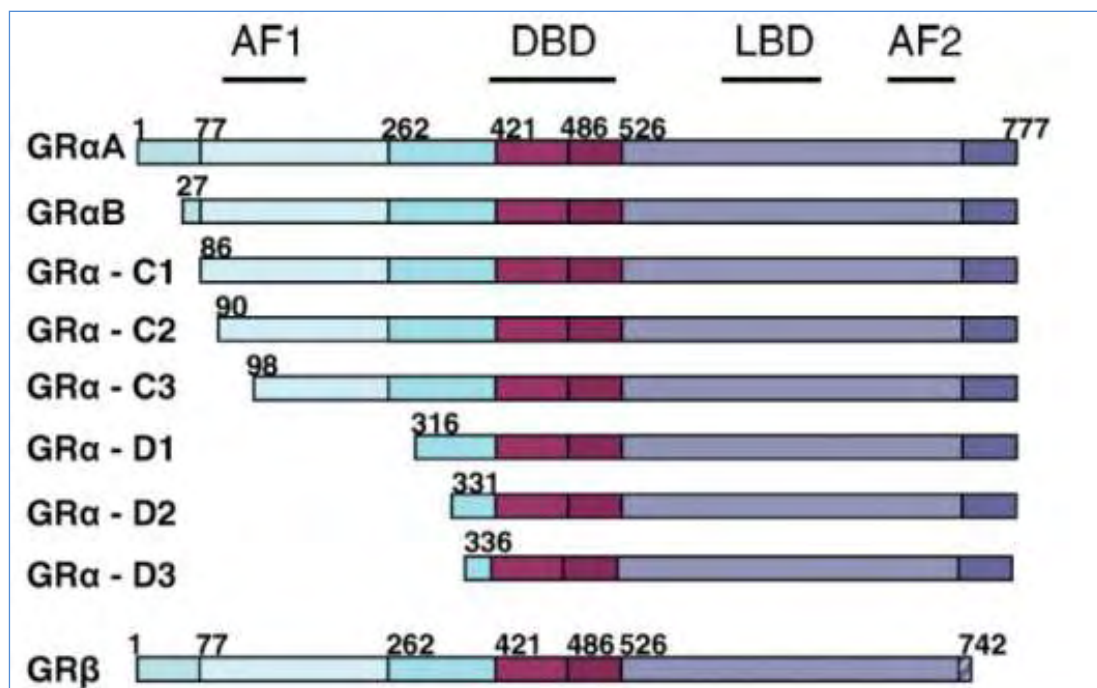
### **1.3.2 Δομή του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (human Glucocorticoid Receptor, hGR)**

Η δομή του γονιδίου του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (human Glucocorticoid Receptor, hGR) προσδιορίστηκε το 1991. Αυτό αποτελείται από 9 εξώνια και βρίσκεται στο χρωμοσωμικό άξονα 5q31-32 (Encio et al, 1991). Η κωδική περιοχή του αποτελείται από τα εξώνια 2-9, ενώ το εξώνιο 1 (184 νουκλεοτίδια) αντιπροσωπεύει την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Το εξώνιο αυτό περιέχει τρεις θέσεις έναρξης της μεταγραφής (υποκινητές 1A, 1B και 1C), καθεμία από τις οποίες παράγει ένα εναλλακτικό πρώτο εξώνιο που συγχωνεύεται με το εξώνιο 2 μετά το μάτισμα (Breslin et al, 2001). Οι τρεις αυτοί υποκινητές ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του γονιδίου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, συμβάλλοντας στην ιστο-ειδική του έκφραση. Δεν περιέχουν κουτί TATA (TATA-box) ή μοτίβο CCAAT, αλλά αντίθετα, διαθέτουν πολλαπλές νησίδες CpG και θέσεις δέσμησης των μεταγραφικών παραγόντων AP1, AP2, SP1, YinYang 1 (YY1), NF-κB και CREB (Nobukuni et al., 1995). Το εξώνιο 2 (1197 bp) περιέχει την αλληλουχία που κωδικοποιεί την περιοχή trans-ενεργοποίησης 1 (Activation-Function 1, AF1), ενώ καθένα από τα εξώνια 3 (167 bp) και 4 (117 bp) περιέχουν την αλληλουχία για το μοτίβο δαχτύλου ψευδαργύρου και σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD). Η περιοχή που περιλαμβάνει τα εξώνια 5-9 κωδικοποιεί την περιοχή trans-ενεργοποίησης 2 (Activation-Function 2, AF2), την εκτεταμένη περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD) και την 3'-αμετάφραστη περιοχή. Το γονίδιο, επίσης, περιέχει δύο κωδικόνια τερματισμού (εξώνια 9α και 9β) τα οποία οδηγούν μετά από εναλλακτικό μάτισμα στην παραγωγή των δύο κύριων ισομορφών του υποδοχέα, της κλασικής GRα και της μη προσδετο-δεσμεύουσας GRβ (αναλυτικά στην παράγραφο 1.3.3). Το cDNA του υποδοχέα GR απομονώθηκε μέσω κλωνοποίησης το 1985 (Weinberger et al., 1985) (Εικόνα 5Α).

### **1.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) που παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα**

Δύο σημαντικές ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών έχουν εντοπιστεί ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος, οι GRα και GRβ (Bamberger et al., 1995; Duma et al., 2006) (Εικόνα 4). Η κλασική ισομορφή GRα αποτελείται από

777 αμινοξέα. Στον GRβ, τα 50 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα του GRα έχουν αντικατασταθεί από 15 άλλα, που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 9β, έχοντας ως αποτέλεσμα μια πρωτεΐνη 742 αμινοξέων. Η GRβ συνδέεται φυσιολογικά με την GRα σχηματίζοντας ετεροδιμερή, παρεμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό μεταγραφικά ενεργών ομοδιμερών GRα. Κάθε GRα ή GRβ mRNA παράγει επιπλέον ισομορφές μέσω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης σε επτά εσωτερικές θέσεις AUG (Lu et al., 2005). Ακόμη, έχουν ανιχνευθεί οκτώ ισομορφές GRα. Όλες τους είναι λειτουργικοί υποδοχείς, καθώς διαθέτουν την περιοχή LBD, και παρουσιάζουν διαφορές στα χαρακτηριστικά της LBD, στην κατανομή τους στους ιστούς, καθώς και στα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Η GRα αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή, GREs), είτε θετικά, επάγοντας τη μεταγραφή, είτε αρνητικά, καταστέλλοντας τη μεταγραφή (Schoneveld et al., 2004). Οι δύο ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι πανομοιότυπες έως το αμινοξύ 727, αλλά στη συνέχεια αποκλίνουν παρουσιάζοντας διαφορές στα C-τελικά τους άκρα.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της δομής των ισομορφών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. (Psarra et al., 2008, IUBMB Life 60, 210-223).



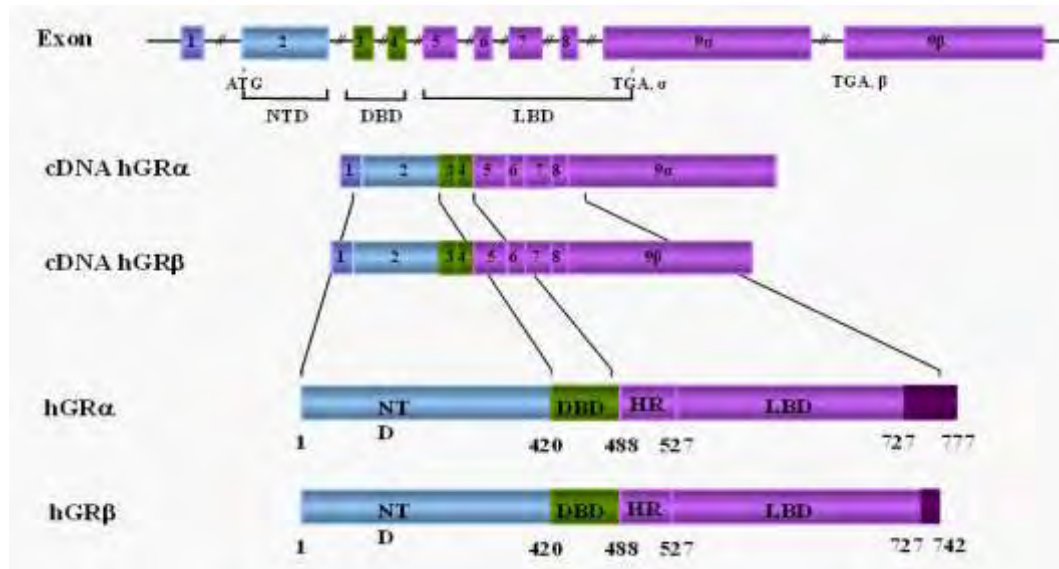
Η ισομορφία GR $\alpha$  εκφράζεται σε σχεδόν όλους τους ανθρώπινους ιστούς και κύτταρα και λειτουργεί ως προσδετο-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας. Η GR $\beta$  εκφράζεται, επίσης, σε μια ποικιλία ανθρώπινων ιστών και κυττάρων, αλλά συνήθως σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από την hGR $\alpha$ . Σε αντίθεση με την τελευταία, η GR $\beta$  ισομορφία εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα των κυττάρων. Επιπλέον, δεν έχει ακόμη αναφερθεί να δεσμεύει τα γλυκοκορτικοειδή και είναι μεταγραφικά ανενεργή (Oakley et al, 1997, 1999). Σε κυτταρικές καλλιέργειες, που υπερεκφράζουν την ισομορφία GR $\beta$ , αυτή δρα ως κυρίαρχος αρνητικός αναστολέας της ενεργοποίησης από την GR $\alpha$  και μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ιστοειδικής ευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή, αφού έχει προσδιοριστεί ως παράγοντας που συμβάλλει στην ιστο-ειδική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις (Hamid et al., 1999; Sousa et al, 2000).

#### **1.3.4 Λειτουργικές περιοχές του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών**

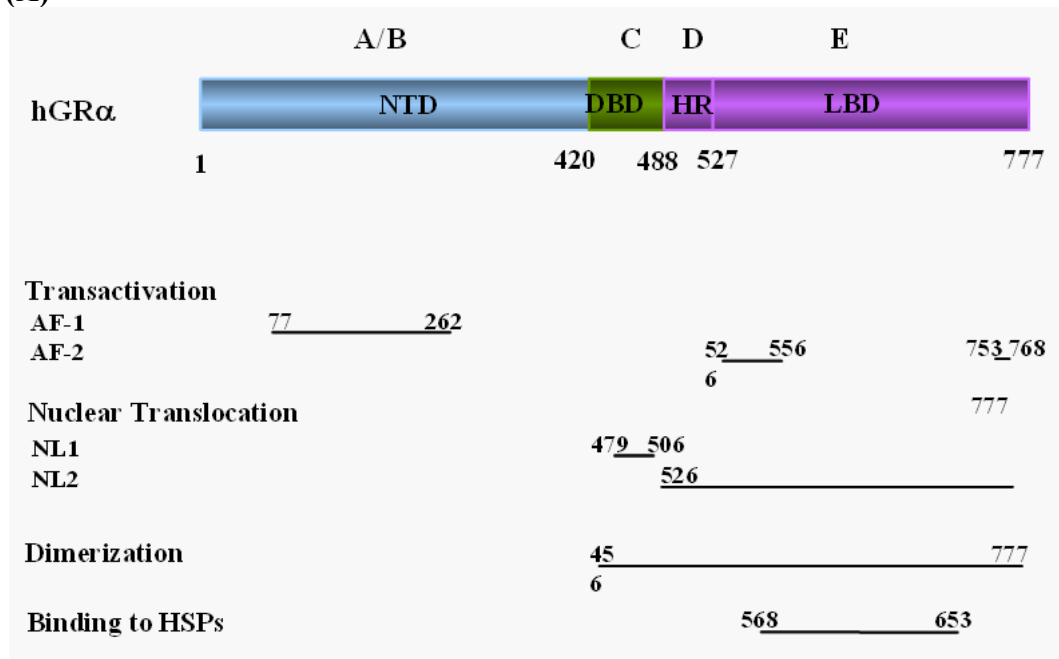
##### **i. Γενικά**

Όπως και άλλα μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι μια αρθρωτή πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις κύριες δομικές και λειτουργικές περιοχές: την αμινο (N)-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal Transactivation Domain, NTD), την κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD) και την καρβοξυ (C)-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD) (Εικ. 5B). Μια ευέλικτη περιοχή του μορίου, που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης (Hinge Region, HR), διαχωρίζει τις περιοχές DBD και LBD. Η DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή σε όλη την υπερικογένεια και περιέχει δύο μοτίβα δαχτύλου ψευδαργύρου (zinc fingers) που αναγνωρίζουν και συνδέονται στις αλληλουχίες-στόχους στο DNA, οι οποίες ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs). Η περιοχή NTD περιέχει μια ισχυρή λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (Activation-Function 1, AF1) και προσδένει διάφορους συν-ρυθμιστές και τα συστατικά της βασικής μεταγραφικής μηχανής. Η περιοχή LBD, που αποτελείται από δώδεκα  $\alpha$ -έλικες και τέσσερα  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα, σχηματίζει μια υδρόφοβη θήκη για τη δέσμευση των

γλυκοκορτικοειδών. Ακόμη, μια δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης (Activation-Function 2, AF2) που αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές μέσω ενός προσδετο-εξαρτώμενου τρόπου είναι ενσωματωμένη στη LBD. Δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Translocation Signal 1, NLS1, και 2, NLS2) εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης της DBD με την περιοχή άρθρωσης και εντός της LBD, αντίστοιχα (Εικόνα 5B).



(A)



(B)

Εικόνα 5. (A) Γονιδιωματικό και συμπληρωματικό DNA (cDNA), πρωτεϊνικές δομές και ισομορφές που παράγονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (hGR). Το γονίδιο hGR αποτελείται από 9 εξόνια. Το εξόνιο 1 αποτελεί

την 5'-αμετάφραστη περιοχή, το εξώνιο 2 κωδικοποιεί την αμινο (N)-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (NTD), τα εξώνια 3 και 4 κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και τα εξώνια 5-9 σχηματίζουν τις περιοχές της άρθρωσης (HR) και της σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Επίσης, το γονίδιο περιέχει δύο κωδικόνια τερματισμού (εξώνια 9α και 9β) τα οποία οδηγούν μετά από εναλλακτικό μάτισμα στην παραγωγή των δύο κύριων ισομορφών του υποδοχέα, της κλασικής GRα και της μη προσδετο-δεσμεύουσας GRβ. (B) Λειτουργικές περιοχές της ισομορφής hGRα (Kino et al, 2010).

## **ii. N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal Transactivation Domain, NTD)**

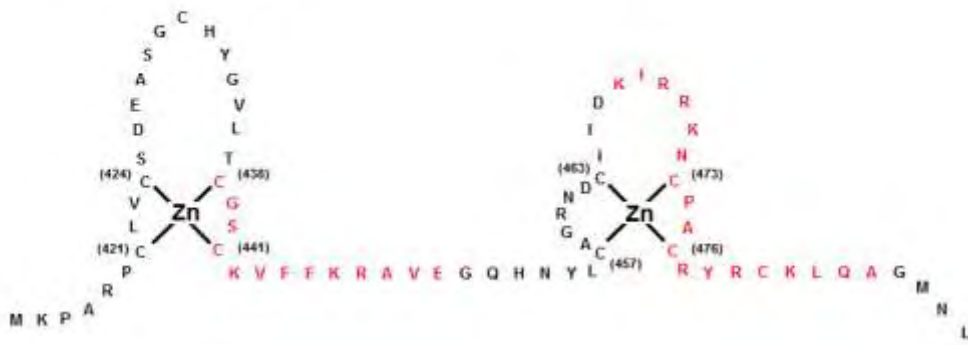
Η περιοχή NTD καταλαμβάνει τα αμινοξέα 1-420 και είναι ελάχιστα συντηρημένη όσον αφορά τόσο το μέγεθος όσο και την αμινοξική αλληλουχία. Αντιπροσωπεύει την πιο μεταβλητή περιοχή μεταξύ των πυρηνικών υποδοχέων ορμονών και διαφέρει ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών ισομορφών του GR (Hollenberg et al., 1988). Η NTD περιέχει την ανεξάρτητη γλυκοκορτικοειδών περιοχή trans-ενεργοποίησης 1 (Activation-Function 1, AF1), η οποία εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 77 και 262 της ισομορφής GRα (Εικόνα 5B). Η περιοχή αυτή περιέχει τέσσερις α-έλικες, και έχει αποδειχθεί να αλληλεπιδρά με μόρια που απαιτούνται για την έναρξη της μεταγραφής, όπως συνενεργοποιητές, τροποποιητές της χρωματίνης και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της RNA πολυμεράσης II, της TATA-δεσμεύουσας πρωτεΐνης (TATA-Binding Protein, TBP) και του συμπλόκου του TFIID (Ford et al, 1997). Έχει προταθεί ότι υπό ειδικές συνθήκες, η περιοχή αυτή σχηματίζει μια διαμόρφωση α-έλικας που είναι σημαντική για την trans-ενεργοποίηση (Kumar et al, 1999).

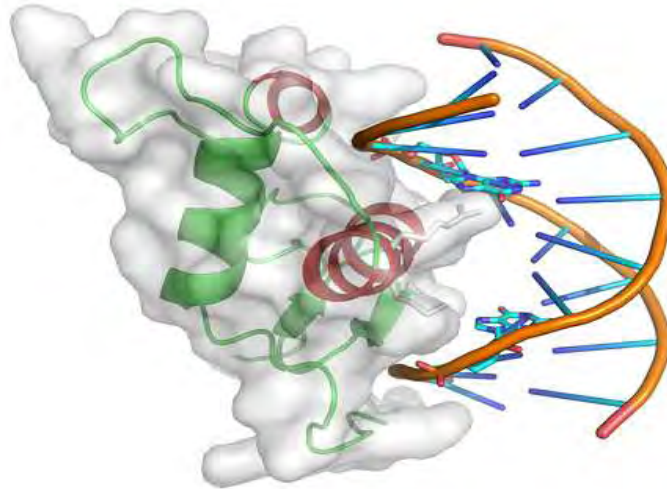
## **iii. Περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD)**

Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) είναι η πιο υψηλά συντηρημένη περιοχή σε ολόκληρη την οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Η DBD της ισομορφής GRα αντιστοιχεί στα αμινοξέα 420-488 και περιλαμβάνει δύο μοτίβα δαχτύλου ψευδαργύρου (Εικόνα 5B). Κάθε ένα από αυτά φέρει στον πυρήνα του ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn) που συγκρατείται από

τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης και ακολουθείται από μια α-έλικα (Εικόνα 6A). Η πρώτη, N-τελική α-έλικα εντοπίζεται στη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA, ενώ το C-τελικό τμήμα κάθε μοτίβου είναι τοποθετημένο πάνω από την μικρή αύλακα (Εικόνα 6B). Εντός του βρόγχου του δακτύλου ψευδαργύρου, τρία αμινοξέα σχηματίζουν το μοτίβο P-box που αλληλεπιδρά με τα στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) στο DNA και εξασφαλίζει την ειδικότητα του υποδοχέα (Umesono et al, 1989). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα GREs με διαφορετικές ακολουθίες επηρεάζουν την τρισδιάστατη δομή της DBD και επάγουν διαφορετικά τη μεταγραφική δραστηριότητα. Επιπλέον, η DBD περιέχει μια περιοχή διμερισμού, D-box, και ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού (Nuclear Translocation Signal 1, NLS1). Η DBD δεν μπορεί να διμεριστεί, αλλά αλληλεπιδρώντας με τα GREs δρα ως ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής παρέχοντας μια μήτρα για τη δέσμευση των υπομονάδων στη σωστή θέση για διμερισμό. Έτσι, η σύνδεση της πρώτης υπομονάδας ευνοεί τη δέσμευση της δεύτερης (Luisi et al, 1991).

A



**B**

Εικόνα 6. Δομή της περιοχής DBD του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και η αλληλεπίδρασή της με τα στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) στο DNA. (A) Δομές δαχτύλων ψευδαργύρου της περιοχής πρόσδεσης στο DNA του hGR. Οκτώ αριθμημένα κατάλοιπα κυστεΐνης χηλικοποιημένα με  $Zn^{2+}$  για το σχηματισμό δύο ξεχωριστών δομών δαχτύλου. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν τις  $\alpha$ -ελικοειδείς δομές. (B) Τρισδιάστατο μοντέλο της φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της περιοχής DBD του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και των GREs στο DNA. Η πρώτη, N-τελική  $\alpha$ -έλικα εντοπίζεται στη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA, ενώ το C-τελικό τμήμα κάθε μοτίβου είναι τοποθετημένο πάνω από την μικρή αύλακα (Kino et al, 2010).

#### **iv. C-τελική περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD)**

Το καρβοξυτελικό άκρο του hGR περιέχει τη μέτρια συντηρημένη περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD) (αμινοξέα 527 έως 777), η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και τη δέσμευση των στεροειδών ορμονών (Εικόνα 5B). Στο πλαίσιο αυτής της περιοχής εντάσσονται, επίσης, μια δεύτερη, αλλά ασθενέστερη περιοχή trans-ενεργοποίησης (Activation-Function 2, AF2) και ένα δεύτερο σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Translocation Signal 2, NLS2) (Caderpond et al, 1992) Το NLS2 έχει προταθεί να είναι ένα αδύναμο σήμα εντοπισμού παρά το γεγονός ότι εντοπίζεται εντός της LBD, χωρίς όμως αυτό να έχει διευκρινιστεί πλήρως. Το καρβοξυτελικό άκρο περιλαμβάνει, ακόμη, σημαντικές

ακολουθίες για την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) και τους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και για τη ρύθμιση της πυρηνικής μετατόπισης και του διμερισμού του υποδοχέα (Picard et al, 1987).

Εκτός από το D-box στην περιοχή DBD, έχει εντοπιστεί μια επιφάνεια διμερισμού στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της ισομορφής hGRα έχει δείξει ότι η περιοχή LBD περιέχει α-έλικες και β-ελάσματα που σχηματίζουν μια υδρόφοβη θήκη και μια επιπρόσθετη πλευρική θήκη. Αυτή η πλευρική θήκη θεωρείται ότι επιτρέπει την επιλεκτική δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών που έχουν μεγαλύτερους υποκαταστάτες στη C17α θέση από άλλα στεροειδή. Μετά τη δέσμευση αυτή, οι έλικες αλλάζουν θέση έτσι ώστε η υδρόφοβη θήκη σύνδεσης του προσδέτη να μεταπέσει από την ανοιχτή στην κλειστή διαμόρφωση. Η νέα διαμόρφωση της LBD σχηματίζει μια επιφάνεια που διευκολύνει τη σύνδεση των συν-ενεργοποιητών. (Bledsoe et al, 2002).

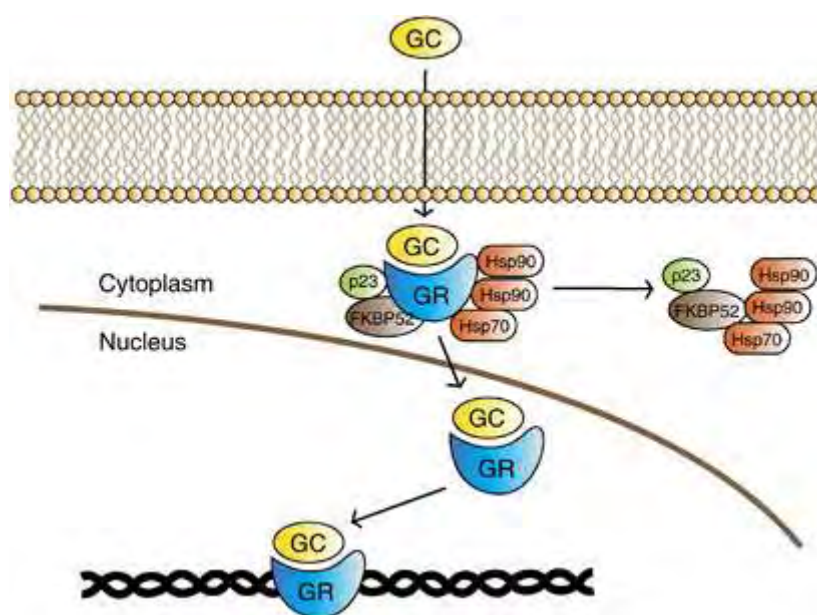
## **1.4 Μονοπάτι σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)**

### **1.4.1 Γενικά**

Οι γλυκοκορτικοειδικές ορμόνες επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές διεργασίες, όπως τη ρύθμιση της γλυκόζης, των πρωτεϊνών, του μεταβολισμού των λιπιδίων κι επιδεικνύουν αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις. Το κλασικό μοντέλο για τη λειτουργία των γλυκοκορτικοειδών βασίζεται στη δέσμευση του διμερούς του υποδοχέα τους (GR) σε στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) που εντοπίζονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων, μεταβάλλοντας, έτσι, την έκφραση των γονιδίων αυτών. Ο υποδοχέας GR εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, και ρυθμίζει μια σειρά γονιδίων που διαφοροποιούνται σε κάθε ιστό. Αυτή η κυτταρο-εξαρτώμενη ρύθμιση οδήγησε σε αναθεώρηση του κλασικού μοντέλου και στην ανακάλυψη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων παραγόντων μεταγραφής μια δεκαετία πριν.

#### 1.4.2 Σύνδεση του προσδέτη και αποσύνδεση από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs)

Απουσία του προσδέτη, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών σχηματίζει ένα ανενεργό, ολιγομερές σύμπλοκο με διάφορες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, από τις οποίες διαχωρίζεται μετά τη σύνδεση του προσδέτη (Pratt et al, 1997, 1998) (Εικόνα 7). Κεντρικό ρόλο σε αυτό το σύμπλοκο παίζει η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Heat Shock Protein 90, HSP90), η οποία συνδέεται με την περιοχή LBD του υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή έχει αποδειχθεί ότι διατηρεί τον υποδοχέα σε μια διαμόρφωση που μπορεί να προσδέσει τα γλυκοκορτικοειδή, αλλά είναι μεταγραφικά ανενεργός (Bresnick et al, 1989; Cadepond et al, 1991). Η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 568 και 659, καθώς και μια αλληλουχία επτά αμινοξέων στο N-τελικό άκρο της περιοχής LBD (547-553), φαίνεται να είναι σημαντικές (Xu et al, 1998; Dalman et al, 1991). Ισοδύναμες περιοχές του hGR εμφανίζονται να αποτελούν τα αμινοξέα 550-641 και 529-535, αλλά οι περιοχές που εμπλέκονται στη δέσμευση της HSP90 δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί. Επιπλέον, οι παράγοντες p60, HSP40, HSP70, η φωσφοπρωτεΐνη p23 και η ανοσοφιλίνη FKBP52 απαιτούνται για τον σχηματισμό του σταθερού συμπλόκου hGR-HSP90. Αρκετές ανοσοφιλίνες, όπως η HSP56, έχουν εντοπιστεί στο ετεροσύμπλοκο, αλλά δεν είναι απαραίτητες για το σχηματισμό του (Tai et al, 1992).



Εικόνα 7. Επισκόπηση του μονοπατιού των γλυκοκορτικοειδών. Η δέσμευση των ορμονών στον ενδοκυτταρικό υποδοχέα τους (GR), οδηγεί σε ενεργοποίηση του συμπλόκου και

αποσύνδεση των ανασταλτικών πρωτεϊνών που συνήθως διατηρούν το GR ανενεργό. Αυτές περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ 90 και 70 (Heat Shock Proteins, HSP90, HSP70), τη φωσφοπρωτεΐνη p23 και την ανοσοφιλίνη FKBP52. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μετατοπίζεται στον πυρήνα και μεταβάλλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Tse et al, 2011).

### **1.4.3 Φωσφορυλίωση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών**

Στην ελεύθερη προσδέτη κατάσταση, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι φωσφορυλιωμένος και υπερ-φωσφορυλιώνεται μετά τη σύνδεση του προσδέτη. Απουσία ορμονών, ο GR είναι κυρίως φωσφορυλιωμένος στο κατάλοιπο Ser στη θέση 203, αλλά μετά την προσθήκη τους προκαλείται φωσφορυλίωσή του εκτός από τη Ser203 και στη Ser211 (Wang et al, 2002). Η φωσφορυλίωση στη Ser211 συμπίπτει με αυξημένη trans-ενεργοποίηση του υποδοχέα, αντικατοπτρίζοντας ενδεχομένως μια μεταβολή της διαμόρφωσής του που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του με συνενεργοποιητές. Ο διαμερισματικός εντοπισμός του GR συμπίπτει με μια τροποποιημένη κατάσταση φωσφορυλίωσής του. Ο υποδοχέας που είναι φωσφορυλιωμένος στη Ser203 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η φωσφορυλίωση στη Ser211 εντοπίζει το GR τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Ο διπλά φωσφορυλιωμένος υποδοχέας πυροδοτεί την ειδική αποφωσφορυλίωσή του στη Ser203 με αποτέλεσμα το σχηματισμό της μονοφωσφορυλιωμένης του μορφής που συσσωρεύεται στον πυρήνα και μπορεί να ασκήσει τη δράση της. Όταν εγκαταλείπει τον πυρήνα, ο GR αποφωσφορυλιώνεται στη Ser211. Σε αυτό το σημείο, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί είτε να ανακυκλωθεί με την πρόσληψή του σε ένα σύμπλοκο συνοδών πρωτεϊνών, το οποίο διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της Ser203, είτε να αποικοδομηθεί.

Η απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες: α) στην πρωτογενή απόκριση, κατά την οποία ο ενεργός υποδοχέας επάγει άμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων μέσω αλληλεπίδρασής του με τις αντίστοιχες ορμονοεξαρτώμενες ρυθμιστικές περιοχές (GREs) που προηγούνται των γονιδίων, και β) στη δευτερογενή απόκριση όπου απαιτείται η de novo σύνθεση πρωτεϊνών (π.χ., μεταγραφικών παραγόντων και συνενεργοποιητών) που υπερεκφράζονται από τα γλυκοκορτικοειδή, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Το γονίδιο της αργινάσης, για παράδειγμα,



στερείται των στοιχείων GREs και, ως εκ τούτου, βασίζεται σε αυτή τη δευτερογενή απόκριση για την επαγωγή της έκφρασής του που εξαρτάται από τις ορμόνες.

#### **1.4.4 Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα**

Η φωσφορυλιωμένη ισομορφή hGR $\alpha$  μετατοπίζεται, στη συνέχεια, στον πυρήνα. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση του υποδοχέα δεν είναι ικανή για τη μετατόπιση αυτή. Δύο περιοχές του hGR έχουν βρεθεί να συμμετέχουν στην πυρηνική μετατόπιση που πραγματοποιείται μετά τη σύνδεση του προσδέτη. Η πρώτη περιοχή, NLS1, εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 479 και 506, που βρίσκονται στο C-τελικό τμήμα της περιοχής DBD και επεκτείνονται στην άρθρωση μεταξύ των περιοχών DBD και LBD (Εικ 5B). Η περιοχή αυτή είναι 100% συντηρημένη μεταξύ των υποδοχέων του αρουραίου και του ανθρώπου (Cadepond et al, 1992; Picard et al, 1987). Η LBD αναστέλλει τη λειτουργία της NLS1, και η αναστολή αυτή μπορεί να καταργηθεί από τη σύνδεση του προσδέτη. Δύο περιοχές φαίνεται να εμπλέκονται στην από LBD-εξαρτώμενη αναστολή και βρίσκονται μεταξύ των αμινοξέων 600-696 και 626-777. Η πρώτη περιοχή δείχνει μικρή ανασταλτική δράση στη λειτουργία της NLS1, αλλά η παρουσία της περιοχής μεταξύ των αμινοξέων 696 και 777 αναστέλλει πλήρως τον πυρηνικό εντοπισμό του ελεύθερου προσδέτη hGR. Η NLS2-διαμεσολαβούμενη πυρηνική μετατόπιση είναι πιο αργή από τη μετατόπιση που μεσολαβείται από τη NLS1, και είναι ορμόνο-εξαρτώμενη (Savory et al, 1999).

#### **1.4.5 Διμερισμός και πρόσδεση στο DNA του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών**

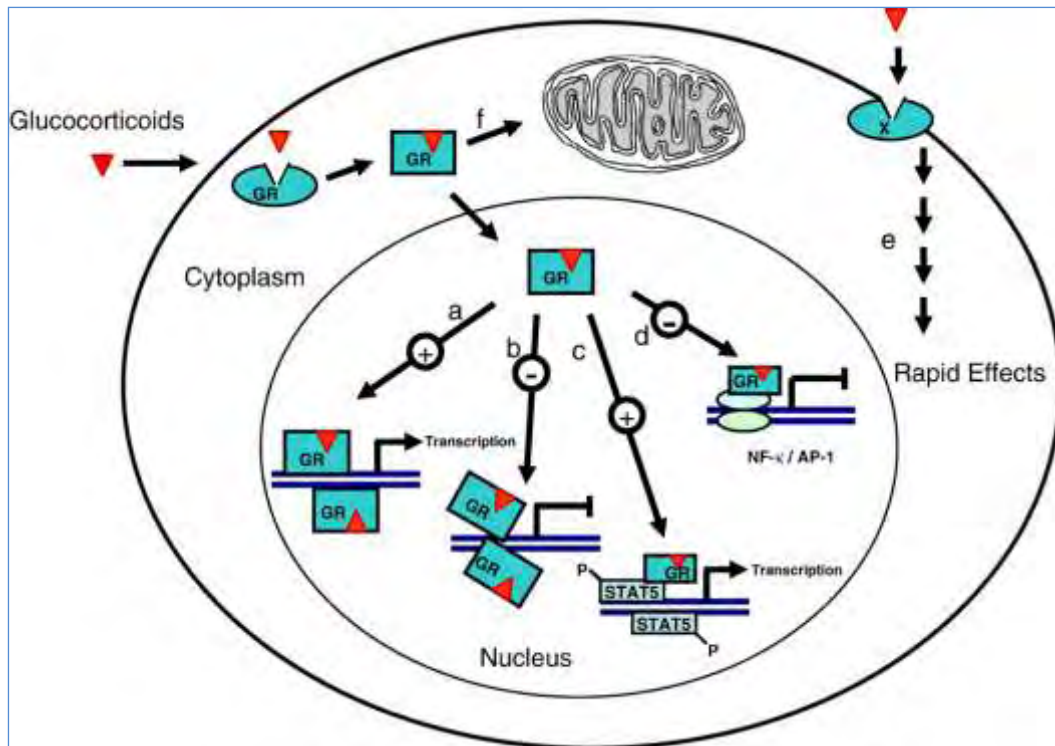
Μετά τη σύνδεση του προσδέτη, η ισομορφή hGR $\alpha$  μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή. Η περιοχή DBD φαίνεται να εμπλέκεται, αλλά και περιοχές εκτός αυτής είναι εξίσου σημαντικές για το διμερισμό. Πιστεύεται ότι ο διμερισμός του πλήρους μήκους υποδοχέα πραγματοποιείται πριν από την πρόσδεση στο DNA, και έχει αποδειχθεί ότι αυτός συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs) ως διμερές (Tsai et al, 1988; Wrange et al, 1989). Μελέτες πρόσδεσης στο DNA της απομονωμένης περιοχής DBD δείχνουν ότι αυτό το τμήμα του hGR μπορεί να διμεριστεί, αλλά αυτό συμβαίνει μετά τη σύνδεση στο DNA. Πολλά αμινοξέα της

περιοχής DBD αλληλεπιδρούν με το DNA, διατηρώντας τον υποδοχέα στη μεγάλη αύλακα της έλικας (Luisi et al, 1991).

#### **1.4.6 Αλληλεπίδραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με ρυθμιστικές περιοχές στο DNA - Ρύθμιση της μεταγραφής**

##### **I. Γενικά**

Μετά από τη σύνδεση του προσδέτη, ο ενεργός υποδοχέας μεταφέρεται στον πυρήνα και σχηματίζοντας ομοδιμερή αλληλεπιδρά με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) στις ρυθμιστικές περιοχές των αποκρινόμενων γονιδίων. Αυτό ξεκινά μια σειρά γεγονότων στα οποία εμπλέκονται διάφορες αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα μεταγραφικοί παράγοντες, συνενεργοποιητές και συγκαταστατολείς, ένζυμα τροποποίησης ιστονών και η βασική μεταγραφική μηχανή, που οδηγούν σε αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, με αποκορύφωμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων (Collingwood et al, 1999). Η ρύθμιση της μεταγραφής μπορεί, επίσης, να επιτευχθεί από την αλληλεπίδραση των υποδοχέων ως μονομερή, όχι άμεσα με το DNA, αλλά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν άμεση πρόσβαση στις αντίστοιχες αλληλουχίες πρόσδεσης στο DNA (Tuckermann et al, 1999). Επιπλέον, οι ορμόνες ασκούν ταχείες, μη γονιδιωματικές επιδράσεις (Losel et al., 2003) μέσω κλασικών υποδοχέων, υποδοχέων συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνες ή άλλων ακόμη άγνωστων μορίων (Scheller et al., 2003; Kino et al., 2005) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή, μέσω της δέσμευσής τους με τους συγγενικούς υποδοχείς και της αλληλεπίδρασής τους με τα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements, HREs), μπορούν είτε (α) να ενεργοποιήσουν είτε (β) να αναστείλουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Μέσω της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, η ορμόνη μπορεί (γ) να ενεργοποιήσει, ή (δ) να σταματήσει τη μεταγραφή. Η ορμόνη μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε ταχείες, μη γονιδιωματικές επιδράσεις (ε) μέσω της κλασικής οδού των μεμβρανικών υποδοχέων, των G-πρωτεϊνών ή μέχρι στιγμής άγνωστων μορίων και μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (στ), το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα, μέσω της αλληλεπίδρασης με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. (Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

Μπορούν να διακριθούν τέσσερις τύποι θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα στο DNA: α) τα απλά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs), β) τα μισά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements half-sites, GRE1/2s), που μπορούν να είναι τόσο απλά όσο και σύνθετα στοιχεία, και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης, γ) τα αρνητικά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (negative Glucocorticoid Response Elements, nGREs) που καταστέλλουν τη γονιδιακή

έκφραση και δ) τα στοιχεία πρόσδεσης απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (tethering Glucocorticoid Response Elements), τα οποία μπορούν τόσο να καταστείλουν όσο και να ενεργοποιήσουν την έκφραση των γονιδίων.

## **II. Απλά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) - Θετική και αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής**

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί να ρυθμίσει θετικά τη μεταγραφή των γονιδίων μέσω της άμεσης σύνδεσής του με τα λεγόμενα απλά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) (Εικόνα 9a). Μετά από τη σύνδεση αυτή, η ενεργοποίηση της μεταγραφής (και επακόλουθη επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης) συμβαίνει μέσω βοηθητικών πρωτεϊνών οι οποίες οδηγούν στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Με χρήση ενός γονιδίου αναφοράς βρέθηκε ότι η επαγωγή από τα γλυκοκορτικοειδή μέσω ενός απλού GRE συμβαίνει όταν αυτό βρίσκεται κοντά στο στοιχείο TATA (Strahle et al., 1988; Pina et al., 1990). Στην περίπτωση επαγωγής ενδογενών γονιδίων που τα GREs βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση από τον ελεγχόμενο υποκινητή φαίνεται να απαιτούνται είτε πολλαπλά GREs εν σειρά είτε απλά GREs μαζί με στοιχεία σύνδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων που, επίσης, εμπλέκονται στη ρύθμιση της βασικής μεταγραφικής μηχανής (Strahle et al., 1988; Schule et al., 1988).

Επιπλέον, μέσω των στοιχείων αυτών ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση μέσω της παρεμβολής του στη δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή του γονιδίου της κολλαγενάσης το οποίο ρυθμίζεται θετικά από τον AP-1 και αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 είναι ετεροδιμερές των προϊόντων των ογκογονιδίων c-fos και c-jun. Η θέση σύνδεσης του AP-1 στο γονίδιο της κολλαγενάσης δεν περιέχει τη θέση σύνδεσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Jonat et al., 1990; Schule et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990). Η κατασταλτική δράση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να εξασκείται μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στην αλληλεπίδραση αυτή συμμετέχουν η περιοχή σύνδεσης στο DNA τόσο του υποδοχέα όσο και της πρωτεΐνης Jun, καθώς και η περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 40-111 της πρωτεΐνης Fos (Yang-Yen et al.,

1990). Ανάλογος, επίσης, είναι ο μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της  $\alpha$ -φετοπρωτεΐνης από τα γλυκοκορτικοειδή (Zhang et al, 1991).

Με βάση την ανάλυση της ακολουθίας των GREs από διάφορους υποκινητές, προσδιορίστηκε μια ακολουθία συναίνεσης. Αυτή αποτελείται από ένα συντηρημένο ολιγονουκλεοτίδιο έξι βάσεων (5'), τρεις μη συντηρημένες βάσεις και άλλο ένα εξανουκλεοτίδιο λιγότερο συντηρημένο (3') (παλίνδρομο 5'-GGTACANNNTGTTCT-3', όπου N οποιαδήποτε βάση) (Nordeen et al, 1990). Το συντηρημένο εξανουκλεοτίδιο παρουσιάζει υψηλό βαθμό ευελιξίας. Η ευελιξία αυτή δεν συνεπάγεται, κατ' ανάγκη, μειωμένη απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή. Ένα μονομερές του GR συνδέεται, αρχικά, με το μη συντηρημένο εξανουκλεοτίδιο (3') και, στη συνέχεια, το συντηρημένο εξανουκλεοτίδιο (5') καταλαμβάνεται από ένα δεύτερο μονομερές για το σχηματισμό ενός διμερούς που δεσμεύεται στο DNA.

### **III. Μονάδες απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Units, GRUs) - Αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής**

Σε μια σειρά γονιδίων, η απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή εξαρτάται μόνο από τη δέσμευση του υποδοχέα σε ένα GRE, αλλά, επιπλέον, απαιτείται η δέσμευση άλλων μεταγραφικών παραγόντων σε παρακείμενες θέσεις πρόσδεσης. Καθώς αυτά τα στοιχεία απόκρισης είναι τόσο χωρικά όσο και λειτουργικά συγκεντρωμένα, αναφέρονται ως μονάδες απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Units, GRUs) (Εικ. 9b). Παρατήρηση της σύνθεσης των διαφορετικών μονάδων απόκρισης έδειξε ότι δεν υπάρχει ένας γενικός κανόνας για το πώς μια ρυθμιστική μονάδα είναι οργανωμένη. Οι μονάδες δεν αποκλίνουν μόνο ως προς την ταυτότητα των προσδεμένων μεταγραφικών παραγόντων, αλλά και ως προς τη σειρά και τον αριθμό των στοιχείων απόκρισης σε κάθε μονάδα, που κυμαίνονται από 4 έως 10.

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μέσω των σύνθετων αυτών στοιχείων μπορεί να παρεμβληθεί στη δράση παρακείμενων μεταγραφικών παραγόντων και να επηρεάσει αρνητικά τη μεταγραφή των γονιδίων που αυτοί ελέγχουν (Εικόνα 9f). Χαρακτηριστική περίπτωση είναι αυτή της ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της προλιφερίνης (Mordacq and Linzer, 1989; Diamond et al., 1990) η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί, να κατασταλεί ή να μείνει ανεπηρέαστη από τα γλυκοκορτικοειδή

ανάλογα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών Jun και Fos. Συγκεκριμένα, αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Fos προκαλεί καταστολή, ενώ αύξηση των επιπέδων της Jun επαγωγή. Στην πρώτη περίπτωση, ο υποδοχέας αλληλεπιδρά με το συνδεδεμένο στο DNA σύμπλοκο Fos/Jun παρεμποδίζοντας τη δράση του στην ενεργοποίηση της μεταγραφής, ενώ στη δεύτερη σχηματίζει μεταγραφικά ενεργό σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Jun η οποία είναι συνδεδεμένη στο DNA ενισχύοντας τη δράση της στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Όλες οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν παράλληλα με τη σύνδεση των διαφόρων παραγόντων σε ένα σύνθετο στοιχείο απόκρισης στο DNA.

#### **IV. Μισά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements half-sites, GRE1/2s)**

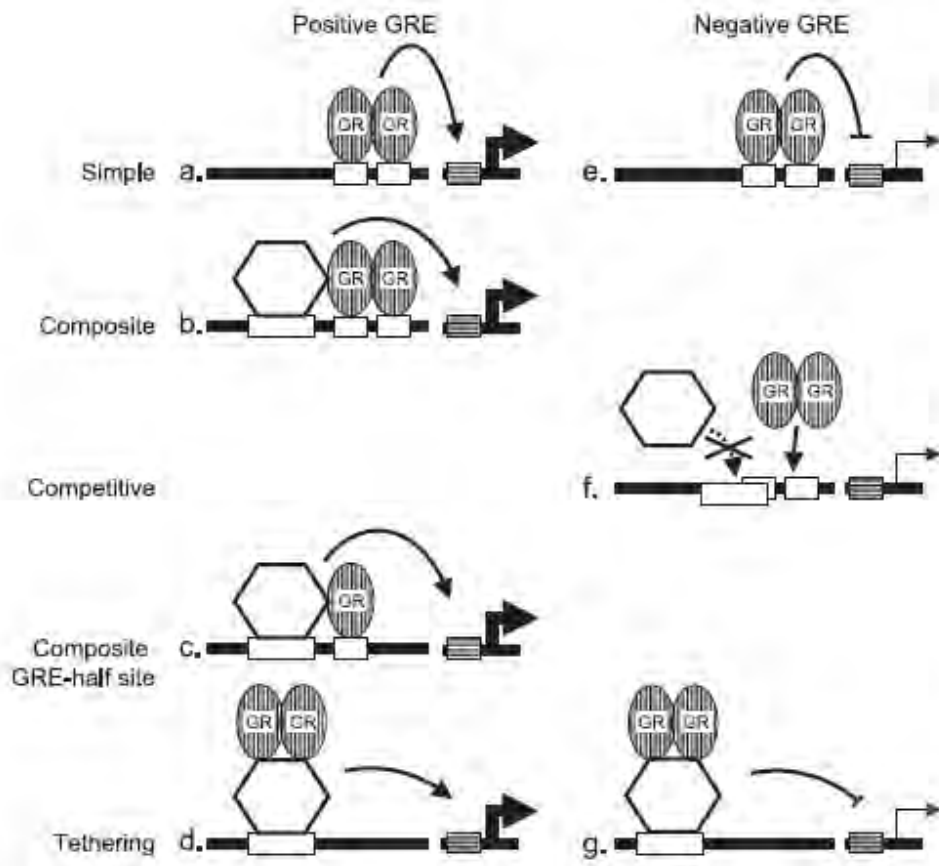
Εκτός της σύνδεσης με τα GREs, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μπορεί, επίσης, να δεσμευτεί στο DNA ως μονομερές στα λεγόμενα μισά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements half-sites, GRE1/2s) (Segard-Maurel et al, 1996). Ωστόσο, μια βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με τα γονίδια που ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή δεν αποκαλύπτει στοιχεία GRE1/2s που να ενεργούν ως απλά στοιχεία ενεργοποίησης της μεταγραφής. Αντίθετα, τα GRE1/2s φαίνεται να απαιτούν πρόσθετα στοιχεία για να μεσολαβήσουν στην απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή (Εικ. 9c). Έτσι, παρόλο που δεν έχουν βρεθεί απλά GRE1/2s σε γονίδια που ρυθμίζονται από γλυκοκορτικοειδή, συνδυασμοί με βοηθητικούς παράγοντες, GREs, ή πρόσθετα GRE1/2s, μπορούν να καταστήσουν ένα γονίδιο επαγόμενο από τα γλυκοκορτικοειδή. Είναι πιθανό ότι λόγω της χαμηλής συγγένειας, το μονομερές του GR δυσκολεύεται να δεσμευθεί στα στοιχεία GRE1/2s. Όταν συνδυάζεται με άλλα στοιχεία απόκρισης, οι συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να διευκολύνουν τη δέσμευση του μονομερούς.

## **V. Αρνητικά στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (negative Glucocorticoid Response Elements, nGREs) - Αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής (Άμεση ορμονοεξαρτώμενη καταστολή)**

Τα στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή που επηρεάζουν αρνητικά την έκφραση των αποκρινόμενων γονιδίων αναφέρονται ως αρνητικά GREs (negative Glucocorticoid Response Elements, nGREs). Σε αυτό το είδος της ρύθμισης, απαιτείται η άμεση δέσμευση του υποδοχέα στο στοιχείο nGRE προκειμένου να μειωθεί η ενεργότητα της βασικής μεταγραφικής μηχανής χωρίς τη συμμετοχή άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Εικ. 9ε). Ένα nGRE, επομένως, έχει μια παρόμοια αλληλουχία αναγνώρισης όπως ένα GRE, αν και η ακολουθία συναίνεσης του είναι πιο μεταβλητή (ATYACnnTnTGATCn) από εκείνη του στοιχείου GRE (Truss et al, 1993). Αν και υπάρχουν ενδείξεις για τη σύνδεση του υποδοχέα στα στοιχεία nGREs με τη μορφή τριμερούς, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται η καταστολή της γονιδιακής έκφρασης δεν είναι γνωστός.

## **VI. Στοιχεία πρόσδεσης απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (tethering Glucocorticoid Response Elements)**

Σε ορισμένα γονίδια, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών δε δεσμεύεται άμεσα στο DNA για να ασκήσει τη δράση του, αλλά στρατολογείται από μεταγραφικούς παράγοντες που είναι προσδεδεδεμένοι στο DNA σε ένα ρυθμιστικό σύμπλοκο. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να συμπεριφέρεται ως ένας προσδετο-επαγώμενος συν-ρυθμιστής που χρησιμοποιεί τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις για να ασκήσει την επίδρασή του. Η επίδραση αυτή μπορεί να είναι τόσο θετική όσο και αρνητική (Εικ. 9d και g).



Εικόνα 9. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με ρυθμιστικά στοιχεία. (Onard et al. 2004).

## 1.5 Βιολογικές διεργασίες που ελέγχονται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

### 1.5.1 Γενικά

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι σημαντικοί ρυθμιστές των βασικότερων κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης και επιβίωσης. Ο μηχανισμός δράσης τους στα κύτταρα-στόχους έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον και είναι σαφές ότι μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους είτε σε γονιδιακό επίπεδο είτε σε ποικιλία κυτταροπλασματικών μονοπατιών. Όλες αυτές οι δράσεις ασκούνται μέσω του



υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος παρόλο που εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς, παρουσιάζει ιστο-ειδική δράση.

### **1.5.2 Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση**

Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απόπτωση σε κύτταρα αιματολογικής προέλευσης, αλλά και σε ορισμένα μη αιματολογικά κύτταρα, όπως για παράδειγμα τους οστεοβλάστες (Weinstein et al, 2002). Αντίθετα, επάγουν την επιβίωση σε κύτταρα αρκετών μη αιματολογικών ιστών, όπως του μαστικού αδένου, των ωοθηκών, του ήπατος και τους ινοβλάστες. Επιπλέον, αναστέλλουν την απόπτωση που προκαλείται από υποξία / ισχαιμία σε νευρικά (Ekert et al, 1997) και μυοκαρδιακά κύτταρα (Pearl et al, 2002), και μειώνουν τον κυτταρικό θάνατο που σχετίζεται με την απόπτωση σε τραυματισμένο ιστό νωτιαίου μυελού (Zurita et al, 2002). Ανάλογα με τις συνθήκες, τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν προ- ή αντι-αποπτωτικό δυναμικό στον ίδιο τύπο κυττάρων. Ενώ δρουν προστατευτικά σε κάποιους νευρικούς ιστούς, αυτές οι ορμόνες έχουν, επίσης, προταθεί να θέτουν σε κίνδυνο την ικανότητα των νευρώνων του ιπποκάμπου για επιβίωση από νευρολογικές βλάβες. Παρομοίως, μερικές λεμφοειδείς σειρές αδυνατούν να οδηγηθούν σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από γλυκοκορτικοειδή υπό συγκεκριμένες πειραματικές ή κλινικές συνθήκες (Schmidt et al, 2004). Αντίστοιχα, ένα μεγάλο ποσοστό των δεδομένων προτείνει ότι οι ορμόνες αυτές επάγουν την αντίσταση σε φυσιολογικά και μετασχηματισμένα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένης της πλειοψηφίας των ανθρώπινων κακοήθων καρκινικών κυττάρων. Οι όγκοι που συμμετέχουν έχουν βρεθεί να προέρχονται από την ουροδόχο κύστη, τον εγκέφαλο, το μαστό, τον τράχηλο της μήτρας, το παχύ έντερο, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το νεφρό, τις ωοθήκες, το πάγκρεας, τον προστάτη, το ορθό και τους όρχεις, καθώς επίσης, καθίστανται ανθεκτικά στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή τα νευροβλαστώματα, τα μελανώματα και τα οστεοσαρκώματα.

Ενώ οι μηχανισμοί της προ-αποπτωτικής σηματοδότησης είναι καλά μελετημένοι, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα γλυκοκορτικοειδή δρουν αντι-αποπτωτικά στα επιθηλιακά κύτταρα είναι λιγότερο κατανοητοί. Αντίθετα, με τα αιματολογικά, τα επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από: α) συνεκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, β) διευκόλυνση του σχηματισμού των

κυτταρικών στρωμάτων, γ) ύπαρξη τριών μεμβρανικών περιοχών (ακραία, πλευρική, βασική), δ) παρουσία στενών συνδέσεων μεταξύ της ακραίας και πλευρικής μεμβρανικής περιοχής, ε) ακροβασική πολωμένη κατανομή των διαφόρων οργανιδίων και συστατικών του κυτταροσκελετού και στ) έλλειψη κινητικότητας των μεμονωμένων επιθηλιακών κυττάρων σε σχέση με το τοπικό τους περιβάλλον. Αυτά τα ειδικά χαρακτηριστικά των δύο διαφορετικών τύπων κυττάρων είναι πιθανό να ευθύνονται για τη μετατόπιση της κυτταρικής ισορροπίας προς την απόπτωση για τα αιματολογικά και προς την αντίσταση για τα επιθηλιακά κύτταρα μετά από έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή. Επίσης, η επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση εξαρτάται από τα επαρκή επίπεδα του υποδοχέα GR και από τις μετέπειτα αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων.

### **1.5.3 Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό**

Μεταξύ των ποικίλων επιδράσεων των γλυκοκορτικοειδών στη φυσιολογία είναι η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν περιγραφεί να δρουν τόσο ως αναστολείς όσο και ως επαγωγείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων και τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται (Mattern et al., 2007). Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι η χαμηλότερη συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης, ενός αναλόγου των γλυκοκορτικοειδών, μπορεί να επάγει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ οι υψηλότερες δόσεις αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Σε πολλές κυτταρικές σειρές, οι αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών, φαίνεται να προέρχονται από μια αναστρέψιμη παύση, κατά τη φάση G1, του κυτταρικού κύκλου. Μερικοί από τους μηχανισμούς που προτάθηκαν για αυτή την παύση του κυτταρικού κύκλου είναι: η διαμεσολαβούμενη από γλυκοκορτικοειδή καταστολή της κυκλίνης D3 και του πρωτο-ογκογονιδίου c-myc, η αρνητική αλληλεπίδραση του GR με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 και η διαμεσολαβούμενη από γλυκοκορτικοειδή επαγωγή των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 WAF1/CIP1 και p27 Kip (Mattern et al, 2007; Chebotaev et al, 2007).

Οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αποκαλύφθηκαν, επίσης, σε ζώα που είναι ανεπαρκή στα γλυκοκορτικοειδή ή στη

σηματοδότησή τους. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων διαταράσσεται μόνο σε ένα αρκετά περιορισμένο σύνολο ιστών. Η επινεφριδεκτομή έχει αναφερθεί να οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, για παράδειγμα, στο λεπτό έντερο (Foligne et al., 2001; Miyata et al., 2008; Tutton, 1973), και στην αύξηση του πολλαπλασιασμού σε περιοχές του εγκεφάλου (Alonso, 2000; Yehuda et al., 1989). Επίσης, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων των πνευμόνων επηρεάζεται από τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αποκαλύφθηκε από μελέτες σε ποντίκια που δε διέθεταν το CRH πεπτίδιο (Muglia et al., 1995, 1999). Αυτά τα ποντίκια δείχνουν ανεπάρκεια γλυκοκορτικοειδών, αλλά αναπτύσσονται κανονικά και είναι γόνιμα. Ωστόσο, τα ομόζυγα μεταλλαγμένα νεογνά που γεννήθηκαν από ομόζυγες μεταλλαγμένες μητέρες πεθαίνουν από πνευμονική ανεπάρκεια, αποδεικνύοντας τη ζωτικής σημασίας παρουσία των γλυκοκορτικοειδών στην ανάπτυξη του πνεύμονα.

#### **1.5.4 Ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό μεταβολισμό, τη φλεγμονή και το ανοσοποιητικό σύστημα**

Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Η αυξημένη δράση της κυτοκίνης κατά τη διάρκεια της φλεγμονής δεν ενεργοποιεί μόνο τα συστατικά της φλεγμονώδους αντίδρασης, αλλά επίσης, στοχεύει στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης για να επάγει την παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών. Έτσι, ενεργοποιείται ένας μηχανισμός αρνητικής τροφοδότησης, με τα γλυκοκορτικοειδή να μειώνουν τις φλεγμονώδεις διεργασίες σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T-κυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων (Guyre et al. 1984; Cupps et al. 1985; Cohan et al. 1989). Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών φλεγμονωδών νόσων και είναι ιδιαίτερα σημαντικά στη φυσιολογική ανοσολογική απόκριση.

Τα γλυκοκορτικοειδή, επίσης, επηρεάζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης. Κατά τη διάρκεια νηστείας, η κορτιζόλη ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς μέσω των οποίων η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αυξάνεται και διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα. Αυτό επιτυγχάνεται με τους εξής μηχανισμούς:

- **Επαγωγή γλυκονεογένεσης.** Το μονοπάτι αυτό οδηγεί στη σύνθεση γλυκόζης από άλλα οργανικά μόρια, όπως το πυροσταφυλικό οξύ, το

γαλακτικό οξύ, τη γλυκερόλη και τα αμινοξέα. Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την έκφραση πολλών σημαντικών ενζύμων της γλυκονεογένεσης και τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων που είναι απαραίτητα για τη διεργασία αυτή (Pilkis and Granner, 1992).

- **Αποθήκευση γλυκόζης.** Η γλυκόζη αποθηκεύεται στους νευρικούς ιστούς και η απορρόφησή της μειώνεται από τους μυϊκούς και λιπώδεις ιστούς (McMahon et al, 1988).
- **Λιπόλυση στο λιπώδη ιστό.** Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται μέσω της λιπόλυσης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας σε ιστούς όπως τους μυϊκούς, και η γλυκερόλη που απελευθερώνεται παρέχει ένα υπόστρωμα για τη γλυκονεογένεση (Zakrzewska et al, 1997).

## **1.6 Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor, mtGR)**

### **1.6.1 Γενικά**

Ανάλογα με τις συνθήκες, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών μετατοπίζεται είτε στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια, προτείνοντας ότι η πυρηνική και μιτοχονδριακή μετατόπιση του GR ρυθμίζονται διαφορετικά. Η Psarra και οι συνεργάτες της έδειξαν με *in silico* ανάλυση την παρουσία μια αλληλουχίας διπλής έλικας στο καρβοξυτελικό άκρο του GR, όπως επίσης και των υποδοχέων των άλλων στεροειδών ορμονών, η οποία παρουσιάζει χαρακτηριστικά εν δυνάμει εσωτερικού σήματος μιτοχονδριακής στόχευσης (Psarra et al, 2005). Τα υδρόφοβα και θετικά φορτισμένα κατάλοιπα εντοπίζονται σε αντίθετες πλευρές της έλικας. Ο Sionov και οι συνεργάτες του, επαλήθευσαν αυτήν την παρατήρηση για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Sionov et al, 2006) (Εικόνα 10), ενώ πρόσφατα αυτή η παρατήρηση επαληθεύθηκε και για τον μιτοχονδριακό υποδοχέα θυρεοειδών ορμονών (Carazo et al, in press).

Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που προορίζονται για τα μιτοχόνδρια περιέχουν ένα N-τελικό μιτοχονδριακό πεπτίδιο μεταφοράς που αποκόβεται μετά την είσοδό τους στη μιτοχονδριακή μήτρα (Pfanner et al, 2001). Μερικές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, ωστόσο, έχουν ένα εσωτερικό σήμα MLS που δεν απομακρύνεται. Ο GR

που ανιχνεύτηκε στα μιτοχόνδρια είναι μικρότερου μεγέθους από τον κυτταροπλασματικό, και πιθανόν αποτελεί είτε προϊόν πρωτεόλυσης και παράλληλης αλλαγής διαμόρφωσης του μορίου ώστε να ενεργοποιείται η δράση του εσωτερικού μιτοχονδριακού σήματος στόχευσης, είτε αποτελεί μία από της ισομορφές GRαB, GRαC, (Psarra, 2005, 2009) όπως έχουν περιγραφεί από τον Cidlowski και τους συνεργάτες του. Ως εκ τούτου, ο υποδοχέας φαίνεται να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια μέσω μιας εσωτερικής μιτοχονδριακά στοχευμένης ακολουθίας που διαθέτει μια αμφιπαθή έλικα. Επίσης, έχει προταθεί ότι ο GR μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια από μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ, καθώς η αμινοξική του περιοχή (αμινοξέα 558-580) επικαλύπτεται με μία από τις πολλές χαρακτηρισμένες θέσεις δέσμευσης της HSP90, και τόσο η HSP90 όσο και η HSP70 λειτουργούν ως συνοδοί που αλληλεπιδρούν με το μιτοχονδριακό πρωτεϊνικό υποδοχέα εισαγωγής Tom 70 (Voos et al, 2003). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να εξακριβωθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ στη μετατόπιση του GR.



Εικόνα 10. Το σήμα μιτοχονδριακού εντοπισμού (Mitochondrial Localization Signal, MLS) του GR μοιάζει με αυτό της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (COX). Αμινοξική ομολογία ανάμεσα στα δύο σήματα MLS του GR και της COX. (Sionov et al, 2006)

### 1.6.2 Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη μεταγραφή των μιτοχονδρίων και το συντονισμό της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS)

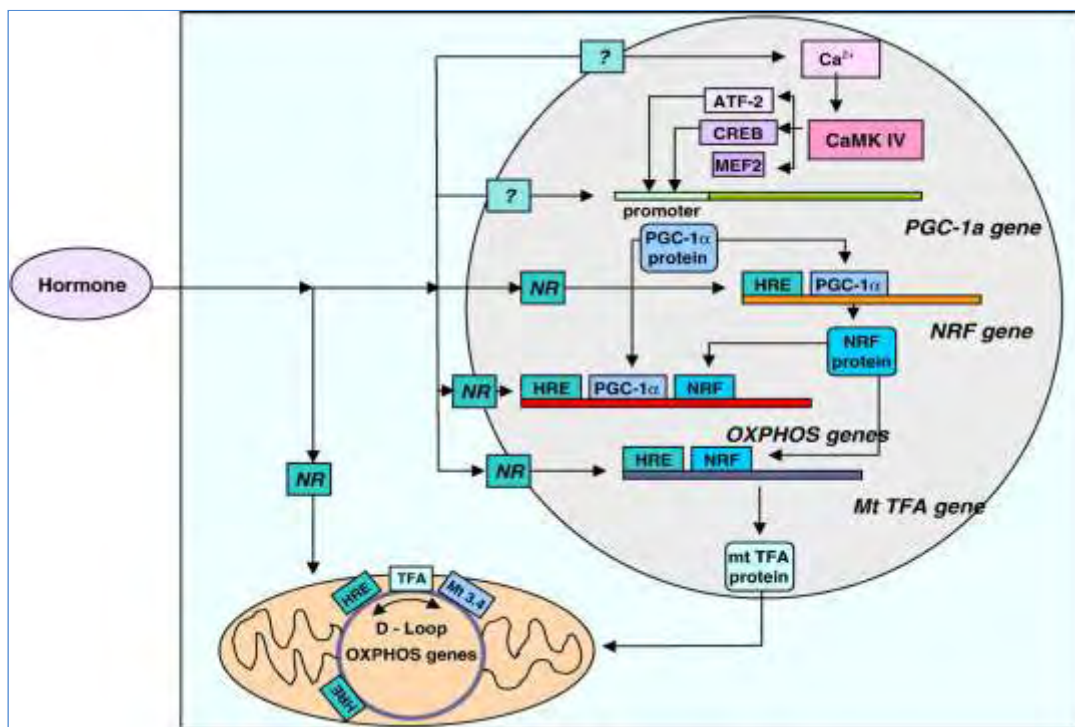
Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας, που συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Καλύπτουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Επίσης, τα οργανίδια αυτά εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αίμης και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Τα μιτοχόνδρια είναι τα βασικά συστατικά της

απόκρισης στο στρες, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), στην ανοσορύθμιση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν αιτιολογικά συσχετιστεί με νευρομυϊκές εκφυλιστικές παθήσεις, όπως τη νόσο Αλτσχάιμερ, τη νόσο του Πάρκινσον, την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση κατά πλάκας, και τον καρκίνο.

Αυτός ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων, απαιτεί την ενσωμάτωση και το συντονισμό των λειτουργιών τους με εκείνες των άλλων κυτταρικών οργανιδίων, κυρίως του κυτταρικού πυρήνα. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι μια τέτοια λειτουργία, στην οποία τόσο τα πυρηνικά όσο και τα μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) απαιτούνται για το σχηματισμό των ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων. Το μιτοχόνδριο είναι ένας αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου, επιτυγχάνοντας διάφορα επίπεδα της προσαρμοστικής ρύθμισης της OXPHOS. Αν οι ενεργειακές ανάγκες δεν είναι επαρκείς, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την απόδοση σε ATP με αλλοστερική ενεργοποίηση της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε περιπτώσεις υψηλότερων ενεργειακών αναγκών, όπως αυτές που προκλήθηκαν από τις γλυκοκορτικοειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες στα κύτταρα-στόχους και κατά τη διάρκεια ορισμένων αναπτυξιακών περιόδων, τα κύτταρα αντιδρούν με αυξημένη βιοσύνθεση της OXPHOS ή, σε ακραίες περιπτώσεις, με μιτοχονδριακή βιογένεση, εμπλέκοντας αυξημένη μεταγραφή των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS και αύξηση της δόσης των γονιδίων (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006).

Ο συντονισμός της μεταγραφής των γονιδίων της OXPHOS στα δύο διαμερίσματα των κυττάρων από τα γλυκοκορτικοειδή προέρχεται από τον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα αντίστοιχα GREs για να επάγει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS καθώς και, τους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων αυτών (Εικόνα 11). Επιπλέον, ενεργοποιούνται μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος συντονισμός της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα. Η παρουσία του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια και των παρόμοιων με τα GREs αλληλουχιών στο γονιδίωμα των μιτοχονδρίων προτείνει

μια πρόσθετη λειτουργία του συντονισμού, μέσω μιας άμεσης επίδρασης του μιτοχondριακά εντοπιζόμενου υποδοχέα στη μιτοχondριακή μεταγραφή. Ως εκ τούτου, οι κοινοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, που βρίσκονται στον πυρήνα και στο μιτοχόνδριο κι ενεργοποιούνται από τον ίδιο ρυθμιστικό παράγοντα, την ορμόνη, θα εξασφαλίσουν το συντονισμό μιας διαδικασίας που απαιτεί την παράλληλη μεταγραφή των γονιδίων που εντοπίζονται στα δύο κυτταρικά οργανίδια (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006, 2011) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Πυρηνικός-κυτταροπλασματικός συντονισμός της μεταγραφής των μιτοχondριακών και πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες OXPPOS από τις στεροειδείς ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή). Στον πυρήνα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα (HR), μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες (GREs) των γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPPOS), να τα ενεργοποιήσει άμεσα, και με τα GREs των γονιδίων του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα (NRF), να επάγει τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι, στη συνέχεια, μπορούν να ασκήσουν μια θετική επίδραση στην μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων της OXPPOS. Μέσω μη γονιδιωματικής ρύθμισης της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού  $Ca^{2+}$  και ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το σύμπλοκο ασβεστίου-καλμοδουλίνης πρωτεϊνικής κίνησης IV (CaMKIV), του κύριου ρυθμιστή της μιτογένεσης, ο υποδοχέας  $\gamma$  που ενεργοποιείται από το συνενεργοποιητή 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) επάγεται, και μπορεί άμεσα και έμμεσα (μέσω της NRF

επαγωγής) να διεγείρει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (mtTFA), ο οποίος ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Οι PGC-1α και PPARα μπορούν, επίσης, να επαχθούν τόσο από τις θυρεοειδικές ορμόνες όσο και από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο PCG1α/1β μπορεί, ακόμη, να επαχθεί από την IFN $\gamma$  μέσω του μονοπατιού JAK/STAT-1. Ο PCG1α/1β, στη συνέχεια, μπορεί να ενεργοποιήσει το σχετιζόμενο με οιστρογόνα υποδοχέα  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ), ένα ορφανό πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος μέσω άμεσης σύνδεσης με υποκινητές γονιδίων, σημαντικών για λειτουργίες των μιτοχονδρίων, όπως για την οξειδωτική φωσφορυλίωση ή με υποκινητές των παραγόντων που ελέγχουν τη μιτοχονδριακή έκφραση, να οδηγήσει σε αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνοή και παραγωγή ROS. Στα μιτοχόνδρια, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων OXPHOS μέσω των συγγενών τους μιτοχονδριακών υποδοχέων και της αλληλεπίδρασής τους με τις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, εξασφαλίζοντας το βέλτιστο συντονισμό της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS και στα δύο γονιδιώματα. Οι ειδικές αλληλουχίες Mt3 και Mt4, που υπάρχουν στη 5'-ανοδική περιοχή των γονιδίων που κωδικοποιούν το σύμπλοκο κυτοχρώματος bcl και τον D-βρόγχο είναι πιθανές θέσεις δέσμωσης για ακόμα άγνωστους ρυθμιστικούς παράγοντες συντονισμού (Scheller et al., 2000, Psarra et al., 2006). (Από Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

### **1.6.3 Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση**

Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν μια σειρά από εξωγενή και ενδογενή σήματα απόπτωσης και επιβίωσης (Goldenthal et al, 2004). Μεταξύ των σημαντικότερων εξωγενών σημάτων είναι οι στεροειδείς ορμόνες και συσσωρευμένα ευρήματα δείχνουν ότι ορισμένες από τις ορμονικές αποπτωτικές / αντι-αποπτωτικές επιπτώσεις μεσολαβούνται από τους αντίστοιχους υποδοχείς των μιτοχονδρίων. Ανάλογα με τη φύση του κυττάρου-στόχου, η ίδια ορμόνη μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας απόπτωσης ή επιβίωσης, λόγω της ιστο-ειδικότητας των μιτοχονδρίων. Πρωτεομική ανάλυση παρουσίασε διαφορές στη σύσταση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων, με μόνο ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών αυτών να είναι κοινές σε όλα τα μιτοχόνδρια (Johnson et al, 2007).

Τα γλυκοκορτικοειδή προστατεύουν τα κύτταρα της επιθηλιακής προέλευσης, για παράδειγμα, του μαστικού αδένου, τα κύτταρα των ωοθυλακίων, και τα



ηπατοκύτταρα, από τα αποπτωτικά ερεθίσματα (Evans-Storms et al, 1995). Ωστόσο, τα ίδια αποτελούν αποπτωτικούς παράγοντες για τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, όπως τα μονοκύτταρα, μακροφάγα, κύτταρα του θύμου και λευχαιμικά κύτταρα (Herr et al, 2007). Αρκετά γονίδια των εξωγενών και ενδογενών οδών θανάτου εκφράζονται με ένα προ-αποπτωτικό τρόπο σε ευαίσθητα λεμφοειδή κύτταρα εκτεθειμένα σε γλυκοκορτικοειδή, αν και τα επιπρόσθετα σήματα είναι απαραίτητα για να ενεργοποιηθεί η διαδικασία της απόπτωσης. Στο πλαίσιο αυτό, ο Sionon κι οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας T-λεμφοειδείς κυτταρικές σειρές διαφορετικές ως προς την ευαισθησία τους στα γλυκοκορτικοειδή έδειξαν μια άμεση επίδραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην διαδικασία της απόπτωσης (Sionon et al. 2006). Σε αυτά τα κύτταρα, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη μετατόπιση του συγγενικού υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, ενώ στα ανθεκτικά κύτταρα στα γλυκοκορτικοειδή δεν παρατηρείται τέτοια μετατόπιση. Στόχευση στα μιτοχόνδρια ενός υποδοχέα GR άνευ DBD περιοχής, επίσης, οδήγησε σε απόπτωση, οδηγώντας στο συμπέρασμα μιας μη γονιδιωματικής δράσης του GR στη διαδικασία.

## 1.7 Καρκίνος

### 1.7.1 Γενικά

Σύμφωνα με το βασικό μοντέλο καρκινογένεσης, η κακοήθης εξαλλαγή συνιστά μια πολυσταδιακή διαδικασία: η έναρξη της δημιουργίας ενός όγκου απαιτεί μια σειρά βημάτων που ακολουθούνται από επιπρόσθετες αλλαγές, ενισχύοντας το ογκογόνο υπόβαθρο. Στη συνέχεια, η εξέλιξη του όγκου (tumor progression) καθορίζεται από την επιλογή των καρκινικών κυττάρων που διαθέτουν επιθετικότερο δυναμικό. Πολλοί διαφορετικοί τύποι γεγονότων μπορούν να συμβάλλουν στη διαδικασία αυτή σε μοριακό επίπεδο.

Οι δύο σημαντικότεροι τύποι αλλαγών που συμβαίνουν στο γονιδίωμα κατά την κακοήθη εξαλλαγή είναι η συσσώρευση σωματικών αλλαγών και η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας. Η σχετική σημασία της συνεισφοράς τους στην καρκινογένεση εξακολουθεί να αποτελεί θέμα έντονης επιστημονικής συζήτησης. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα φέρουν αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων σε σύγκριση με τα

φυσιολογικά. Καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται, ο αριθμός των μεταλλάξεων αυξάνεται περαιτέρω, σε βαθμό που δε μπορεί να δικαιολογηθεί από το ρυθμό σωματικής μεταλλαξιγένεσης. Η γενετική αστάθεια αντικατοπτρίζεται σε αλλαγές στον αριθμό των γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα μικρών διπλασιασμών ή ελλειμμάτων, μετατοπίσεων υλικού από ένα χρωμόσωμα σε ένα άλλο ή ακόμη και αλλαγών που επηρεάζουν ολόκληρα χρωμοσώματα. Η αστάθεια σε επίπεδο χρωμοσωμάτων μπορεί να οφείλεται σε μηχανισμούς που δρουν κατά το διαχωρισμό τους στη μίτωση.

Η ύπαρξη διαφορετικών μεταλλάξεων σε έναν κυτταρικό πληθυσμό προσφέρει την ευκαιρία επιλογής κυττάρων με συγκεκριμένες ιδιότητες. Στην περίπτωση του καρκίνου, μια μετάλλαξη που αυξάνει το δυναμικό πολλαπλασιασμού ενός κυττάρου του προσδίδει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα. Σε κάθε στάδιο της καρκινογένεσης σε έναν ιστό, επιλέγονται από τον κυτταρικό πληθυσμό εκείνα τα κύτταρα που μπορούν να αναπτυχθούν πιο επιθετικά, δηλαδή εκείνα που αρχικά πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα, ενώ αργότερα μπορούν να μεταναστεύουν δημιουργώντας αποικίες σε νέες θέσεις.

Τα γονίδια που έχουν άμεση επίδραση στη δημιουργία καρκίνου μπορούν να διακριθούν σε ογκογονίδια (γονίδια των οποίων η λειτουργία ενεργοποιείται από μια μετάλλαξη και συμβάλλει στην ογκογένεση) και σε ογκοκατασταλτικά (γονίδια των οποίων η φυσιολογική λειτουργία παρεμποδίζει την ογκογένεση). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο καρκίνος εκδηλώνεται εξαιτίας της συσσώρευσης μιας ποικιλίας μεταλλάξεων σε ένα σωματικό κύτταρο, οι οποίες ενεργοποιούν τα ογκογονίδια και/ή απενεργοποιούν τους ογκοκατασταλτές (Lewin, 2004).

### **1.7.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων**

Τα κύτταρα που προέρχονται από όγκους και όχι από φυσιολογικούς ιστούς παρουσιάζουν αλλαγές σε μερικές ή σε όλες τις ιδιότητες σε σχέση με τα φυσιολογικά. Έχουν ελαττωμένη εξάρτηση από την παρουσία ορού και από την προσκόλληση σε στερεή επιφάνεια (έτσι γίνονται σφαιρικά αντί να είναι πεπλατυσμένα) και, αντί να αναπτύσσονται σε μονοστιβάδα, δημιουργούν μια παχιά πολυστιβαδική μάζα κυττάρων που ονομάζεται εστία (focus). Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να δημιουργούν όγκους όταν ενεθούν σε κατάλληλα

πειραματόζωα (Lewin, 2004).

Τα τρία είδη των αλλαγών που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο, όταν γίνεται καρκινικό, είναι:

- Η **αθανατοποίηση** (immortalization) είναι η ικανότητα για συνεχή κι επ'άοριστον ανάπτυξη (χωρίς απαραίτητα να συμβαίνουν άλλες φαινοτυπικές αλλαγές).
- Ο **μετασχηματισμός** (transformation) περιγράφει τη διαφυγή από τον έλεγχο των φυσιολογικών ρυθμιστικών περιοριστικών μηχανισμών της ανάπτυξης. Για παράδειγμα, τα μετασχηματισμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από την παρουσία αυξητικών παραγόντων που φυσιολογικά θα ήταν απαραίτητοι για την επιβίωσή τους.
- Η **μετάσταση** (metastasis) περιγράφει το στάδιο στο οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ικανότητα έκτοπης ανάπτυξης, μπορούν δηλαδή να εισβάλλουν σε φυσιολογικούς ιστούς διαφορετικούς από αυτόν τον οποίο προέρχονται και να ιδρύουν νέες δευτερογενείς αποικίες (μεταστατικές εστίες).

### 1.7.3 Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων

Σε ένα υγιές κύτταρο η συντριπτική πλειοψηφία της ενέργειας παρέχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας, που υφίσταται γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα, πριν το πυροσταφυλικό οξύ εισέλθει στα μιτοχόνδρια και μετατραπεί σε ακετυλο-CoA.

Πολλά καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη γλυκόλυση, με ένα μεγάλο μέρος του πυροσταφυλικού να μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, σε αντίθεση με την είσοδο του στα μιτοχόνδρια και τη μετατροπή του σε ακετυλο-CoA. Αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg (Warburg, 1956). Ωστόσο, η αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ παρέχει μόνο ένα κλάσμα του ATP που παράγεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η σχετική συμβολή των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ATP ποικίλει ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Μέχρι και 32 μόρια ATP παράγονται από τον ολοκληρωμένο μεταβολισμό της γλυκόζης, με τη γλυκόλυση να παρέχει μόνο δύο από αυτά τα μόρια. Μια σειρά

από θεωρίες έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τη φαινομενικά αναποτελεσματική εναλλαγή της ενεργειακής παροχής, αρχίζοντας με την αρχική πρόταση του Warburg ότι τα μιτοχόνδρια είναι ελαττωματικά στον καρκίνο. Έχει γίνει σαφές, ωστόσο, ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν συχνά φυσιολογικά επίπεδα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Moreno-Sánchez et al, 2007, 2009). Η τρέχουσα θεωρία για το φαινόμενο Warburg, είναι ότι η αυξημένη βιοσύνθεση που απαιτείται από τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (αναβολισμός του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών) καλύπτεται πιο αποτελεσματικά από την αερόβια γλυκόλυση από ότι από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Vander et al, 2009; Solaini et al, 2011).

Τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα δεν απαιτούν μόνο ενέργεια, αλλά και δομικά συστατικά, όπως αμινοξέα και νουκλεϊνικά οξέα, για τη βιοσύνθεση και τη μιτωτική τους διαίρεση. Για το λόγο αυτό, συσσωρεύονται διάφορα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης και του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA), που απαιτούν μεγαλύτερες ποσότητες γλυκόζης, ή ενός εναλλακτικού μορίου, που θα καλύπτει τη μεγαλύτερη ζήτηση για βιοσυνθετικά συστατικά. Ο καταβολισμός της γλουταμίνης φαίνεται να είναι το εναλλακτικό μονοπάτι για την παροχή των συστατικών αυτών στα καρκινικά κύτταρα (Medina et al, 1990, 1992). Καθώς ένα κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση, η έκφραση των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων, υδατανθράκων και λιπιδίων αυξάνεται. Αυτές οι διαδικασίες υποστηρίζονται από πρόδρομα μόρια που προέρχονται από τη γλυκόλυση, την οδό των φωσφορικών πεντοζών, το μονοπάτι TCA, την οξειδωτική φωσφορυλίωση και το μεταβολισμό των αμινοξέων (κυρίως τη γλουταμινόλυση).

Οι όγκοι χαρακτηρίζονται από περιοχές υποξίας που έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών και αύξηση των επιπέδων των αποβλήτων. Ένα από τα βασικά μέσα αντιμετώπισης της υποξίας μέσα σε ένα κύτταρο είναι η έκφραση του παράγοντα 1 που επάγεται από υποξία (Hypoxia Inducible Factor 1, HIF1). Ο HIF1 μετατρέπει τους μεταβολικούς μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας του κυττάρου από οξυγονο-εξαρτώμενους σε ανεξάρτητους οξυγόνου. Σε κύτταρα όγκου, η έκφραση του HIF1 μπορεί να ρυθμιστεί θετικά ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου. Ένας αριθμός ογκογονιδίων συμβάλλει στην έκφραση του παράγοντα HIF1 στον καρκίνο (Ras, SRC, 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης), ή η απώλεια των ογκο-κατασταλτικών γονιδίων όπως του von Hippel-Lindau ή του PTEN. Ο HIF1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί τα γονίδια που συμμετέχουν στην χαρακτηριστική αλλαγή στο

μεταβολισμό των κυττάρων του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων της γλυκόλυσης, όπως της εξοκινάσης, της φωσφοφρουκτοκινάσης, της γαλακτικής αφυδρογονάσης και του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT1 (Denko et al, 2008). Η κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης ενεργοποιείται από τον HIF1, που αναστέλλει την είσοδο του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο TCA. Η θετική ρύθμιση του HIF1, ως εκ τούτου, είναι υπεύθυνη για πολλές από τις αλλαγές που σχετίζονται με το φαινόμενο Warburg.

Μαζί με τον HIF1, η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων c-Myc και p53 μεταβάλλεται, επίσης, σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Ένα συχνά εκφραζόμενο ογκογονίδιο, το c-Myc, εμπλέκεται στην trans-ενεργοποίηση της αφυδρογονάσης του γαλακτικού οξέος και του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT1 (Osthus et al, 2000; Shim et al, 1997), καθώς και στην επαγωγή της γλουταμινόλυσης (Wise et al, 2008). Ο HIF1 μπορεί να συνεργαστεί με το c-Myc για να αυξήσει την έκφραση της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και της εξοκινάσης II. Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που συχνά εκφράζεται σε μεταλλαγμένη μορφή σε όγκους, οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασης της εξοκινάσης II, της πρόσληψης γλυκόζης, σε μειωμένη αναστολή της φωσφοφρουκτοκινάσης 1 (αυξημένη δραστηριότητα), και σε μειωμένη συναρμολόγηση του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης C (σύμπλοκο IV της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων).

Οι καρκίνοι, ως εκ τούτου, παρουσιάζουν συχνά τροποποιημένη έκφραση των μεταβολικών ενζύμων. Όταν ο μεταβολισμός των καρκινικών κυττάρων διαφέρει από αυτόν των υγιών παρέχεται η δυνατότητα για επιλεκτική στόχευση αυτής της ασθένειας. Η συμβολή των μιτοχονδρίων, ωστόσο, στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική.

#### **1.7.4 Ρόλος του ενζύμου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH) στο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων**

Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (Pyruvate DeHydrogenase, PDH) συνδέει τη γλυκόλυση με τον κύκλο TCA. Μετά την είσοδο του πυροσταφυλικού στα μιτοχόνδρια, η PDH καταλύει τη μετατροπή του σε ακετυλο-CoA μέσω μιας μη αντιστρεπτής αντίδρασης (Berg et al, 2001). Η ενεργότητα της PDH ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση, η οποία ελέγχεται από δύο ένζυμα, την κινάση και τη φωσφατάση

της PDH. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση είναι ανενεργή στη φωσφορυλιωμένη της κατάσταση. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την κινάση της PDH (Koukourakis et al, 2005, 2007) και έτσι διατηρούν το ένζυμο αυτό σε ανενεργή μορφή, προωθώντας την αερόβια γλυκόλυση. Αναστολή της ενεργότητας της PDH κινάσης επιτρέπει τη δράση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και τη διοχέτευση του πυροσταφυλικού οξέος στον κύκλο TCA.

### **1.7.5 Ο μιτοχονδριακός μεταβολισμός σε καρκινικά κύτταρα**

Παρά τη μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αερόβια γλυκόλυση στα καρκινικά κύτταρα, τα μιτοχόνδρια εξακολουθούν να διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην επιβίωσή τους. Στα καρκινικά κύτταρα, τα μιτοχόνδρια παρέχουν το 40-75% των κυτταρικών απαιτήσεων σε ATP (Mathurpala et al, 2010). Αυτό σημαίνει ότι διαταράσσοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση θα διακοπεί σημαντικά ο ενεργειακός εφοδιασμός των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, δεν είναι μόνο η σημασία των μιτοχονδρίων στον ενεργειακό εφοδιασμό που τα καθιστά ένα καλό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Παίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο στη σύνθεση των αμινοξέων, πουρινών, πυριμιδινών, υδατανθράκων και λιπαρών οξέων παρέχοντας ενδιάμεσα μόρια από τον κύκλο TCA και στην επαγωγή απόπτωσης.

## 2. Σκοπός

Οι στεροειδείς ορμόνες συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως το μεταβολισμό, τη φλεγμονή, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος, καθώς και τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε καλλιέργεια. Οι ορμόνες αυτές εισέρχονται με διάχυση στα κύτταρα-στόχους τους και δεσμεύονται με υψηλή χημική συγγένεια στους αντίστοιχους υποδοχείς τους. Αυτοί με τη σειρά τους, μεταφερόμενοι στον πυρήνα και συνδεδεμένοι σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, συμβάλλοντας στη θετική ή αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης κι επιφέροντας αλλαγές στο εσωτερικό των κυττάρων. Πρόσφατα, έχουν επίσης αναφερθεί μη γενωμικές δράσεις των στεροειδών ορμονών μέσω ενεργοποίησης μεμβρανικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών, των οποίων η φύση και ο μηχανισμός δράσης είναι υπό διερεύνηση.

Τα γλυκοκορτικοειδή, μια από τις κυριότερες κατηγορίες στεροειδών ορμονών, εξασκούν τόσο τις φυσιολογικές όσο και τις φαρμακολογικές τους δράσεις μέσω του υποδοχέα τους (Glucocorticoid Receptor, GR), που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, των προσδετο-εξαρτώμενων μεταγραφικών παραγόντων. Η σύνδεση του υποδοχέα με τις ορμόνες μετατοπίζει το σχηματιζόμενο σύμπλοκο στον πυρήνα, όπου ο υποδοχέας συνδέεται στα στοιχεία GREs και ρυθμίζει τη μεταγραφή των αποκρινόμενων γονιδίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ελέγχονται πολλές φυσιολογικές διεργασίες και σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού και της παραγωγής ενέργειας στα κύτταρα.

Μια από τις σημαντικότερες κυτταρικές λειτουργίες τις οποίες ελέγχει ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι ο ενεργειακός μεταβολισμός μέσω του ελέγχου έκφρασης ενζύμων της γλυκονεογένεσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Όσον αφορά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει στο συντονισμό της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια, προκειμένου να συγκροτηθούν τα ενεργά αναπνευστικά σύμπλοκα από τις πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενες υπομονάδες τους. Στον πυρήνα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα στοιχεία GREs για να επάγει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και να ελέγξει τη σύνθεση

μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων. Αντίστοιχα, ο μιτοχονδριακά εντοπιζόμενος υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mtGR) συνδέεται στις παρόμοιες με τα πυρηνικά GREs αλληλουχίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και συμβάλλει στη μεταγραφή των γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο υποκυτταρικό αυτό διαμέρισμα. Η σύνδεση των διαφορετικής προέλευσης παραγόμενων υπομονάδων οδηγεί στο σχηματισμό των πλήρως ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων.

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά για τη βιοσύνθεση και τον πολλαπλασιασμό τους. Τα μιτοχόνδρια επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, καθώς παρέχουν το 40-75% των κυτταρικών απαιτήσεων σε ATP, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, συμβάλλοντας στο γρήγορο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (mtGR) στον πολλαπλασιασμό των ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2, δεδομένης της συμβολής του στην παραγωγή της απαιτούμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές, ως προς την έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα, κυτταρικές σειρές (HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR) οι οποίες ελέγχθηκαν και συγκρίθηκαν αναφορικά με το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους σε καλλιέργεια. Επίσης, μέσω της ανοσοανίχνευσης κατά Western διαπιστώθηκε πως η διαφορετική έκφραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των εξεταζόμενων καρκινικών κυττάρων. Οι τρεις κυτταρικές σειρές εξετάστηκαν, ακόμη, ως προς την ικανότητα τους να οδηγούν στην ανάπτυξη όγκου *in vivo* μετά τον εμβολιασμό τους σε νεαρούς αρσενικούς μύες.



## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Υλικά

#### 3.1.1 Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας, καθώς και οι επιμέρους συστάσεις τους, απεικονίζονται ακολούθως:

##### 1) **Θρεπτικό διάλυμα για καλλιέργεια κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR**

**Dulbecco's Modified Eagle Media, DMEM, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη, 2mM L-γλουταμίνη**

Το DMEM αποτελεί ένα βασικό θρεπτικό μέσο που αποτελείται από βιταμίνες, αμινοξέα, σάκχαρα, γλυκόζη κι ένα δείκτη του pH (ερυθρό της φαινόλης), ενώ δεν περιέχει πρωτεΐνες και αναπτυξιακούς/αυξητικούς παράγοντες. Το ερυθρό της φαινόλης αποτελεί ένα δείκτη μεταβολής του pH που καταδεικνύει πότε το διάλυμα καθίσταται ακατάλληλο για τα κύτταρα μέσω της αλλαγής του χρώματός του. Το διάλυμα έχει τελικό pH 7,0-7,4 και η ωσμωμοριακότητά του λόγω της παρουσίας αλάτων είναι ίση με 300 mOsm. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Gibco και Sigma-Aldrich. Το διάλυμα DMEM φυλάσσεται στους 2-8<sup>0</sup> C.

Μετά το άνοιγμα της συσκευασίας του θρεπτικού διαλύματος (500 ml), γίνεται προσθήκη των εξής διαλυμάτων:

- 10% Διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS, (50 ml), για την προσθήκη των περιεχόμενων αναπτυξιακών/αυξητικών παραγόντων
- 1% Διαλύματος μίγματος πενικιλίνης/στρεπτομικίνης, P/S, (5 ml), για την αποφυγή μικροβιακής επιμόλυνσης, ώστε  $C_{\text{τελική}} = 100\text{u/ml P}, 100\ \mu\text{g/ml S}$
- 1% Διαλύματος αμινοξέος L-γλουταμίνης, (5 ml), ώστε  $C_{\text{τελική}} = 2\ \text{mM}$

## 2) Κρυοπροστατευτικά διαλύματα κυττάρων

- **10% Διαλύματος DMSO (0,1ml)**

Το DMSO (DiMethyl SulfOxide) αποτελεί μια οργανοφωσφορική ένωση με χημικό τύπο  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ . Το άχρωμο αυτό διάλυμα είναι ένας σημαντικός πολικός διαλύτης που έχει την ικανότητα να διαλύει τόσο πολικές όσο και μη πολικές ενώσεις και να αναμειγνύεται με ένα ευρύ φάσμα οργανικών διαλυτών, καθώς και το νερό. Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό για τη συντήρηση οργάνων, ιστών και κυττάρων. Παρά την κυτταροτοξικότητά του, εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων στις κυτταρικές μεμβράνες και επιφάνειες και είναι ιδιαίτερα σημαντικό στο πάγωμα και στη μακροχρόνια αποθήκευση πολλών ειδών κυττάρων.

- **90% Διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS (0,9 ml)**

Το διάλυμα FBS είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα ορού για την *in vitro* καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή περιεκτικότητά του σε αντισώματα. Ωστόσο, περιέχει πολλούς αναπτυξιακούς/αυξητικούς παράγοντες, που το καθιστούν κατάλληλο για χρήση σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές κυτταροκαλλιέργειας. Η σφαιρική πρωτεΐνη της αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA) αποτελεί το πιο σημαντικό συστατικό του διαλύματος. Η μεγάλη ποικιλία των πρωτεϊνών του FBS διατηρεί τα καλλιεργούμενα κύτταρα σε ένα μέσο στο οποίο μπορούν να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαχωριστούν.

Ο ορός αποθηκεύεται στην κατάψυξη, για τη διατήρηση της σταθερότητας των στοιχείων του, όπως οι αυξητικοί παράγοντες.

### **3) Διάλυμα για ανακαλλιέργεια μονόστιβης κυτταρικής καλλιέργειας (θρυψινοποίηση)**

#### **Θρυψίνη**

Για την επίτευξη της διαδικασίας θρυψινοποίησης και αποκόλλησης των κυττάρων από το ταπήτιο των φλασκών κυτταροκαλλιέργειας, χρησιμοποιείται διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0,25%. Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA έχει την ικανότητα να δεσμεύει δισθενή κατιόντα ( $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ ) από τα κύτταρα, καθιστώντας τα ανίκανα να παραμείνουν προσδεδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής τους. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συλλέγονται ως εναιώρημα σε θρεπτικό υλικό. Το θρεπτικό υλικό αδρανοποιεί τη δράση της θρυψίνης. Η δράση του ενζύμου είναι καταστρεπτική για τα κύτταρα όταν αυτά εκτεθούν για μεγάλη χρονική διάρκεια σε αυτό. Επίσης, το pH του διαλύματος δεν πρέπει να είναι μικρότερο του 7, καθώς τέτοιες τιμές μειώνουν τη δραστηριότητα της θρυψίνης, αλλά επιπλέον δεν πρέπει να ξεπερνά το 8, τιμές καταστρεπτικές για τα κύτταρα. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Gibco. Το διάλυμα θρυψίνης-EDTA χωρίζεται σε επιμέρους κλάσματα όγκου 10 ml, τα οποία φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , ενώ το κλάσμα προς χρήση φυλάσσεται σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **4) Διάλυμα για επιλογή κυττάρων HepG2-mtGFP και HepG2-mtGFPGR**

Το διάλυμα για την επιλογή των κυττάρων των δύο διαφορετικών σειρών παρασκευάζεται με την προσθήκη 100 mg του αντιβιοτικού της νεομυκίνης (G418) σε 100 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM, ώστε η τελική συγκέντρωση ( $C_{\text{τελική}}$ ) να είναι ίση με 1 mg/ml. Η επιλογή των κυττάρων HepG2-mtGFP και HepG2-mtGFPGR πραγματοποιείται προκειμένου να απομονωθούν τα κύτταρα εκείνα που διατηρούν τον πλασμιδιακό φορέα pEGFPC2, ο οποίος φέρει το μιτοχονδριακά στοχευμένο γονίδιο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε υβριδική μορφή με την GFP πρωτεΐνη ή το γονίδιο της GFP με μιτοχονδριακή στόχευση. Η επιλογή του συγκεκριμένου αντιβιοτικού βασίζεται στο γεγονός ότι ο πλασμιδιακός φορέας pEGFPC2 φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι της νεομυκίνης. Επομένως, παρουσία του αντιβιοτικού, τα κύτταρα τα οποία διατηρούν το φορέα αποκτούν ανθεκτικότητα, επιβιώνουν και αναπτύσσονται φυσιολογικά στην καλλιέργεια.

Αντίθετα, τα κύτταρα τα οποία απορρίπτουν ή δεν έχουν διαμολυνθεί με το συγκεκριμένο φορέα καθίστανται ευαίσθητα και τελικά πεθαίνουν υπό την επίδραση της νεομυκίνης.

## **5) Διαλύματα για την έκπλυση, συλλογή και λύση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR**

### **A) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) (1x)**

Το διάλυμα PBS έχει πολλές χρήσεις, επειδή είναι ισοτονικό και μη τοξικό για τα κύτταρα. Ανάμεσα στις χρήσεις αυτές συμπεριλαμβάνεται το ξέπλυμα των κυττάρων σε καλλιέργεια. Επίσης, σε συνδυασμό με το EDTA, το διάλυμα PBS χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση και αποκόλληση των κυτταρικών συσσωματωμάτων. Ωστόσο, δισθενή μέταλλα, όπως ο ψευδάργυρος, δεν μπορούν να προστεθούν, καθώς θα οδηγήσουν σε καθίζηση. Η σύσταση του διαλύματος PBS απεικονίζεται ακολούθως:

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **B) Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Lysis buffer)**

Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης είναι ένα διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μοριακής βιολογίας που αναλύουν τα κυτταρικά συστατικά (π.χ. Western blot). Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που μπορούν να εφαρμοστούν, ανάλογα με το τι ανάλυση θα υποστεί το κυτταρικό εκχύλισμα..

Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες ώστε να μπορούν να μεταναστεύουν μεμονωμένα εντός της πηκτής ηλεκτροφόρησης. Συγκεκριμένα, η μη ιονική επιφανειοδραστική ουσία Triton X-100 συμβάλλει στη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών κάτω από ήπιες, μη αποδιατακτικές συνθήκες, ενώ οι διαφορετικοί αναστολείς των πρωτεολυτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένου του

αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), χρησιμοποιούνται προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δεν θα διασπαστούν πριν από την επιθυμητή ανάλυση. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης απεικονίζεται ακολούθως:

- 3 mM EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid)
- 250 mM NaCl
- 0,5 % Triton X-100
- 20mM Tris, pH = 7,5

**6) Διαλύματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)**

**I. Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (Running buffer) (V = 1 L)**

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). Αυτό συνήθως χρησιμοποιείται τόσο για το ρυθμιστικό διάλυμα της ανόδου όσο και για αυτό της καθόδου. Η φύλαξή του πρέπει να γίνεται σε ξηρό μέρος με καλό εξαερισμό. Οι συστάσεις τόσο του πυκνού (10x) όσο και του αραιού (1x) ρυθμιστικού διαλύματος απεικονίζονται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1:** Σύσταση πυκνού (10x) και αραιού (1x) ρυθμιστικού διαλύματος

	Running Buffer (10x)		Running Buffer (1x)	
	C <sub>τελική</sub> (mM)	gr/L	C <sub>τελική</sub> (mM)	gr/L
Αντιδραστήρια				
Tris, pH=8,3	250	30,3	25	3,03
Γλυκίνη	1920	144	192	14,4
SDS	0,1 %	10	0,1%	10
ddH <sub>2</sub> O (L)	1	1	1	1
Ολικός όγκος (L)	1	1	1	1

## II. Διαλύματα stock για πηκτή πολυακρυλαμιδίου

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης  $C = 1,5M$ ,  $pH = 8,8$

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος διαλυτοποιούνται 18,17 gr Tris σε 100 ml διαλύματος HCl.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης  $C = 1,5M$ ,  $pH = 6,8$

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος διαλυτοποιούνται 9,085 gr Tris σε 50 ml διαλύματος HCl.

- SDS 10% v/w

Για την παρασκευή του διαλύματος διαλυτοποιούνται 10 g SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε 90 ml  $H_2O$ . Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται μέχρι τα 100 ml με  $H_2O$  και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Ακρυλαμίδιο 40% v/w (ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο : 29/1) διαλυτοποιημένο σε dd $H_2O$
- dd $H_2O$

## III. Διάλυμα φόρτωσης (Loading Buffer) (4x)

Το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) περιέχει μπλε της βρωμοφαινόλης και γλυκερόλη. Το μπλε της βρωμοφαινόλης είναι μια χρωστική ιχνηλασιμότητας χαμηλού μοριακού βάρους με αρνητικό φορτίο και, επομένως, κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με τις πρωτεΐνες, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης. Η γλυκερόλη με τη σειρά της αυξάνει την πυκνότητα των δειγμάτων, ώστε να διευκολυνθεί η εισαγωγή τους στις υποδοχές (wells) της πηκτής ηλεκτροφόρησης. Η σύσταση του διαλύματος φόρτωσης απεικονίζεται ακολούθως:

- Tris συγκέντρωσης  $C=1,5 M$ ,  $pH=6,8$
- 10% Γλυκερόλη
- 10% SDS
- 5% β-Μερκαπτοαιθανόλη
- 1% Μπλε της βρωμοφαινόλης

## 7) Διαλύματα για την πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Ανάλογα με τις διαστάσεις της πηκτής πολυακρυλαμιδίου και τον επιθυμητό βαθμό διαχωρισμού των πρωτεϊνικών δειγμάτων, αναζητούνται οι αντίστοιχοι πίνακες για την ποσότητα των διαλυμάτων stock που θα πρέπει να αναμειχθούν και των καταλυτών APS 10% και TEMED που προστίθενται στο τέλος. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου για τις πηκτές διαχωρισμού (separating/running gel) και επιστοιίβασης (stacking gel), καθώς και οι αντίστοιχοι όγκοι των stock διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται απεικονίζονται στον Πίνακα 3.2.

**Πίνακας 3.2:** Συγκεντρώσεις πηκτών ακρυλαμιδίου και αντίστοιχοι όγκοι stock διαλυμάτων

Διαλύματα	Stacking gel (4%)	Separating gel		
		(7,5%)	(10%)	(12%)
ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml	2,738 ml	2,425 ml	2,175 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=8,8	-	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=6,8	0,21 ml	-	-	-
SDS 10%	25 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Ακρυλαμίδιο 40% v/w	0,25 ml	0,9375 ml	1,25 ml	1,5 ml
APS	12,5 μl	25 μl	25 μl	25 μl
TEMED	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl

## 8) Διάλυμα για ανοσοανίχνευση κατά Western (Western blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

### Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) (1x)

Το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) περιέχει έναν αγωγίμο, ισχυρό ρυθμιστικό παράγοντα (Tris), προκειμένου να διατηρηθεί η αγωγιμότητα και το pH του συστήματος κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Επιπλέον, η αλκοόλη (μεθανόλη) μπορεί να συμπεριληφθεί στο διάλυμα για την διευκόλυνση της δέσμευσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και το προστιθέμενο SDS μπορεί να διευκολύνει την έκλυση των πρωτεϊνών από την πηκτή. Η σύσταση του αραιού (1x) διαλύματος μεταφοράς απεικονίζεται ακολούθως:

- 25 mM Tris
- 192 mM Γλυκίνη
- 0,1% SDS
- Μεθανόλη 20%

## 9) **Blocking Buffer**

Η λεγόμενη διαδικασία blocking της μεμβράνης εμποδίζει τη μη ειδική σύνδεση των πρωτογενών και/ή των δευτερογενών αντισωμάτων στη μεμβράνη, η οποία έχει μεγάλη χωρητικότητα σε προσδεδεμένες πρωτεΐνες κι, επομένως, σε αντισώματα. Για την παρασκευή του blocking διαλύματος διαλυτοποιείται 1g άπαχου γάλακτος σε σκόνη (Regilait) σε 10 ml διαλύματος PBS-T (10% milk).

## 10) **Διάλυμα για πλύσεις μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (PBS-T)**

Το πλύσιμο της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό (π.χ. PBS ή TBS pH 7,5 που περιέχει 0,1% Tween 20) πραγματοποιείται ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και το μέρος αυτού που δεν έχει συνδεθεί ειδικά. Η σύσταση του διαλύματος έκπλυσης απεικονίζεται ακολούθως:

- 0,1% Tween 20
- 100 ml PBS 10x
- 900 ml ddH<sub>2</sub>O

## 11) **Διαλύματα για ανίχνευση σήματος**

Για την ανίχνευση του πρωτεϊνικού σήματος το ένζυμο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP) για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο χημειοφωταυγή υποστρώματα που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα. Η αλληλεπίδραση του ενζύμου με το υπόστρωμά του οδηγεί στο σχηματισμό ενός φωσφορίζοντος προϊόντος, το οποίο, καθώς εκφυλίζεται,



αυθόρμητα παράγει φως. Η αντίδραση του προϊόντος της αντίδρασης γίνεται με έκθεση της μεμβράνης σε ευαίσθητο φιλμ ακτίνων X. Ο φωσφορισμός καταγράφεται στη θέση που βρίσκεται το ένζυμο κι, επομένως, η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για αυτή τη διαδικασία είναι τα ακόλουθα:

- Διάλυμα υπεροξειδίου  $H_2O_2$  (Chemilucifer Peroxide Solution) (Chemicon)
- Διάλυμα διαλυτοποίησης υπεροξειδίου  $H_2O_2$  (Chemilucifer Peroxide Buffer) (Chemicon)
- Διάλυμα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος (Luminol/Enhancer Solution) (Chemicon)
- Διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer and Replenisher) (Kodak)
- Διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer and Replenisher) (Kodak)

### 3.1.2 Χημικά

- APS (Ammonium PerSulfate) (Sigma)
- DMEM (Sigma, Gibco)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco)
- KCl (Merck)
- $KH_2PO_4$  (Merck)
- $Na_2HPO_4$  (Merck)
- NaCl (Panreac)
- $NaH_2PO_4$  (Merck)
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Sigma)
- Skimmed Milk (Regilait)
- TEMED (N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine) (Research Organics)
- Tris base (Merck)
- Trypsin-EDTA 0,25% 1x (Gibco)

- Tween 20 (Euroclone)
- Αιθανόλη (Merck)
- Ακρυλαμίδιο (Sigma)
- β-Μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haen)
- Γλυκερόλη (Panreac)
- Γλυκίνη (AppliChem)
- Bis-ακρυλαμίδιο (Sigma)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Μπλε της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
- Triton X-100
- EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-rad)

### 3.1.3 Αντισώματα

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοανίχνευση κατά Western (Western blot) είναι τα εξής:

- 1ο: Πολυκλωνικό αντίσωμα H-300 από κόνικλο (rabbit H-300) (Santa Cruz)

Το αντίσωμα H-300 συνιστάται για την ανίχνευση των ισομορφών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GR $\alpha$ /β σε ποντίκια, αρουραίους και στον άνθρωπο μέσω της ανοσοανίχνευσης κατά Western (αρχική αραίωση 1:200). Επίσης, συνιστάται για την ανίχνευση του GR $\alpha$ /β σε διαφορετικά είδη, συμπεριλαμβανομένων των ιπποειδών και βοοειδών. Το διάλυμα του αντισώματος φυλλάσσεται στους 4 °C και παραμένει σταθερό ακόμη και μετά από ένα χρόνο.

- 2ο: Anti-rabbit Horseradish Peroxidase HRP

Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει τις σταθερές περιοχές του πρώτου αντισώματος και χρησιμοποιείται ως conjugate, είναι δηλαδή χημικά συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP), του οποίου η χημική αντίδραση τελικά ανιχνεύεται.

- 2ο: Μονοκλωνικό αντίσωμα anti-β-ακτίνης από μυ (mouse) (Sigma)

Η β-ακτίνη είναι η κυριότερη πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού κι εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα. Η πεπτιδική αλυσίδα 42 kDa της πρωτεΐνης συναντάται σε δύο φυσικές διαμορφώσεις: τη σφαιρική ακτίνη και την ινώδη ακτίνη, η οποία, σε συνδυασμό με τη μυοσίνη, προκαλεί τη σύσπαση των μυών. Σε μη μυϊκά κύτταρα, η ακτίνη φαίνεται να εμπλέκεται σε μια ποικιλία λειτουργιών, όπως την κινητικότητα των κυττάρων, την εξωκυττάρωση και τη φαγοκυττάρωση. Η κατανομή των έξι γνωστών ισομορφών της ακτίνης, τεσσάρων μυικών και δύο κυτταροπλασματικών, είναι ιστο-ειδική.

Το συγκεκριμένο αντίσωμα δεσμεύεται σε έναν επίτοπο σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή της ακτίνης και, ως εκ τούτου, αντιδρά με όλες τις έξι ισομορφές της ακτίνης των θηλαστικών. Ο επίτοπος που αναγνωρίζεται από το αντίσωμα φαίνεται να βρίσκεται στα δύο τρίτα της N-τελικής περιοχής του μορίου της ακτίνης, ενδεχομένως κοντά στα αμινοξέα 50-70. Αντιδρά τόσο με σφαιρικές όσο και με ινώδεις μορφές της ακτίνης και δεν παρεμβάλλεται στον πολυμερισμό της για το σχηματισμό ινιδίων.

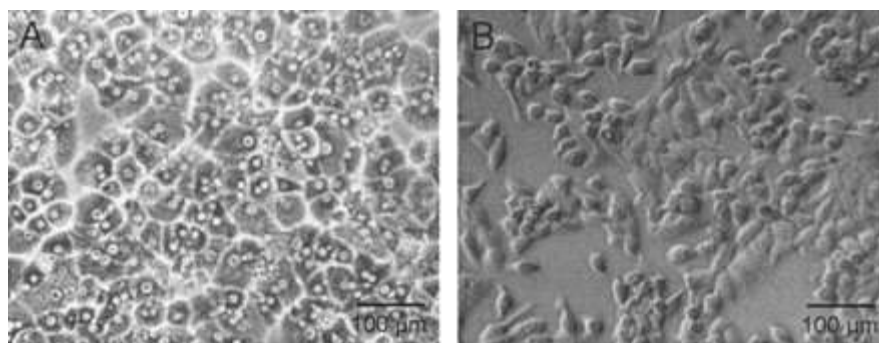
### 3.1.4 Κυτταρικές σειρές

Όλοι οι τύποι των κυττάρων χαρακτηρίζονται από δύο στοιχεία: την αποικία (Column, C) και το πέρασμα (Passage, P). Ο αριθμός της αποικίας χρησιμοποιείται για τη διάκριση της χρησιμοποιούμενης αποικίας των κυττάρων από την αρχική καλλιέργεια. Μέσω της διαδικασίας του περάσματος (passaging) τα κύτταρα διατηρούνται ζωντανά και αναπτύσσονται σε συνθήκες καλλιέργειας για εκτεταμένη χρονική περίοδο. Ο αριθμός που χρησιμοποιείται, αντικατοπτρίζει ουσιαστικά τον αριθμό των θρυψινοποιήσεων μέσω των οποίων τα κύτταρα έχουν επεξεργαστεί.

- **Κύτταρα HepG2**

Τα HepG2 αποτελούν μια συνεχή κυτταρική σειρά που προέρχεται από το ήπαρ ενός 15χρονου Καυκάσιου Αμερικανού με ένα καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτά τα κύτταρα σε μορφολογία είναι επιθηλιακά και έχουν ένα μοντέλο χρωμοσωμικού αριθμού ίσου με 55. Εκκρίνουν πληθώρα σημαντικών πρωτεϊνών του πλάσματος όπως αλβουμίνη, τρανσφερίνη, αλφα 2-μακροσφαιρίνη, αλφα 1-αντιθρυψίνη και τρανσφερίνη του πλασμινογόνου. Τα HepG2 κύτταρα έχουν αναπτυχθεί επιτυχώς σε μεγάλης κλίμακας συστήματα καλλιέργειας και μπορούν να αποκριθούν σε διέγερση με ανθρώπινη αυξητική ορμόνη.

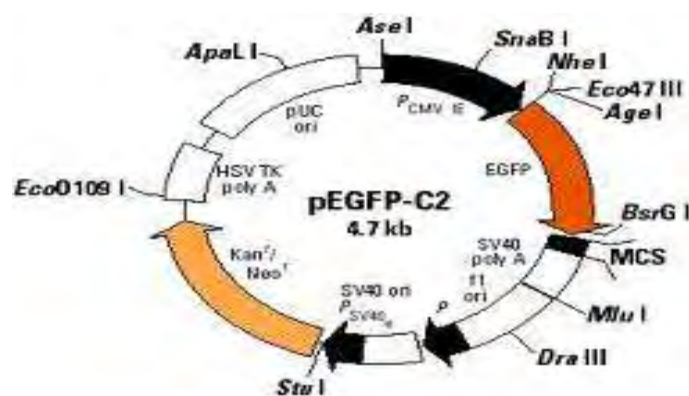
Λόγω του υψηλού βαθμού της μορφολογικής και λειτουργικής διαφοροποίησής τους *in vitro* (Εικόνα 12), τα HepG2 κύτταρα είναι ένα κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη της ενδοκυτταρικής μεταφοράς και του μεταβολισμού στο ήπαρ, της τοξικότητας των ξενοβιοτικών ουσιών, της ανίχνευσης των κυτταροπροστατευτικών, αντι των περιβαλλοντικών και διατροφικών γενετοξικών παραγόντων, της κατανόησης της ηπατοκαρκινογένεσης, καθώς και για τις μελέτες στόχευσης φαρμάκων.



Εικόνα 12. Μορφολογική σύγκριση (A) ανθρώπινων ηπατικών κυττάρων με την κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2 (B).

- **Κύτταρα HepG2-mtGFP**

Για την παραγωγή της σταθερής κυτταρικής σειράς HepG2-mtGFP (κύτταρα ελέγχου), τα κύτταρα HepG2 επιμολύνονται με την κατασκευή pmtEGFPC2. Η κατασκευή αυτή δημιουργείται με την εισαγωγή της αλληλουχίας ctgtaacacccaaccagcccgacaatatacaccaccgaggatctccttgaca, η οποία κωδικοποιεί ένα μιτοχondριακό πεπτιδίο στόχευσης, σε πλαίσιο με το γονίδιο της ενισχυμένης πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Enhanced Green Fluorescence Protein, EGFP) μεταξύ των θέσεων *NheI* και *AgeI* του φορέα pEGFPC2 (Clontech) (Εικόνα 13) (Psarra et al, 2011).



Εικόνα 13. Πλασμιδιακός φορέας pEGFPC2

Οι αποικίες των κυττάρων HepG2-mtGFP που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοανίχνευση κατά Western και για τον εμβολιασμό αρσενικών μυών, καθώς και για τον έλεγχο του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους είναι η C<sub>4</sub> P<sub>7</sub> και η C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>, αντίστοιχα.

- **Κύτταρα HepG2-mtGFRGR**

Για την απόκτηση σταθερής έκφρασης του ανθρώπινου μιτοχondριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, το αντίστοιχο γονίδιο (κωδικός εγγραφής X03225) εισάγεται στην κατασκευή pmtEGFPC2 στη θέση *BamHI* (pmtEGFPC2-GR). Η παραγόμενη κατασκευή επιμολύνει κύτταρα HepG2 μέσω της λιποφεκταμίνης 2000,

σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι αποικίες των κυττάρων HepG2-mtGFPGR που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του ρυθμού πολλαπλασιασμού τους, για την ανοσοανίχνευση κατά Western, καθώς και για τον εμβολιασμό αρσενικών μυών είναι οι C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> και C<sub>21</sub> P<sub>4</sub>, οι C<sub>14</sub> P<sub>7</sub>, C<sub>2</sub> P<sub>18</sub> και C<sub>21</sub> P<sub>4</sub>, και η C<sub>2</sub> P<sub>18</sub>, αντίστοιχα.

### 3.1.5 Όργανα

Τα όργανα και τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν από την αίθουσα κυτταροκαλλιεργειών και το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας είναι τα ακόλουθα:

- Γυάλινες πιπέτες Pasteur
- Πλαστικά στατώ
- Πλαστικά φυαλίδια erpendorfs, όγκου V = 1,5 ml, τύπου SARSTEDT
- Φυγόκεντρος τύπου Centronic BL II, J.P Selecta
- Μικροφυγόκεντρος τύπου Centrifuge 5415D erpendorf
- Τρυβλία και φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας με επιφάνεια καλλιέργειας 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> τύπου Corning
- Multidishes με 6, 24 και 96 πηγάδια (wells)
- Αυτόματες πιπέτες, όγκων V = 0,5-10, 2-20, 20-200, 100-1000 μL, τύπου Labnet Autoclavable
- Ρύγχη πιπετών τύπου SARSTEDT
- Επωαστικός Κλίβανος (επωαστήρας) τύπου New Brunswick, Galaxy 170 (T = 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)
- Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο)
- Οπτικό μικροσκόπιο τύπου A KRUSS OPTRONIC
- Πλαστικές αριθμημένες πιπέτες όγκου V = 1, 2, 5, 10, 25 ml τύπου SARSTEDT
- Πιπεταδόρος με ηλεκτρική αντλία τύπου FastPette V-2, Labnet Laboratories
- Αναδευτήρας τύπου Heidolph Rotamax 120
- Ηλεκτρονικός ζυγός τύπου KERN EW
- Υδατόλουτρο τύπου J.P Selecta, Precisdig
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες falcon όγκου V = 15, 50 ml, τύπου SARSTEDT
- Ομογενοποιητής/συσκευή παραγωγής υπερήχων (sonicator) τύπου Wisd Laboratory Instruments
- Φυαλίδια cryovials όγκου V = 5 ml

- Πλαστικό ξύστρο (scraper) για συλλογή κυττάρων
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα (απαγωγός) (Laminar Air Flow) τύπου TELSTAR AV 30/70
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης τύπου BIO-RAD
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς για ανοσοανίχνευση κατά Western τύπου BIO-RAD (Mini-Protean Tetra System)
- Συσκευή για αεροστεγή σφράγιση μεμβρανών τύπου Electric Heating Equipment, Impulse Sealer Type Tish-200
- Φασματοφωτόμετρο τύπου Spectronic 20 Genesys
- Συσκευή τροφοδοσίας ρεύματος τύπου Elite 200 Wealtec
- Συσκευή θέρμανσης δειγμάτων τύπου Thermoleader Dry Block Heat Bath
- Vortex
- Ηλεκτρονικός ζυγός τύπου KERN ALS-220-4N
- Συσκευή διήθησης τύπου Corning

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Διαδικασίες για καλλιέργεια, μέτρηση, επιλογή, συλλογή και λύση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR

#### I. Απόψυξη κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Στη συνέχεια, τα φυαλίδια cryovials με τα περιεχόμενα κύτταρα, που φυλάσσονται στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , τοποθετούνται με προσοχή στο υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ώστε να ξεπαγώσουν. Το πάμα των φυαλιδίων δεν θα πρέπει να βυθίζεται στο νερό του υδατόλουτρου για να αποφευχθεί η μόλυνση. Αφού ξεπαγώσουν τα κύτταρα, γίνεται αποστείρωση των φυαλιδίων με 70% αιθανόλη εξωτερικά, ώστε να είναι δυνατό να μεταφερθούν στον απαγωγό. Έπειτα, ακολουθεί η μεταφορά του 1 ml των κυττάρων σε πλαστικούς σωλήνες falcon όγκου 15 ml στους οποίους έχει προηγηθεί η προσθήκη 9 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM (συνολικός όγκος 10 ml). Το συγκεκριμένο βήμα πρέπει να πραγματοποιείται γρήγορα, καθώς το διάλυμα DMSO, το οποίο καταψύχεται μαζί με τα κύτταρα, αρχίζει να εκφράζει την τοξικότητά του σε αυτά κατά την απόψυξη. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 στροφές, για πέντε λεπτά, στους

25 °C προκειμένου να απομακρυνθεί το τοξικό DMSO. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml θρεπτικού μέσου DMEM. Ακολουθούν αρκετές επανααιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Αυτό, τελικά, μεταφέρεται στις κατάλληλες φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας, 25 και 75 cm<sup>2</sup>, για τα κύτταρα HepG2-mtGFP/HepG2-mtGFPGR και HepG2, αντίστοιχα. Για τα τελευταία κύτταρα, συμπληρώνονται 10 ml διαλύματος DMEM. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων στον κλίβανο, στους 37°C, για 4-5 ημέρες προκειμένου να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν στο ταπήτιο των πλαστικών φλασκών.

## **II. Ανακαλλιέργεια μονόστιβης κυτταρικής καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση)**

Λόγω του συνεχούς εκθετικού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αναγκαία συνθήκη για τη συντήρηση της κυτταρικής καλλιέργειας, είναι η αραιώση και επανακαλλιέργεια των κυττάρων σε μικρότερη συγκέντρωση ή η μεταφορά τους σε μεγαλύτερα σκεύη κυτταροκαλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-90% του ταπητίου της φλάσκας κυτταροκαλλιέργειας (confluency), τότε πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια των κυττάρων μέσω της διαδικασίας της θρυψινοποίησης.

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Τα κύτταρα παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο προκειμένου να ελεγχθεί η μορφολογία τους, καθώς και η πληρότητα του ταπητίου της φλάσκας καλλιέργειάς τους (confluency). Έπειτα, απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας, DMEM, και προστίθεται ο κατάλληλος όγκος διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25%. Για τις φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας των 25 cm<sup>2</sup> προστίθεται 1 ml διαλύματος, ενώ για εκείνες των 75 cm<sup>2</sup> προστίθενται 3 ml. Στη συνέχεια, ανακινείται η φλάσκα έτσι ώστε το διάλυμα της θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο και μεταφέρεται στον κλίβανο, στους 37°C, για περίπου 3-4 λεπτά προκειμένου να ασκήσει τη δράση του το ένζυμο. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, η φλάσκα απομακρύνεται από τον κλίβανο και ανακινείται με ελαφρά χτυπήματα προκειμένου τα κύτταρα να



αποκολληθούν από το ταπήτιο της φλάσκας. Παράλληλα, τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για να προσδιοριστεί αν παραμένουν προσδεδεδεμένα στην επιφάνεια ανάπτυξής τους. Στη συνέχεια, ακολουθούν μερικές επανααιωρήσεις των κυττάρων στο διάλυμα θρυψίνης-EDTA προκειμένου αυτά να διαχωριστούν μεταξύ τους και προστίθεται ο απαιτούμενος όγκος θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η αντίδραση και η δράση της θρυψίνης. Για όγκο διαλύματος θρυψίνης-EDTA ίσο με 1 ml προστίθενται 4 ml διαλύματος DMEM, ενώ για όγκο ίσο με 3 ml προστίθενται 7 ml θρεπτικού μέσου. Το δημιουργούμενο διάλυμα των κυττάρων μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες falcon όγκου 15ml και ακολουθεί φυγοκέντρησή του στις 1000 στροφές, για πέντε λεπτά, στους 25 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται σε 4 ml θρεπτικού μέσου DMEM. Ακολουθούν αρκετές επανααιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Έπειτα, λαμβάνεται η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων (1,2 ml για τα κύτταρα HepG2 και 0,4 ml για τα HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR) για τη νέα ή τις νέες φλάσκες και προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM (13,8 ml και 4,6 ml αντίστοιχα). Τέλος, τα κύτταρα κατανέμονται με ανακίνηση ομοιόμορφα σε όλο το ταπήτιο της φλάσκας ώστε να αναπτυχθούν.

### **III. Αποθήκευση και φύλαξη κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR στους -80 °C (stock)**

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και της φυγοκέντρησης των κυττάρων, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα επαναδιαλυτοποιείται στον κατάλληλο όγκο διαλύματος Fetal Bovine Serum, FBS (0,9 ml για κάθε φυαλίδιο cryovial που θα φυλαχθεί). Ακολουθούν αρκετές επανααιωρήσεις, ώστε τα κύτταρα να διαχωριστούν, να γίνουν μεμονωμένα και να παραληφθεί το ομοιογενές εναιώρημά τους. Στη συνέχεια, το δημιουργούμενο κυτταρικό διάλυμα διαχωρίζεται ισόποσα στα φυαλίδια σε καθένα από τα οποία προστίθεται, τελικά, 0,1 ml διαλύματος DMSO. Μετά από μερικές

ήπιες αναδεύσεις των φυαλιδίων, αυτά μεταφέρονται γρήγορα για αποθήκευση στους  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  προκειμένου το διάλυμα DMSO να μην προφτάσει να εκδηλώσει την τοξικότητά του στα κύτταρα.

#### **IV. Επιλογή κυττάρων HepG2-mtGFP και HepG2-mtGFPGR**

Αρχικά, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Στη συνέχεια, σε 100 ml πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM προστίθενται 100 mg αντιβιοτικού νεομυκίνης και το προκύπτον εμπλουτισμένο διάλυμα διηθείται με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής προκειμένου να είναι πλήρως αποστειρωμένο. Στη συνέχεια και μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, τα κύτταρα των δύο σειρών (αραιωμένα κατά 30 φορές) μεταφέρονται σε πλαστικές φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας  $75\text{ cm}^2$ , στις οποίες μετά την αρχική τους ανάπτυξη προστίθενται 15 ml εμπλουτισμένου μέσου. Τα κύτταρα μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού αφήνονται να αναπτυχθούν στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , για ένα διάστημα δέκα ημερών, με μια ενδιάμεση ανανέωση του θρεπτικού τους μέσου.

#### **V. Επίστρωση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR σε multidishes 24 και 96 πηγαδιών (wells)**

Μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης και της μέτρησης με το αιμοκυτταρόμετρο (όπως περιγράφεται παρακάτω), πραγματοποιούνται οι απαραίτητοι υπολογισμοί προκειμένου τα κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP και HepG2-mtGFPGR να επιστρωθούν σε multidishes 24 και 96 πηγαδιών (wells), ώστε σε κάθε well να περιέχονται 50000 και 2000 κύτταρα (όγκοι 0,5 ml και 200  $\mu\text{l}$  κυτταρικού εναιωρήματος/well, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τους υπολογισμούς αυτούς, το σύνολο των κυττάρων που μετράται με το αιμοκυτταρόμετρο διαιρείται με 4 κι εν συνεχεία, πολλαπλασιάζεται με  $10^4$  προκειμένου να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος. Έπειτα, υπολογίζεται ο όγκος του εναιωρήματος που απαιτείται για το διαμοιρασμό του στα 24 και 96 wells.

Τελικά, υπολογίζεται ο όγκος του θρεπτικού μέσου DMEM που πρέπει να συμπληρωθεί.

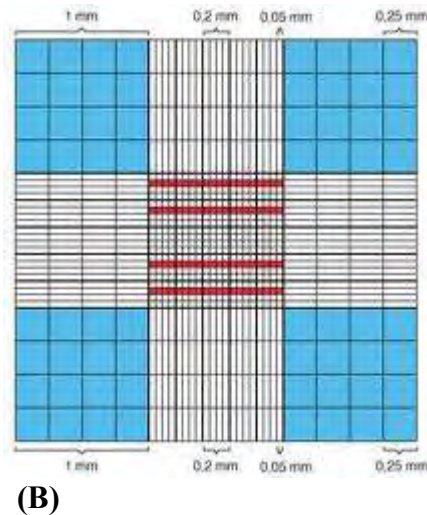
## VI. Ημερήσια μέτρηση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR με αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)

Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Newbauer). Το αιμοκυτταρόμετρο (Εικόνα 14A) είναι μια τροποποιημένη και διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που περιέχει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες. Σε κάθε μια από αυτές διακρίνεται μια διαγράμμιση σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm (συνεπάγεται ότι το εμβαδόν του τετραγώνου είναι  $1\text{mm}^2$ ). Η πλάκα Newbauer έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο, όμως, αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας.

Το καθένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους μόλις 2,5  $\mu\text{m}$ , που χρησιμεύουν για τον καθορισμό της θέσης των κυττάρων (το αν αυτά βρίσκονται μέσα ή έξω από το πλέγμα). Το κάθε τετράγωνο εμφανίζει διαβαθμίσεις (χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα) που εξυπηρετούν την ευκολότερη μέτρηση των κυττάρων (Εικόνα 14B).



(A)



Εικόνα 14. (Α) Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο). (Β) Σχηματική απεικόνιση της διαγράμμισης σε μορφή τετραγωνισμένου πλέγματος, το οποίο αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm.

Το αιμοκυτταρόμετρο εμφανίζει δυο ίσου μεγέθους, λείες, προεξέχουσες επιφάνειες, με επίπεδο παράλληλο με τις διαγραμμισμένες, που ονομάζονται «ράχες», και στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Οι διαγραμμισμένες επιφάνειες βρίσκονται 0,1 mm χαμηλότερα από τις «ράχες». Μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης γυαλισμένης επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια (αυλάκωση).

Αρχικά, το αιμοκυτταρόμετρο αποστειρώνεται με 70 % αιθανόλη. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στην κοίλη επιφάνειά του με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος, τα οποία με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνονται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο οπτικό μικροσκόπιο και εξετάζεται με μεγέθυνση 100x. Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει ένα από τα εννέα τετράγωνα είναι  $0,1 \text{ mm}^3$  ( $1,0 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$ ) ή  $1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ . Έτσι, η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (σε κύτταρα / ml) είναι: Μέτρηση στο ένα από τα κύρια τετράγωνα  $\times 10.000$ .

## Διαδικασία

Επί καθημερινής βάσεως, όλα τα απαιτούμενα όργανα και υλικά αποστειρώνονται με 70 % αιθανόλη και μεταφέρονται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής όπου οι συνθήκες πρέπει να είναι στείρες. Στη συνέχεια, ανά δύο ή τρία wells των multidishes, πραγματοποιούνται μετρήσεις του αριθμού των τριών ειδών κυττάρων. Αρχικά, αφαιρείται από τα wells (με την ίδια πιπέτα Pasteur για το ίδιο είδος κυττάρων) το θρεπτικό μέσο DMEM. Με την αυτόματη πιπέτα των 200 μl, προστίθενται στα wells 50 μl διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25%. Στη συνέχεια, το multidish μεταφέρεται στον κλίβανο, στους 37 °C, για περίπου 1-2 λεπτά προκειμένου να ασκήσει τη δράση του το ένζυμο. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, το multidish απομακρύνεται από τον κλίβανο και ακολουθούν μερικές εκπλύσεις του ταπητίου των wells, όπως και επανααιωρήσεις των κυττάρων στο διάλυμα θρυψίνης-EDTA προκειμένου αυτά να αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξής τους και να διαχωριστούν μεταξύ τους. Έπειτα, προστίθενται 200 μl θρεπτικού υλικού με την αυτόματη πιπέτα των 1.000 μl για να σταματήσει η αντίδραση και η δράση της θρυψίνης. Η προσθήκη αυτή στα wells προηγείται των αναδύσεων και της μεταφοράς των διαλυμάτων σε πλαστικά erpendorfs όγκου V = 1,5 ml. Ακολούθως, τα wells ξεπλένονται με 250 μl διαλύματος DMEM, τα οποία και μεταφέρονται στα erpendorfs, ώστε να συμπεριληφθεί στις μετρήσεις το σύνολο των κυττάρων. Τελικά, με την αυτόματη πιπέτα των 20 μl μεταφέρονται (μετά από καλή ανάδευση) στο αιμοκυτταρόμετρο 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος για τη μέτρηση στο οπτικό μικροσκόπιο του αριθμού των τριών ειδών κυττάρων. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων πολλαπλασιάζεται με 0,5 που ήταν και ο όγκος του προκύπτοντος κυτταρικού εναιωρήματος/well.

## VII. Συλλογή και λύση κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR (αποικίες C<sub>2</sub> P<sub>18</sub>, C<sub>14</sub> P<sub>7</sub>, C<sub>21</sub> P<sub>4</sub>)

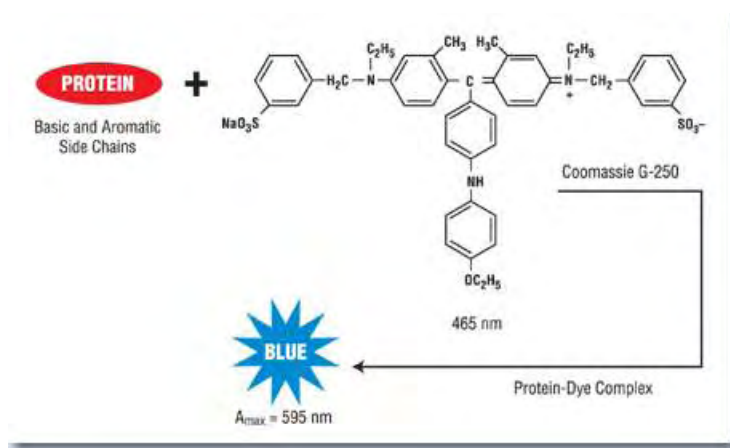
Για τη διαδικασία της συλλογής, τα κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP και HepG2-mtGFPGR επιστρώνονται σε μεγάλα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας και σε multidishes 6 πηγαδιών (wells) αντίστοιχα, με κάθε μια κυτταρική αποικία HepG2-

mtGFPGR να καταλαμβάνει δύο wells και ο τελικός όγκος του κυτταρικού διαλύματος να είναι ίσος με 2 ml/well. Όταν τα κύτταρα αναπτυχθούν ικανοποιητικά και καλύψουν το μεγαλύτερο τμήμα του ταπητίου των wells γίνεται η συλλογή τους σύμφωνα με την εξής διαδικασία: Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης DMEM και προστίθεται 1 ml παγωμένου και αποστειρωμένου διαλύματος PBS 1x ανά well. Η προσθήκη του διαλύματος γίνεται αργά και προσεκτικά ώστε να μην αποκολληθούν κύτταρα από το ταπήτιο των wells. Ακολουθεί έκπλυση των wells και απόρριψη του διαλύματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη δύο φορές με προσθήκη, έκπλυση και απόρριψη 1 ml διαλύματος PBS. Μετά το πέρας των εκπλύσεων, προστίθεται 0,5 ml διαλύματος PBS ανά well και τα κύτταρα συλλέγονται προσεκτικά με τη βοήθεια ενός ειδικού πλαστικού ξύστρου (scraper). Η συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος πραγματοποιείται σε πλαστικά φυαλίδια erpendorfs όγκου  $V = 1,5$  ml, τα οποία φυγοκεντρώνται για πέντε λεπτά, στις 1000 στροφές, στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το ίζημα με τα περιεχόμενα κύτταρα φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας συλλογής, τα κύτταρα όπως και το διάλυμα PBS διατηρούνται σε πάγο.

Εφόσον συλλεχθεί μια ικανοποιητική ποσότητα και των τριών κυτταρικών τύπων και αποικιών, τα πλαστικά φυαλίδια erpendorfs με τα περιεχόμενα κύτταρα που διατηρούνται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  τοποθετούνται στον πάγο για την ομαλή απόψυξή τους. Στη συνέχεια, για τη λύση των κυττάρων προστίθενται σε κάθε ένα από τα φυαλίδια erpendorfs 50  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (lysis buffer) και το τριών τύπων και αποικιών κυτταρικό εναιώρημα ομογενοποιείται μέσω της συσκευής παραγωγής υπερήχων (sonicator). Πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές ομογενοποιήσεις, διάρκειας 20 δευτερολέπτων η καθεμία, με ενδιάμεσες παύσεις του ενός λεπτού προκειμένου να μην αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες και τα κύτταρα να μην καταπονούνται πολύ. Στη συνέχεια, λαμβάνεται ο κατάλληλος όγκος κυτταρικού εκχυλίσματος για την πραγματοποίηση της μεθόδου Bradford.

### 3.2.2 Φωτομετρικός ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Αυτό οδηγεί σε μια φασματική μετατόπιση από την κοκκινωπή / καφέ μορφή της χρωστικής ουσίας (μέγιστη απορρόφηση στα 465 nm) στη μπλε μορφή της χρωστικής (μέγιστη απορρόφηση στα 610 nm) (Εικόνα 15). Η διαφορά μεταξύ των δύο μορφών της χρωστικής είναι μεγαλύτερη στα 595 nm, κι έτσι αυτό είναι το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση του μπλε χρώματος από το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη. Το μπλε χρώμα μπορεί, επίσης, να μετρηθεί σε οποιοδήποτε μήκος κύματος μεταξύ των 575 nm και 615 nm. Στις δύο ακραίες συνθήκες (575 nm και 615 nm), υπάρχει μια απώλεια της τάξης του 10% στην μετρούμενη ποσότητα του χρώματος (απορρόφηση) σε σύγκριση με εκείνη που λαμβάνεται στα 595 nm.



Εικόνα 15. Σχηματική αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 με την πρωτεΐνη.

Η ανάπτυξη του χρώματος στη συγκεκριμένη μέθοδο έχει συσχετιστεί με την παρουσία ορισμένων βασικών αμινοξέων (κυρίως αργινίνη, ιστιδίνη και λυσίνη) στην πρωτεΐνη. Οι δεσμοί Van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν, επίσης, στη σύνδεση της χρωστικής με τις πρωτεΐνες. Ο αριθμός των μορίων της χρωστικής που συνδέονται με κάθε μόριο πρωτεΐνης είναι σχεδόν ανάλογος με τον αριθμό των θετικών φορτίων που φέρει η πρωτεΐνη. Ελεύθερα αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα με

τη χρήση του αντιδραστηρίου αυτού. Σε γενικές γραμμές, η μάζα ενός πεπτιδίου ή μιας πρωτεΐνης πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 kDa, προκειμένου να αναλυθεί με αυτή τη μέθοδο. Η μέθοδος Bradford παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- είναι απλή, γιατί η μέτρηση γίνεται από ανάμειξη του διαλύματος της πρωτεΐνης με ένα μόνο διάλυμα χρωστικής,
- είναι πολύ γρήγορη,
- είναι πολύ ευαίσθητη γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό μέχρι και 1 mg πρωτεΐνης,
- οι παράγοντες που την παρεμποδίζουν είναι πολύ λιγότεροι και
- πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς να απαιτείται ειδικός εξοπλισμός.

### **Διαδικασία**

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέθοδος Bradford, αρχικά παρασκευάζεται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων BSA (Bovine Serum Albumin), συνήθως μέσω αραιώσεων ενός δείγματος γνωστής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, σε 20 μl από το κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης (0,2-1,4 mg/ml) προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί καλή ανάδευση και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δημιουργούμενων διαλυμάτων έπειτα από 5 λεπτά έως και 60 λεπτά. Τα πρότυπα διαλύματα αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford και οι τιμές της απορρόφησης τους μετριοούνται με φασματοφωτόμετρο, στα 595nm. Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό μιας καμπύλης αναφοράς. Στην καμπύλη αναφοράς, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τοποθετείται στον άξονα των x, ενώ η οπτική απορρόφηση στον άξονα των y. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών μορίων σε μg/μl που περιέχονται στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση υπολογίζεται με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς  $y = 0,0345x + 0,0101$ . Αυτό είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό του όγκου του πρωτεϊνικού δείγματος που θα φορτωθεί, εφόσον η επιθυμητή συγκέντρωση πρωτεΐνης ανά υποδοχή (well) καθορίζεται στα 30-50 μg.

Αρχικά, προστίθεται 1 μl πρωτεϊνικού δείγματος από κάθε κυτταρικό τύπο με 1 ml αντιδραστηρίου Bradford. Τα δημιουργούμενα διαλύματα αναδεύονται στο vortex κι επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά, προκειμένου να



πραγματοποιηθεί η αντίδραση και να αναπτυχθεί το χρώμα. Μετά το πέρας της επώασης, μετράται η οπτική απορρόφηση των διαλυμάτων στα 595 nm, αφού το φασματοφωτόμετρο μηδενιστεί με το τυφλό διάλυμα (1 μl H<sub>2</sub>O + 1 ml αντιδραστήριου Bradford). Οι τιμές της οπτικής απορρόφησης για τα επιμέρους πρωτεϊνικά διαλύματα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών στα δείγματα (μg/μl) μέσω της εξίσωσης  $y = 0,0345x + 0,0101$ .

### 3.2.3 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων που φέρουν φορτίο κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Πολλά βιομόρια περιέχουν ομάδες που μπορούν να ιονισθούν και έτσι σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται σαν κατιόντα (θετικά φορτισμένα), ή ανιόντα (αρνητικά φορτισμένα) ανάλογα με το καθαρό φορτίο που φέρουν. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο θα μετακινηθούν προς το θετικό ή αρνητικό πόλο με μια ταχύτητα η οποία εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τις ιδιότητες του μέσου στήριξης και την θερμοκρασία.

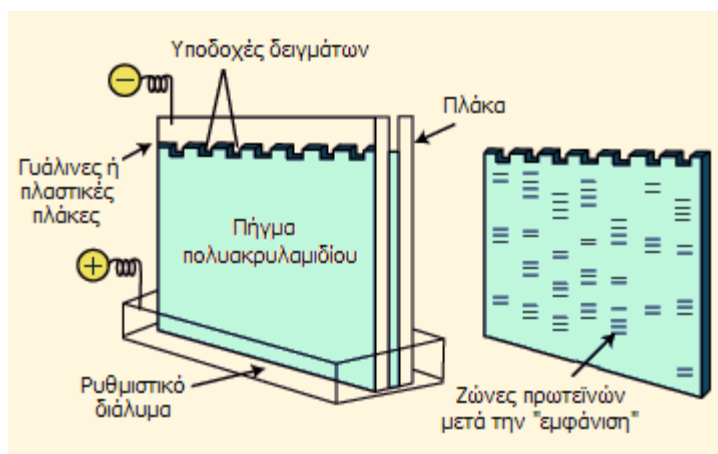
Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε στερεό μέσο είτε σε πηκτή (gel). Στην ηλεκτροφόρηση πηκτής (gel electrophoresis) ο διαχωρισμός δεν γίνεται μόνο με βάση το φορτίο, αλλά και το μέγεθος του μορίου, γιατί η πηκτή δρα σαν μοριακό κόσκινο. Συνήθως χρησιμοποιούνται πηκτές αμύλου, αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, που έχουν διαφορετικά μεγέθη πόρων ανάλογα με τη συγκέντρωση και το βαθμό διασταύρωσης της πηκτής. Έχει επικρατήσει η χρήση πηκτών για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων, αφού η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα (μπορούν να αναλυθούν μεγάλες ποσότητες δείγματος για ποσοτικούς προσδιορισμούς, μπορεί να ελεγχεί η αναπτυσσόμενη τριβή έτσι ώστε να οριστεί η αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού κ. α.).

Οι ηλεκτροφορητικές τεχνικές είναι δύο τύπων: κινουμένου ορίου ή ζώνης. Στην δεύτερη περίπτωση, που έχει ευρύτετη εφαρμογή, η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μια πηγή ηλεκτρικού ρεύματος, που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μια λεκάνη χωρισμένη σε δυο δεξαμενές, που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Στην μια δεξαμενή είναι προσαρμωμένο το θετικό και στην άλλη το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Τα μόρια προς

διαχωρισμό τοποθετούνται σαν κηλίδα ή ζώνη σε ένα ημι-στερεό υπόστρωμα όπως το χαρτί, η οξική κυτταρίνη, ή μια πηκτή. Το στερεό υπόστρωμα, που είναι εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετείται πάνω σ' ένα στήριγμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης με το ένα άκρο του βυθισμένο στη δεξαμενή που είναι ο θετικός πόλος και το άλλο στη δεξαμενή που είναι ο αρνητικός. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί τη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος από το αρνητικό ηλεκτρόδιο - ρυθμιστικό διάλυμα - υλικό ηλεκτροφόρησης - ρυθμιστικό διάλυμα - θετικό ηλεκτρόδιο και το διαχωρισμό των μορίων σε ζώνες. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η ποσότητα, η χημική σύσταση ή η ενζυμική δράση των ουσιών καθε ζώνης μπορούν να προσδιοριστούν με χρώση ή άλλες κατάλληλες επεξεργασίες.

### **3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία SDS (SDS-PAGE)**

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE), συχνά παρουσία SDS (άλας νατρίου του θειικού δωδεκυλίου). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάθετα, με την πηκτή σε γυάλινους σωλήνες ή ορθογώνιες πλάκες. Η χρήση μη συνεχούς ηλεκτροφόρησης πηκτής (disc gel electrophoresis) αυξάνει ακόμα περισσότερο τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Κατά την SDS - PAGE, όλες οι πεπτιδικές αλυσίδες είναι ξεδιπλωμένες και αρνητικά φορτισμένες (διότι το SDS συνδέεται με τις πρωτεΐνες με την αναλογία 1,4g SDS/g πρωτεΐνης) και μετακινούνται προς την άνοδο με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους (Mr) των πρωτεϊνών, με τη χρήση πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού Mr (μάρτυρες, markers), και σύγκριση της σχετικής κινητικότητας Rf (μετατόπισης πρωτεΐνης σε σχέση με το μέτωπο της χρωστικής) των αγνώστων με το Rf των γνωστών πρωτεϊνών (Εικόνα 16).

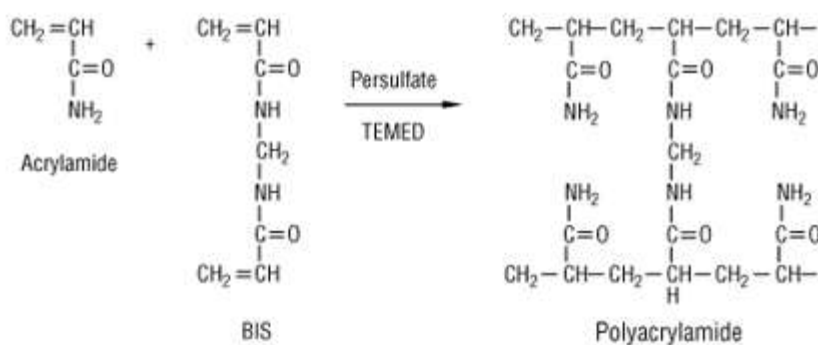


Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Ηλεκτροφορητική διάταξη.

Οι πηκτές του πολυακρυλαμιδίου δημιουργούνται με συμπολυμερισμό του ακρυλαμιδίου με  $N,N'$ -μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Τα μονομερή των δύο αυτών ενώσεων είναι σταθερά όταν βρίσκονται μόνα τους ή μαζί σε διάλυμα. Πολυμερίζονται, όμως, εύκολα με ένα σύστημα που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Στη βιοχημεία χρησιμοποιούνται φωτοχημικές ή χημικές πηγές ελευθέρων ριζών. Έτσι, στις πρώτες μια ουσία που προκαλεί τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, όπως το υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, APS), προστίθεται με τον καταλύτη  $N,N,N',N'$ -τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη ( $N,N,N,N'$ -TEtraMethylEthyleneDiamine, TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού (Εικόνα 17). Στη φωτοχημική μέθοδο το APS αντικαθίσταται από μια φωτοευαίσθητη ουσία, τη ριβοφλαβίνη που δίνει ελεύθερες ρίζες με την ακτινοβολία UV. Πολύ σημαντικό είναι η μέθοδος που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό πηκτών πολυακρυλαμιδίου να μπορεί να επαναληφθεί ακριβώς. Γενικά, επαναλήψιμοι, ηλεκτροφορητικοί προσδιορισμοί απαιτούν ομοιόμορφες συνθήκες σχηματισμού πηκτών. Το δωδεκανοθειικό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) χρησιμοποιείται στα συστήματα ηλεκτροφόρησης πηκτής κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι οποίες εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των υπομονάδων και των πλευρικών αλυσίδων μιας πρωτεΐνης, τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους αυτής, καθώς και για τον έλεγχο της καθαρότητας παρασκευασμάτων. Αρχικά, το παρασκεύασμα της πρωτεΐνης αντιδρά με περίσσεια μιας διαλυτής θειόλης (μερκαπτοαιθανόλη) και SDS. Κάτω από τις συνθήκες αυτές η περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης ανάγει όλους τους δισουλφιδικούς δεσμούς, S-S, που υπάρχουν στο εσωτερικό των πρωτεϊνών και το απορρυπαντικό SDS ενώνεται σε όλες τις

περιοχές της πρωτεΐνης και αποκαλύπτει όλες τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων τους, όσο και την εμφάνιση πολύ-ανιονικών αλυσίδων πολυπεπτιδίων.

Η ανιονική, αποδιαταγμένη, σε σύμπλοκο με τα μόρια SDS, πρωτεΐνη διαχωρίζεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σε ένα περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος που έχειθειόλη και SDS. Τα δύο τελευταία διατηρούν την πρωτεΐνη στην κατάλληλη διαμόρφωση. Μάλιστα, το SDS διατηρεί ένα λόγο φορτίου προς μάζα για όλες τις πρωτεΐνες, ενώ η συγκέντρωση της πηκτής επιδρά σαν μοριακό κόσκινο, όπου το ιξώδες και το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθορίζουν την κινητικότητα. Έτσι, η σχετική κινητικότητα κάθε ανιονικής, αποδιαταγμένης αλυσίδας πολυπεπτιδίου είναι μια λογαριθμική συνάρτηση του μοριακού της βάρους.

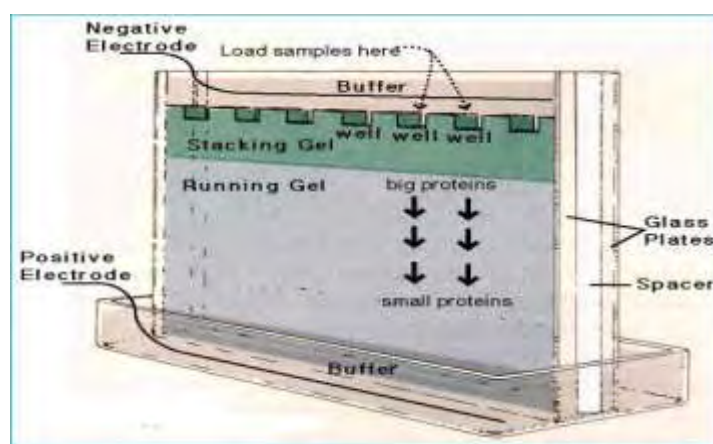


Εικόνα 17. Πολυμερισμός και διασύνδεση του ακρυλαμιδίου. Η αναλογία του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου, καθώς και η συνολική συγκέντρωση των δύο συστατικών, επηρεάζει το μέγεθος των πόρων και την πυκνότητα της τελικής πηκτής.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χωρίζεται σε δύο περιοχές. Πρώτα, παρασκευάζεται το κατώτερο και μεγαλύτερο μέρος της πηκτής, η πηκτή διαχωρισμού (separating/running gel) και στη συνέχεια, στο επάνω μέρος του προηγούμενου, παρασκευάζεται μια σχετικά στενή περιοχή, η πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) (Εικόνα 18). Η πηκτή επιστοίβασης έχει σχετικά μεγάλους πόρους και στην περιοχή αυτή υπάρχουν οι υποδοχές (wells), όπου τοποθετούνται τα προς ανάλυση επεξεργασμένα δείγματα. Στην πηκτή διαχωρισμού (separating/running gel) πραγματοποιείται ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός με εφαρμογή τάσης (μέσω 2 ηλεκτροδίων) στην περιοχή 100-200 V. Συνήθως, το pH του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για την πηκτή επιστοίβασης πρέπει να είναι περίπου κατά 2

πεχαμετρικές μονάδες μικρότερο (συνήθως pH 6,8) από το pH που χρησιμοποιείται για την πηκτή διαχωρισμού (συνήθως pH 8,3-9,0).

Το 1970, ο Laemmli, εισήγαγε ένα σύστημα (Tris-glycine-SDS system) το οποίο χρησιμοποιείται περισσότερο σήμερα. Στο σύστημα αυτό, η πηκτή επιστοίβασης έχει pH 6,8 και το δείγμα 'παγιδεύεται' ανάμεσα σε ιόντα  $Cl^-$ , τα οποία προηγούνται, και μόρια γλυκίνης, τα οποία ακολουθούν, και έτσι το δείγμα σχηματίζει μια λεπτή ζώνη (band), σύμφωνα με τις αρχές της ισοταχούς ηλεκτροφόρησης. Αυτό συμβαίνει διότι η γλυκίνη είναι διπολικό ιόν σε αυτό το περιβάλλον, καθώς η τιμή  $pK_a$  της γλυκίνης είναι αρκετά υψηλότερη από το pH της πηκτής, και έτσι η κινητικότητα των μορίων της είναι πολύ χαμηλή. Τα ιόντα χλωρίου έχουν υψηλότερη κινητικότητα και προηγούνται, αλλά δε μπορούν να απομακρυνθούν, καθώς αφήνουν πίσω τους θετικά ιόντα δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού κρατώντας τα σε κοντινή απόσταση. Έτσι, σχηματίζεται μια ζώνη μέσα στην οποία βρίσκεται 'παγιδευμένο' το δείγμα. Με λίγα λόγια, οι κινητικότητες των μορίων εξαρτώνται αποκλειστικά από το καθαρό τους φορτίο και όχι από το μέγεθός τους, διότι οι πόροι της πηκτής είναι αρκετά μεγάλοι. Το φαινόμενο αυτό στηρίζεται στο λεγόμενο Kohlrausch boundary. Όταν η ζώνη αυτή εισέλθει στην πηκτή διαχωρισμού, η οποία έχει pH 8,8 και μικρότερους πόρους, η κινητικότητα του δείγματος μειώνεται και αυτή των μορίων της γλυκίνης αυξάνεται κατά πολύ, καθώς ιοντίζονται, και προσπερνάνε τα μόρια του δείγματος. Από το σημείο αυτό (σταθερό pH και δυναμικό) ξεκινάει ο διαχωρισμός των μορίων του δείγματος.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση των πηκτών επιστοίβασης (stacking gel) και διαχωρισμού (separating/running gel) σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE.

## Διαδικασία

### 1) Παρασκευή πηκτών ηλεκτροφόρησης

- Πηκτή επιστοίβασης (stacking gel)

Το ανώτερο τμήμα της πηκτής αποτελείται από την πηκτή επιστοίβασης (stacking gel) η οποία έχει σχετικά μεγάλους πόρους (ποσοστό ακρυλαμίδης 4%) και στην περιοχή αυτή υπάρχουν οι υποδοχές (wells), όπου τοποθετούνται τα προς ανάλυση επεξεργασμένα δείγματα τα οποία πακετάρονται με σταθερή τάση 100V. Οι όγκοι των stock διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής απεικονίζονται στον Πίνακα 3.3.

**Πίνακας 3.3:** Σύσταση πηκτής επιστοίβασης (stacking gel)

Διαλύματα	Όγκος διαλύματος
Ακρυλαμίδιο 40% v/w	0,25 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=6,8	0,21 ml
SDS 10%	25 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l
APS	12,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml

- Πηκτή διαχωρισμού (separating/running gel)

Ανάλογα με τις διαστάσεις της πηκτής πολυακρυλαμιδίου, το μοριακό βάρος και τον επιθυμητό βαθμό διαχωρισμού των πρωτεϊνικών δειγμάτων, επιλέγεται το ποσοστό ακρυλαμιδίου της πηκτής διαχωρισμού (separating/running gel). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιείται η συγκέντρωση 7,5% ακρυλαμιδίου, έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των μεγαλομοριακών πρωτεϊνών, καθώς οι μικρομοριακές πρωτεΐνες διαφεύγουν ευκολότερα από τους πόρους της πηκτής και απομακρύνονται γρήγορα. Οι όγκοι των stock διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής απεικονίζονται στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4:** Σύσταση πηκτής διαχωρισμού (separating/running gel)

Διαλύματα	Όγκος διαλύματος
Ακρυλαμίδιο 40%	0,9375 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=8,8	1,25 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l
APS	25 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,738 ml

Το τελικό στάδιο προσθήκης του διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium Persulfate, APS), καθώς και αυτού της N,N'τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (N,N,N,N'- TEtraMethylEthyleneDiamine, TEMED) πραγματοποιείται γρήγορα, καθώς ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου ξεκινά κι επιταχύνεται. Επίσης, είναι σημαντικό το διάλυμα του ακρυλαμιδίου να προφυλάσσεται από το φως, καθώς αλλοιώνεται, όπως και αυτό του TEMED να μην έρχεται σε επαφή με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο, το οποίο συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών.

## 2) Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων ηλεκτροφόρησης

Αρχικά, τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται με το διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) και αντιδρούν με περίσσεια μιας διαλυτής θειόλης (μερκαπτοαιθανόλη) και SDS. Κάτω από τις συνθήκες αυτές, η περίσσεια μερκαπτοαιθανόλης ανάγει όλους τους δισουλφιδικούς δεσμούς, S-S, που υπάρχουν στο εσωτερικό των πρωτεϊνών και το αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης και αποκαλύπτει όλες τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο την ολική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των υπομονάδων τους, όσο και την εμφάνιση πολύ-ανιονικών αλυσίδων πολυπεπτιδίων. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων ολοκληρώνεται με θέρμανση τους στους 95°C για 3 λεπτά. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρησή τους

στη μέγιστη ταχύτητα, ώστε να κατακρημνιστούν οι υδρατμοί και να διατηρηθούν σταθερές οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις των δειγμάτων.

### 3) Φόρτωση και τρέξιμο πρωτεϊνικών δειγμάτων

Αφού εξασφαλισθεί ότι η πηκτή είναι έτοιμη, τα πρωτεϊνικά δείγματα και οι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους φορτώνονται στις ειδικές υποδοχές (wells) της πηκτής επιστοίβασης με τη σειρά που απεικονίζεται στον Πίνακα 3.5. Έπειτα, προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), το οποίο ερχόμενο σε επαφή με την πηκτή, διατηρεί σταθερή την κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου. Τέλος, συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ανόδου και της καθόδου κατάλληλα με την συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόζεται σταθερή τάση 100V, μέχρι τα δείγματα να διανύσουν την πηκτή επιστοίβασης, ενώ μόλις φτάσουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται στα 120V. Η εμφάνιση φυσαλίδων στο ρυθμιστικό διάλυμα κατά την παροχή ηλεκτρικού ρεύματος υποδηλώνει την ομαλή διεξαγωγή της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας.

**Πίνακας 3.5:** Όγκοι και σειρά ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών δειγμάτων

Αριθμός well	Πρωτεϊνικό δείγμα	Όγκος διαλύματος (μl)
1	Μάρτυρας	2
2	HepG2	15
3	HepG2-mtGFP C <sub>4</sub> P <sub>7</sub>	15
4	HepG2-mtGFPGR C <sub>2</sub> P <sub>18</sub> (I)	15
5	HepG2-mtGFPGR C <sub>2</sub> P <sub>18</sub> (II)	15
6	HepG2-mtGFPGR C <sub>21</sub> P <sub>4</sub> (I)	15
7	HepG2-mtGFPGR C <sub>21</sub> P <sub>4</sub> (II)	15
8	HepG2-mtGFPGR C <sub>14</sub> P <sub>7</sub> (I)	15
9	HepG2-mtGFPGR C <sub>14</sub> P <sub>7</sub> (II)	15



### **3.2.5 Ανοσοανίχνευση κατά Western (Western Blot)**

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου βρίσκει εφαρμογή κατά την τεχνική της ανοσοανίχνευσης κατά Western με χρήση αντισώματος για ποιοτική αλλά και ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος αναφορικά με την επιθυμητή πρωτεΐνη. Κατά την τεχνική αυτή, όλα τα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν διαχωριστεί με την τεχνική της πηκτής πολυακρυλαμιδίου (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) μεταφέρονται οριζόντια υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που έχει την ικανότητα να τα δεσμεύει μη αναστρέψιμα.

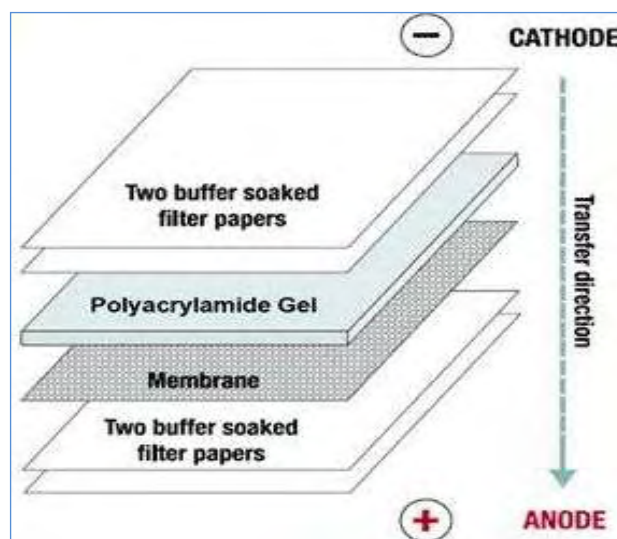
Στη συνέχεια, επωάζονται με αντίσωμα ειδικό για την προς ανίχνευση πρωτεΐνη, το οποίο είναι σημασμένο κατάλληλα (με φθοριόχρωμα, με ένζυμο που παράγει έγχρωμο προϊόν, με ραδιενεργό ισότοπο κ.λπ.). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικά αντισώματα, εκ των οποίων το πρώτο θα αλληλεπιδρά εκλεκτικά με την προς ανίχνευση πρωτεΐνη, ενώ το δεύτερο θα μπορεί να συνδέεται με τη σταθερή μη μεταβλητή (Fc) περιοχή του πρώτου αντισώματος. Η ανίχνευση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στη νιτροκυτταρίνη επιτυγχάνεται με την προσθήκη άχρωμου υποστρώματος στο διάλυμα επώασης και με την τελική του μετατροπή σε έγχρωμο εύκολα ανιχνεύσιμο προϊόν, αντίδραση που πραγματοποιείται από το ενεργό ένζυμο, που είναι μόνιμα συζευγμένο με το δεύτερο αντίσωμα.

#### **Διαδικασία**

##### **1) Μεταφορά πρωτεϊνικών δειγμάτων από την πηκτή ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μετά το πέρας της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται προσεκτικά από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και απομακρύνεται το τμήμα της πηκτής επιστοίβασης. Στη συνέχεια, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα τέσσερα διηθητικά χαρτιά Watman 3 mm και τα δύο σφουγγάρια τοποθετούνται σε δύο λεκάνες που περιέχουν το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), για 10 λεπτά, προκειμένου να εξισορροπηθούν. Ακολούθως, συναρμολογείται η συσκευή για τη μεταφορά. Η διάταξη μέσα στην κασσέτα μεταφοράς είναι η ακόλουθη (όπως απεικονίζεται και στην εικόνα): σφουγγάρι-2 χαρτιά Watman-πηκτή-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-2 χαρτιά Watman-σφουγγάρι. Η μεμβράνη τοποθετείται στη

συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προσανατολισμένη προς το θετικό πόλο, ενώ η πηκτή προς τον αρνητικό, ώστε οι πρωτεΐνες να μεταφέρονται από την πηκτή στη μεμβράνη κατά την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος. Κατά τη συναρμολόγηση της κασσέτας απομακρύνονται όσες φυσαλίδες παρεμβάλλονται ανάμεσα στην πηκτή και τη μεμβράνη προκειμένου να μην παρεμποδιστεί η διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και η μεταφορά. Η μεταφορά, που πραγματοποιείται σε πάγο, διαρκεί για 70 περίπου λεπτά κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος στα 350mA (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Συναρμολόγηση της κασσέτας ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνικών δειγμάτων από την πηκτή ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Μετά το πέρας των 70 λεπτών της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη αφαιρείται προσεκτικά από την κασσέτα και σημειώνονται σε αυτή οι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους. Στη συνέχεια, επώάζεται σε 10 ml blocking buffer, για 1 ώρα, υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό συμβάλλει στο να κορεστούν οι ελεύθερες περιοχές της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες του γάλακτος (μη-ειδικές θέσεις), με αποτέλεσμα το πρώτο αντίσωμα που εισέρχεται μετά να δεσμεύεται μόνο στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη έναντι της οποίας προστίθεται (ειδικές θέσεις δέσμευσης). Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται με διάλυμα PBS-T για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του blocking buffer.

Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για όλο το βράδυ με 5 ml διαλύματος που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (10 μl πρωτογενούς αντισώματος συγκέντρωσης 200 μg/ml σε 5 ml διαλύματος PBST εμπλουτισμένο με 2% άπαχο γάλα) στους 4 °C. Το πρωτογενές αντίσωμα δεσμεύει

μόνο τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη την οποία αναγνωρίζει. Μετά το τέλος της ολονύκτιας επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα, ακολουθούν 3 εκπλύσεις, πέντε λεπτών η καθεμία, της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος και το μέρος αυτού που δεν έχει συνδεθεί ειδικά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1:50000) για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ελαφρά ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τις ειδικές περιοχές του πρωτογενούς και φέρει ομοιοπολικά προσδεδεμένο το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου το οποίο είναι υπεύθυνο για το σήμα που παρατηρείται στο τέλος της διαδικασίας, καταδεικνύοντας το σημείο στο οποίο βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλένεται 3 φορές με PBS-T, για 5 λεπτά, υπό ελαφρά ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με κατάλληλο υπόστρωμα για το δευτερογενές αντίσωμα.

## **2) Εμφάνιση σήματος με τη χρήση φωτογραφικού φιλμ**

Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της CHEMICON. Αυτό το kit περιλαμβάνει το Luminol/Enhancer διάλυμα (διάλυμα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος), το διάλυμα υπεροξειδίου και το διάλυμα διαλυτοποίησης υπεροξειδίου, ώστε να υπάρξει στη συνέχεια εμφάνιση του σήματος σε φωτογραφικό φιλμ. Ειδικότερα, προετοιμάζεται 1:1000 αραιώση, του διαλύματος αραιώσης του υπεροξειδίου με το διάλυμα υπεροξειδίου και στη συνέχεια, ενοποιούνται τα διαλύματα αντίδρασης/ενίσχυσης σήματος και υπεροξειδίου. Αυτό το ενοποιημένο διάλυμα είναι λειτουργικό για αρκετές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, αυτό τοποθετείται στη μεμβράνη για 3 λεπτά, σε σημείο που να μην εκτίθεται στο φως, και μετά χωρίς να ξεπλυθεί η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασέτα κοντά στον φθορίζοντα μάρτυρα.

Στη συνέχεια, τοποθετούνται στην κασέτα τα φιλμ στα οποία εμφανίζεται τελικά το σήμα φθορισμού. Για την εμφάνιση των φιλμ χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο του kit της Kodak το οποίο περιλαμβάνει το διάλυμα developer (ανάπτυξης σήματος) και το διάλυμα fixer (μονιμοποίησης σήματος). Το φιλμ μετά την έκθεση του στη μεμβράνη (για όσο χρονικό διάστημα είναι επιθυμητό, το οποίο εξαρτάται από το πείραμα) τοποθετείται για 1 λεπτό στο διάλυμα developer και αφού

ξεπλυθεί με νερό στιγμιαία, έπειτα τοποθετείται για 40 δευτερόλεπτα στο διάλυμα fixer. Τέλος, ακολουθεί νέο στιγμιαίο ξέπλυμα του film με νερό. Έτσι, το σήμα εμφανίζεται στο φιλμ και πλέον μπορεί να μελετηθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλη η διαδικασία εμφάνισης του φιλμ πρέπει να γίνεται σε σκοτεινό δωμάτιο ώστε να μην υπάρχει καταστροφή/κάψιμο των φιλμ.

Με τα παραπάνω αντιδραστήρια, γίνεται αντιστοίχιση σήματος στο φιλμ με τους έγχρωμους πρωτεϊνικούς δείκτες που έχουν ηλεκτροφορηθεί και στη συνέχεια μεταφερθεί στη μεμβράνη. Εκτός αυτών, τα υποστρώματα χημειοφωταύγειας για το παραπάνω ένζυμο είναι, επίσης, αρκετά διαδεδομένα. Στα πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγονται η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της μεμβράνης μέσω της διαδικασίας stripping, η αποθήκευση των αποτελεσμάτων σε φωτογραφικό φιλμ αυτοραδιογραφίας που είναι μονιμότερο μέσο αποθήκευσης σε σχέση με τη μεμβράνη, η δυνατότητα πολλαπλών εκθέσεων και, υπό ορισμένες συνθήκες, η μεγαλύτερη ευαισθησία.

Καθώς η ένταση της ζώνης του μορίου-στόχου βρίσκεται σε αντιστοιχία με την ποσότητα της πρωτεΐνης που έχει φορτωθεί στην πηκτή, η ανοσοανίχνευση κατά Western χρησιμοποιείται όχι μόνο για την ποιοτική ανίχνευση αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών.

### **3) Κανονικοποίηση σήματος με β-ακτίνη**

Η ανοσοανίχνευση κατά Western επαναλαμβάνεται για μια δομική πρωτεΐνη, όπως την ακτίνη ή την τουμπουλίνη, η οποία εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα και δεν πρέπει να αλλάζει μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Το ποσό της πρωτεΐνης-στόχου κανονικοποιείται με τη δομική πρωτεΐνη για τον έλεγχο μεταξύ των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει τη διόρθωση για το ποσό της συνολικής πρωτεΐνης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε περίπτωση λαθών ή ελλιπούς μεταφοράς. Επίσης, εξασφαλίζει ότι οι εντονότερες ζώνες που παρατηρούνται μετά την εμφάνιση του σήματος οφείλονται στη μεγαλύτερη ποσότητα των περιεχόμενων πρωτεϊνών στα δείγματα και όχι σε λανθασμένη φόρτωση περισσότερης πρωτεΐνης στην πηκτή ηλεκτροφόρησης.

### **3.2.6 Εμβολιασμός αρσενικών μυών με κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR για την ανάπτυξη και μέτρηση in vivo αναπτυσσόμενων ηπατοκυτταρικών όγκων**

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα τρία είδη κυττάρων, HepG2, HepG2-mtGFP (κύτταρα ελέγχου) και HepG2-mtGFPGR, οδηγούν στην ανάπτυξη όγκων in vivo χρησιμοποιούνται 15 ανοσοκατεσταλμένοι, αρσενικοί μύες, 6-8 εβδομάδων, οι οποίοι στεγάζονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (22-24 °C, 50-70% υγρασία και 12 ωρών κύκλος φωτός/σκότους). Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, οι μύες έχουν ελεύθερη πρόσβαση σε πρότυπη τροφή και νερό. Οι 15 αρσενικοί μύες, χωρισμένοι σε τρεις ομάδες των πέντε (μια για κάθε ένα κυτταρικό τύπο), εμβολιάζονται υποδόρια στις δύο μασχαλιαίες περιοχές των πίσω άκρων με 100 μl εμβολίου που περιέχει  $10^6$  κύτταρα και, στη συνέχεια, παρακολουθούνται για την παρατήρηση της ανάπτυξης πιθανών όγκων. Ο χειρισμός και ο πειραματισμός των ζώων γίνονται σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (2015/92) και τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου (86/609 και ETS123, αντίστοιχα).

Η μέτρηση των διαστάσεων των αναπτυσσόμενων όγκων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού παχυμέτρου και την εφαρμογή της εξίσωσης  $\alpha \times \beta^2 / 2$ , όπου  $\alpha$  και  $\beta$  είναι οι δύο μεγαλύτερες διαστάσεις, αντίστοιχα. Το μέγεθος των όγκων καταγράφεται κάθε τρεις έως τέσσερις ημέρες. Η απώλεια βάρους, οι νευρολογικές διαταραχές, οι διαταραχές της συμπεριφοράς και οι διατροφικές αλλαγές, καταγράφονται, επίσης, ως δείκτες παρενεργειών. Το πείραμα τερματίζεται όταν οι όγκοι των ζώων ελέγχου φθάσουν στο μέγεθος των περίπου  $1.000 \text{ mm}^3$  ή στο 11% του βάρους των ζώων (Dimas et al, 2009).

## 4. Αποτελέσματα

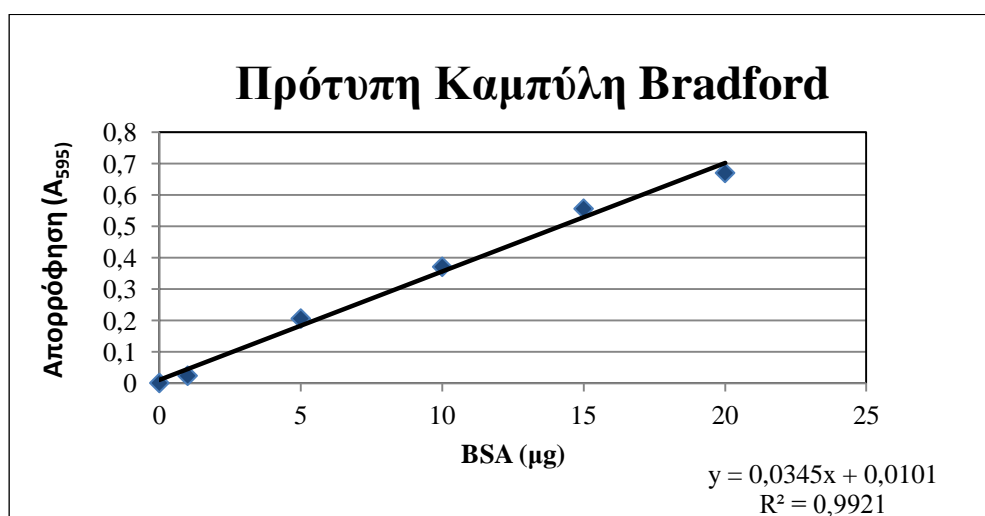
### 4.1 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης για τη μέθοδο Bradford

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την ποσότητα πρωτεΐνης αλβουμίνης από ορό βοοειδών (BSA) στο δείγμα αντίδρασης μετρώντας την οπτική απορρόφηση δειγμάτων γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και η απορρόφηση του κάθε δείγματος που χρησιμοποιήθηκε φαίνονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Συγκεντρώσεις δειγμάτων και απορροφήσεις τους

BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH=7.4 (μl)	Bradford reagent 1x (μl)	BSA (μg)	A <sub>595nm</sub> (Au)	BSA (μg/μl)
0	20	980	0	0	0
1	19	980	1	0,023	1
5	15	980	5	0,205	5
10	10	980	10	0,370	10
15	5	980	15	0,555	15
20	0	980	20	0,669	20

Η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε από τις παραπάνω τιμές έχει εξίσωση  $y = 0,0345x + 0,0101$  και παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Bradford.

Οι τιμές οπτικής απορρόφησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων των τριών διαφορετικών κυτταρικών σειρών και αποικιών, όπως προέκυψαν από τη μέθοδο Bradford και τη φωτομέτρησή τους στα 595 nm, απεικονίζονται στον Πίνακα 4.2.

**Πίνακας 4.2:** Τιμές οπτικής απορρόφησης πρωτεϊνικών δειγμάτων

<b>Κυτταρική σειρά</b>	<b>Οπτική απορρόφηση (A<sub>595</sub>)</b>
HepG2	0,489
HepG2-mtGFP C <sub>4</sub> P <sub>7</sub>	0,368
HepG2-mtGFPGR C <sub>2</sub> P <sub>18</sub> (I)	0,551
HepG2-mtGFPGR C <sub>2</sub> P <sub>18</sub> (II)	0,864
HepG2-mtGFPGR C <sub>21</sub> P <sub>4</sub> (I)	0,8
HepG2-mtGFPGR C <sub>21</sub> P <sub>4</sub> (II)	0,972
HepG2-mtGFPGR C <sub>14</sub> P <sub>7</sub> (I)	0,738
HepG2-mtGFPGR C <sub>14</sub> P <sub>7</sub> (II)	0,852

Με τη χρήση της εξίσωσης  $y = 0,0345x + 0,0101$  μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα (σε  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) κι, έτσι, να προσδιοριστεί ο όγκος του πρωτεϊνικού δείγματος που θα φορτωθεί σε κάθε υποδοχή (well) της πηκτής ηλεκτροφόρησης, όπως και ο όγκος των υπόλοιπων διαλυμάτων που θα προστεθούν (διαλύματα φόρτωσης και Tris). Επομένως:

Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης του κυτταρικού δείγματος HepG2-mtGFPGR C<sub>2</sub> P<sub>18</sub> (I) στην εξίσωση  $y = 0,0345x + 0,0101$ , το  $y$  αντικαθίσταται από την τιμή της οπτικής απορρόφησης:

$$y = 0,0345x + 0,0101 \Leftrightarrow 0,551 = 0,0345x + 0,0101 \Leftrightarrow x = \frac{0,551 - 0,0101}{0,0345} \Leftrightarrow$$

$$x = 15,6782 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Επειδή, όμως, απαιτούνται 50  $\mu\text{g}$  / υποδοχή (έστω για τρεις ηλεκτροφορήσεις 150  $\mu\text{g}$ ), τα  $\mu\text{l}$  που λαμβάνονται είναι:

1 μl περιέχει 15,678 μg πρωτεΐνης  $x = 150/15,6782 \Leftrightarrow x = 9,5674$  μl δείγματος

x μl περιέχουν 150 μg πρωτεΐνης

Ομοίως, υπολογίζονται οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις και των υπόλοιπων κυτταρικών δειγμάτων κι, επομένως, οι όγκοι των διαλυμάτων που προστίθενται. Για τελικό όγκο διαλύματος ηλεκτροφόρησης ίσο με 60 μl κατασκευάζεται ο Πίνακας 4.3.

**Πίνακας 4.3:** Διαλύματα και αντίστοιχοι όγκοι φόρτωσης για ηλεκτροφόρηση

Κυτταρικό δείγμα	Όγκος κυτταρικού δείγματος (μl)	Tris (μl)	Διάλυμα φόρτωσης 4x (μl)
HepG2	21,613	23,39	15
HepG2-mtGFP C <sub>4</sub> P <sub>7</sub>	28,924	16,07	15
HepG2-mtGFPGR C2 P14 (I)	9,5674	35,43	15
HepG2-mtGFPGR C2 P14 (II)	6,0604	38,94	15
HepG2-mtGFPGR C21 P14 (I)	6,5515	38,45	15
HepG2-mtGFPGR C21 P14 (II)	5,3799	39,62	15
HepG2-mtGFPGR C14 P9 (I)	7,1094	37,89	15
HepG2-mtGFPGR C14 P9 (II)	6,1468	38,85	15

## 4.2 Μέτρηση του αριθμού και του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά τριών ανεξάρτητων πειραμάτων κατά τη διάρκεια των οποίων παρατηρήθηκε η ανάπτυξη και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων ελέγχου (HepG2, HepG2-mtGFP) συγκριτικά με τα αντίστοιχα στοιχεία αύξησης των κυττάρων HepG2-mtGFPGR που υπερεκφράζουν το μιτοχονδριακά



στοχευμένο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Οι κυτταρικές αποικίες που χρησιμοποιήθηκαν για τα κύτταρα HepG2-mtGFPGR και HepG2-mtGFP ήταν οι C<sub>14</sub> P<sub>7</sub>, C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> και η C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>, αντίστοιχα.

Αρχικά, για τον προσδιορισμό (στα τρία ξεχωριστά πειράματα) του αριθμού των κυττάρων των τριών διαφορετικών σειρών με την πλάκα Neubauer, μετρήθηκε το σύνολο των κυττάρων στα τέσσερα τεταρτημόρια του αιμοκυτταρόμετρου κι έγινε η απαιτούμενη αναγωγή στο 1 ml κυτταρικού εναιωρήματος, όπως ακολούθως:

Μέτρηση κυττάρων με την πλάκα Neubauer (αριθμός κυττάρων ανά τεταρτημόριο):

1ο τεταρτημόριο: X<sub>1</sub>

3ο τεταρτημόριο: X<sub>3</sub>

2ο τεταρτημόριο: X<sub>2</sub>

4ο τεταρτημόριο: X<sub>4</sub>

Σύνολο κυττάρων/ml κυτταρικού εναιωρήματος για κάθε well, X

$$X = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + X_4}{4} \times 10^4$$

Στη συνέχεια, για κάθε πείραμα ξεχωριστά, υπολογίστηκαν ο μέσος όρος (Average), η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) του μέσου όρου και οι λόγοι (Ratio, R) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων κάθε μέτρησης ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων της πρώτης μέτρησης για όλα τα κύτταρα και τα wells, όπως απεικονίζονται στους ακόλουθους Πίνακες. Σημαντική ήταν η καταγραφή του χρόνου μέτρησης, ώστε να παρατηρηθεί η ανάπτυξη και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου. Οι τιμές στους Πίνακες οι οποίες είναι πιο έντονα γραμμένες δε συμπεριλήφθηκαν στην κατασκευή διαγράμματος, δεδομένου ότι αποκλίνουν από την ομαλή συνέχεια της σχηματιζόμενης καμπύλης, καθώς αποτελούν πειραματικά σφάλματα. Τα σφάλματα αυτά, ενδεχομένως, αφορούν λάθη κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης ή μέτρησης των κυττάρων, ελλιπούς ανάδευσης κ.α.

**Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2-mtGFPGR της αποικίας C<sub>2</sub>P<sub>5</sub> σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου HepG2 και HepG2-mtGFP**

Στον Πίνακα 4.4 απεικονίζονται ο μέσος όρος (Average) και η τυπική απόκλιση (SD) του μέσου όρου του αριθμού κάθε κυτταρικού τύπου ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος και ανά well. Επίσης, στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται για κάθε τύπο κυττάρων, οι λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων της εκάστοτε χρονικής στιγμής ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων σε μηδενικό χρόνο (t=0). Ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε προσδιορισμό είναι ίσος με 2 (n=2).

**Πίνακας 4.4**

t (h)	mtGR	mtGFP	HepG2	Aver <sub>(1)</sub>	Aver <sub>(2)</sub>	Aver <sub>(3)</sub>	SD <sub>(1)</sub>	SD <sub>(2)</sub>	SD <sub>(3)</sub>
0	1.5	1.37	1.87	2.12	1.62	1.75	0.88	0.35	0.17
	2.75	1.87	1.62						
18	2.12	1.87	2.25	2.12	2.75	2.37	0	1.23	0.17
	2.12	3.62	2.5						
26.5	6.62	4.62	4.87	6.31	2.87	4.56	0.44	2.47	0.44
	6	1.12	4.25						
44.5	7.37	3.25	5.37	7.25	3.43	5.25	0.17	0.26	0.17
	7.12	3.62	5.12						
74	7.62	6.25	7.25	7.81	6.5	7.12	0.26	0.35	0.17
	8	6.75	7						
90.5	9	7	7.62	8.81	7.18	7.56	0.26	0.26	0.08
	8.62	7.37	7.5						
114.5	9.25	7.75	9.62	9.43	8	9.62	0.26	0.35	0
	9.62	8.25	9.62						
143.5	22.5	10.87	9.5	22.25	11.12	10.06	0.35	0.35	0.79
	22	11.37	10.62						
164.5	25.12	11.75	9.12	24.62	12.18	9.81	0.7	0.61	0.97
	24	12.62	10.5						

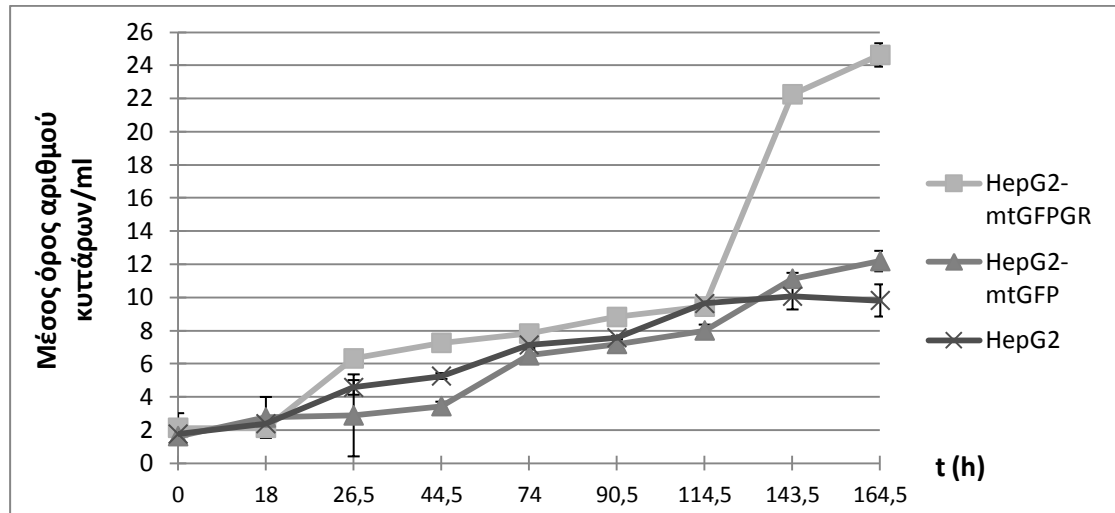
**Πίνακας 4.5**

<b>t (h)</b>	<b>Ratio HepG2-mtGFPGR</b>	<b>Ratio HepG2-mtGFP</b>	<b>Ratio HepG2</b>
0	1	1	1
18	1	1.69	1.35
26.5	2.97	1.76	2.6
44.5	3.41	2.11	3
74	3.67	4	4.07
90.5	4.14	4.42	4.32
114.5	4.44	4.92	5.5
143.5	10.47	6.84	5.75
164.5	11.58	7.5	5.6

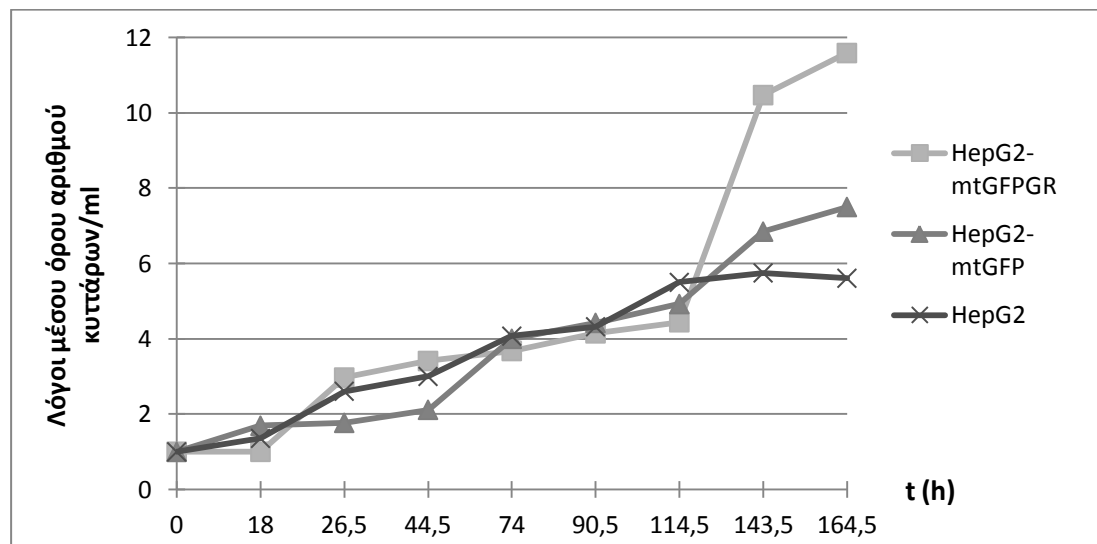
Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στους Πίνακες 4.4 και 4.5 αναλύονται ως εξής:

- t (h)-Χρονικά διαστήματα μέτρησης σε ώρες
- mtGR-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>/ml κυτταρικού εναιωρήματος
- mtGFP-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/ml κυτταρικού εναιωρήματος
- HepG2-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2/ml κυτταρικού εναιωρήματος
- Aver<sub>(1)</sub>-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>/well
- Aver<sub>(2)</sub>-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- Aver<sub>(3)</sub>-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2/well
- SD<sub>(1)</sub>-Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>/well
- SD<sub>(2)</sub>-Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- SD<sub>(3)</sub>-Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2/well
- Ratio HepG2-mtGFPGR-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>/well
- Ratio HepG2-mtGFP-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- Ratio HepG2-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2/well

Τα αντίστοιχα διαγράμματα του μέσου όρου (Average) και της τυπικής απόκλισης (SD) του μέσου όρου, όπως και των λόγων (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων για κάθε κυτταρικό τύπο ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα προς το μέσο όρο τη χρονική στιγμή 0 (1<sup>η</sup> μέτρηση), που καταδεικνύουν τους διαφορετικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, απεικονίζονται ακολούθως:



**Διάγραμμα 2:** Μέσος όρος (Average) και τυπική απόκλιση (SD) μέσου όρου αριθμού κάθε τύπου κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=2).



**Διάγραμμα 3:** Λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού κάθε τύπου κυττάρων κάθε μέτρησης ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων της πρώτης μέτρησης ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=2).

**Επαλήθευση των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων HepG2-mtGFPGR της αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub> σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου HepG2 και HepG2-mtGFP**

Στον Πίνακα 4.6 απεικονίζονται ο μέσος όρος (Average) και η τυπική απόκλιση (SD) του μέσου όρου του αριθμού κάθε κυτταρικού τύπου ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος και ανά well. Επίσης, στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται για κάθε τύπο κυττάρων, οι λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων της εκάστοτε χρονικής στιγμής ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων σε μηδενικό χρόνο (t=0). Ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε προσδιορισμό είναι ίσος με 3 (n=3).

**Πίνακας 4.6**

t (h)	mtGR	mtGFP	HepG2	Aver <sub>(1)</sub>	Aver <sub>(2)</sub>	Aver <sub>(3)</sub>	SD <sub>(1)</sub>	SD <sub>(2)</sub>	SD <sub>(3)</sub>
0	0.25	0.25	0.37	0.12	0.16	0.2	0.12	0.07	0.14
	0.12	0.12	0.12						
	0	0.12	0.12						
22	0.5	0.25	0.25	0.45	0.33	0.37	0.07	0.07	0.12
	0.37	0.37	0.5						
	0.5	0.37	0.37						
54	0.75	0.37	0.62	0.87	0.41	0.66	0.21	0.07	0.07
	1.12	0.5	0.75						
	0.75	0.37	0.62						
70	1.12	0.75	0.5	0.95	0.62	0.5	0.14	0.12	0.12
	0.87	0.62	0.37						
	0.87	0.5	0.62						
92	0.87	1.25	1	1.79	1.29	1.08	0.83	0.19	0.07
	2.5	1.5	1.12						
	2	1.12	1.12						
116.5	2.12	1.62	1.75	2.41	1.5	1.62	0.26	0.12	0.12
	2.5	1.37	1.62						
	2.62	1.5	1.5						
143.5	5.5	2.37	2.87	5.7	2.41	2.87	1.07	0.19	0.12
	4.75	2.62	3						
	6.87	2.25	2.75						
162	5	2.5	2.37	4.25	2.58	2.16	1.98	0.26	0.19

	5.75	2.87	2						
	2	2.37	2.12						
188	10	4.37	5	10.33	4.33	3.7	2.02	0.19	1.2
	8.5	4.5	2.62						
	12.5	4.12	3.5						
210	19.62	4.62	3.37	19.41	4.58	3.54	2.69	0.19	0.28
	22	4.75	3.37						
	16.62	4.37	3.87						
233.5	18.87	5.87	5.62	<b>10.95</b>	4.25	3.7	8	2.6	2.07
	11.12	5.62	4						
	2.87	1.25	1.5						

**Πίνακας 4.7**

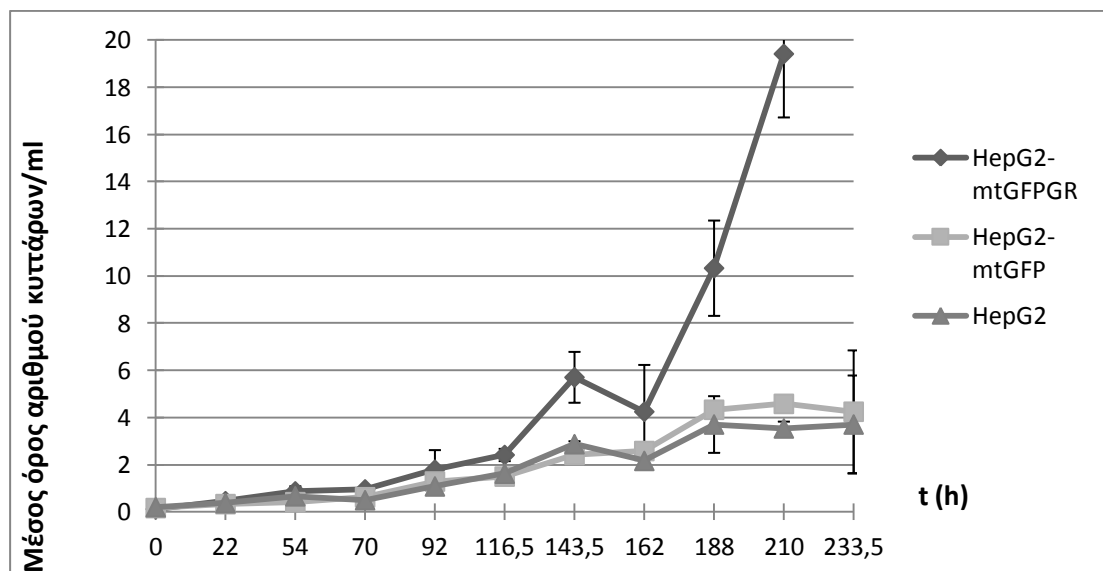
<b>t (h)</b>	<b>Ratio HepG2-mtGFPGR</b>	<b>Ratio HepG2-mtGFP</b>	<b>Ratio HepG2</b>
0	1	1	1
22	3.66	2	1.8
54	7	2.5	3.2
70	7.66	3.75	2.4
92	14.33	7.75	5.2
116.5	19.33	9	7.8
143.5	45.66	14.5	13.8
162	34	15.5	10.4
188	82.66	26	17.8
210	155.33	27.5	17
233.5	<b>87.66</b>	25.5	17.8

Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στους Πίνακες 4.6 και 4.7 αναλύονται ως εξής:

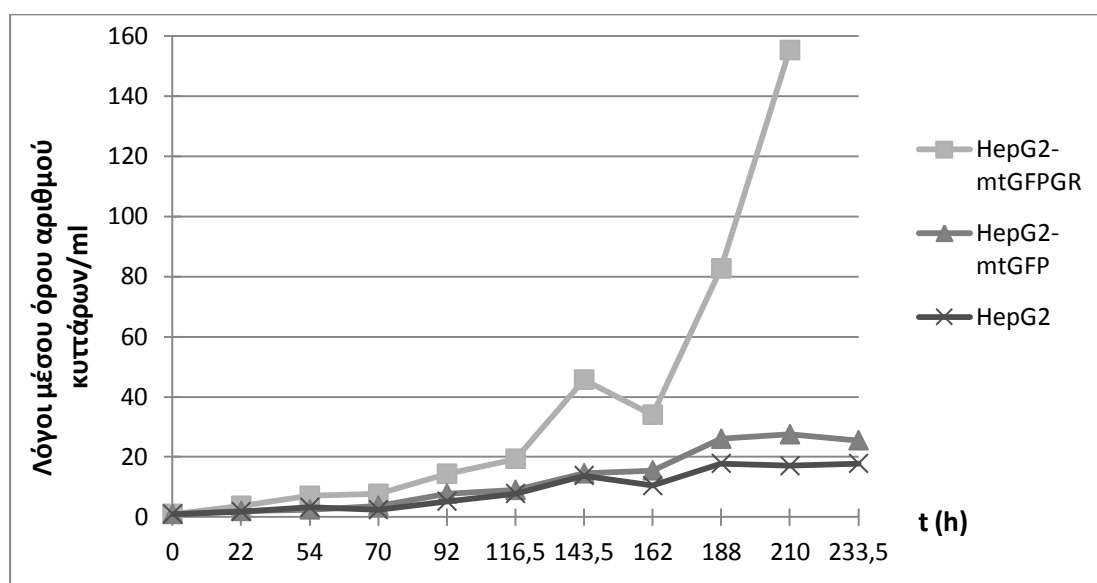
- t (h)-Χρονικά διαστήματα μέτρησης σε ώρες
- mtGR-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>/ml κυτταρικού εναιωρήματος
- mtGFP-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/ml κυτταρικού εναιωρήματος
- HepG2-Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2/ml κυτταρικού εναιωρήματος

- $Aver_{(1)}$ -Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας  $C_2 P_5/well$
- $Aver_{(2)}$ -Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- $Aver_{(3)}$ -Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2/well
- $SD_{(1)}$ -Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας  $C_2 P_5 / well$
- $SD_{(2)}$ -Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- $SD_{(3)}$ -Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2/well
- Ratio HepG2-mtGFPGR-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας  $C_2 P_5/well$
- Ratio HepG2-mtGFP-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP/well
- Ratio HepG2-Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2/well

Τα αντίστοιχα διαγράμματα του μέσου όρου (Average) και της τυπικής απόκλισης (SD) του μέσου όρου, όπως και των λόγων (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων για κάθε κυτταρικό τύπο ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα, που καταδεικνύουν τους διαφορετικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, απεικονίζονται ακολούθως:



**Διάγραμμα 4:** Μέσος όρος (Average) και τυπική απόκλιση (SD) μέσου όρου αριθμού κάθε τύπου κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=3).



**Διάγραμμα 5:** Λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού κάθε τύπου κυττάρων κάθε μέτρησης ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων της πρώτης μέτρησης ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=3).

**Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR και HepG2-mtGFP διαφορετικών αποικιών C<sub>14</sub> P<sub>7</sub>, C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> και C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>, αντίστοιχα**

Στον Πίνακα 4.8 απεικονίζονται ο μέσος όρος (Average) και η τυπική απόκλιση (SD) του μέσου όρου του αριθμού κάθε κυτταρικής αποικίας ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος και ανά well. Επίσης, στον Πίνακα 4.9 παρουσιάζονται για κάθε τύπο κυττάρων, οι λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων της εκάστοτε χρονικής στιγμής ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων σε μηδενικό χρόνο (t=0). Ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε προσδιορισμό είναι ίσος με 3 (n=3).



**Πίνακας 4.8**

<b>t (h)</b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>14</sub></b>	<b>C<sub>21</sub></b>	<b>Aver<sub>(1)</sub></b>	<b>Aver<sub>(2)</sub></b>	<b>Aver<sub>(3)</sub></b>	<b>SD<sub>(1)</sub></b>	<b>SD<sub>(2)</sub></b>	<b>SD<sub>(3)</sub></b>
0	0.25	0.12	0.25	0.2	0.12	0.29	0.07	0.12	0.19
	0.12	0	0.5						
	0.25	0.25	0.12						
24	0.37	0.62	0.5	0.29	0.5	0.37	0.14	0.12	0.21
	0.37	0.37	0.12						
	0.12	0.5	0.5						
47	0.75	0.75	1.37	0.5	0.87	1.33	0.43	0.12	0.07
	0.75	1	1.25						
	0	0.87	1.37						
72.5	1.25	1.87	1.62	1.12	1.83	1.91	0.12	0.19	0.85
	1	1.62	2.87						
	1.12	2	1.25						
97	0.62	1.62	2.5	1.29	1.25	3.2	0.59	0.37	0.61
	1.5	0.87	3.62						
	1.75	1.25	3.5						
118	1.12	4.12	5.37	1.75	2.95	5.12	0.62	1.04	0.78
	1.75	2.62	4.25						
	2.37	2.12	5.75						
140	2	2.62	7.25	2.25	3	7.08	0.25	0.45	0.43
	2.5	3.5	7.75						
	2.25	2.87	8.12						
169.5	1.12	2.75	10.5	3.54	3.08	8.45	2.09	0.8	2.91
	4.62	4	9.75						
	4.87	2.5	5.12						
187	7.5	4.12	14.12	8.12	4.83	14.45	0.78	0.83	1.63
	9	5.75	14.87						
	7.87	4.62	14.37						
209	12.37	11.12	20.87	11.7	11.16	20.29	0.62	0.93	0.38
	11.12	12.12	17.25						
	11.62	10.25	22.75						

**Πίνακας 4.9**

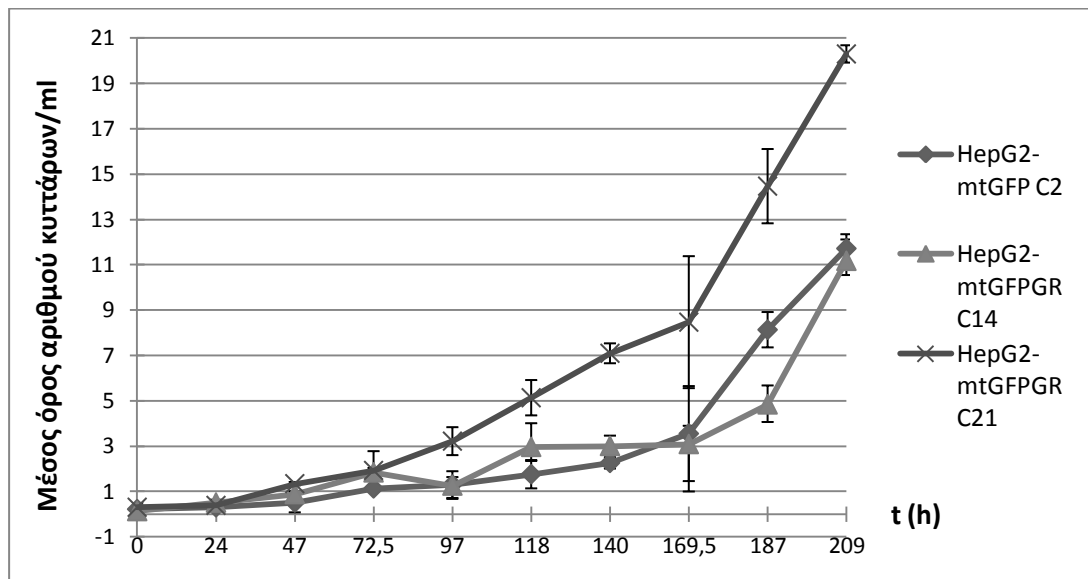
<b>t (h)</b>	<b>Ratio mtGFP C<sub>2</sub></b>	<b>Ratio mtGR C<sub>14</sub></b>	<b>Ratio mtGR C<sub>21</sub></b>
0	1	1	1
24	1.4	4	1.28
47	2.4	7	4.57
72.5	5.4	14.66	6.57
97	6.2	10	11
118	8.4	23.66	17.57
140	10.8	24	26.42
169.5	17	24.66	29
187	39	38.66	49.57
209	56.2	89.33	69.57

Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στους Πίνακες 4.8 και 4.9 αναλύονται ως εξής:

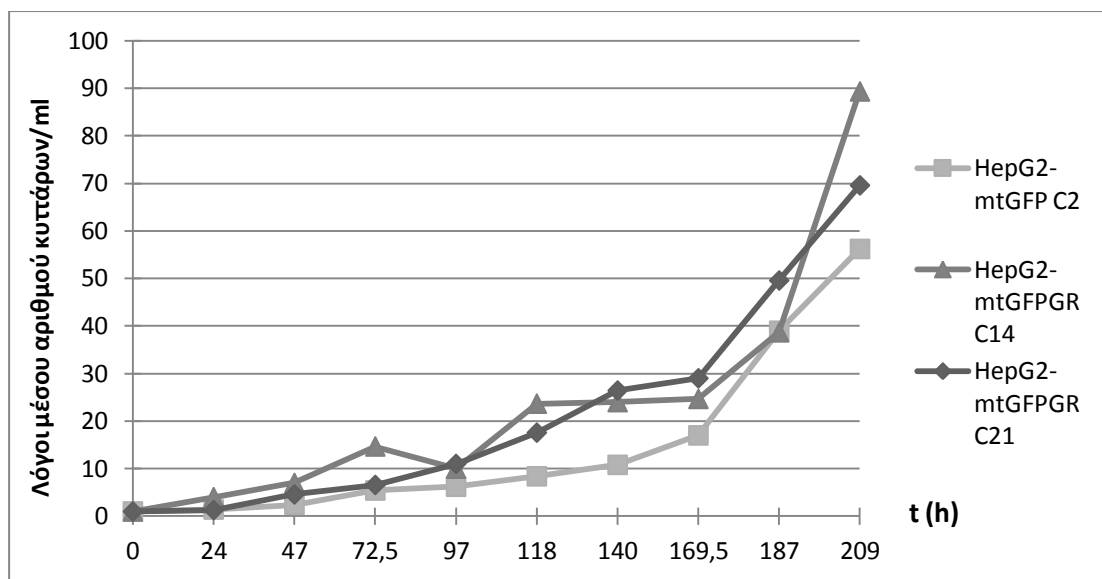
- t (h) - Χρονικά διαστήματα μέτρησης σε ώρες
- C<sub>2</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub> / ml κυτταρικού εναιωρήματος
- C<sub>14</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> / ml κυτταρικού εναιωρήματος
- C<sub>21</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> / ml κυτταρικού εναιωρήματος
- Ave<sub>(1)</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub> / well
- Ave<sub>(2)</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> / well
- Ave<sub>(3)</sub> - Μέσος όρος αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> / well
- SD<sub>(1)</sub> - Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub> / well
- SD<sub>(2)</sub> - Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> / well
- SD<sub>(3)</sub> - Τυπική απόκλιση μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> / well

- Ratio mtGFP C<sub>2</sub> - Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>5</sub> / well
- Ratio mtGR C<sub>14</sub> - Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> / well
- Ratio mtGR C<sub>21</sub> - Λόγοι μέσου όρου αριθμού κυττάρων HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> / well

Τα αντίστοιχα διαγράμματα του μέσου όρου (Average) και της τυπικής απόκλισης (SD) του μέσου όρου, όπως και των λόγων (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού των κυττάρων για κάθε κυτταρική αποικία ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα, που καταδεικνύουν τους διαφορετικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού, απεικονίζονται ακολούθως:



**Διάγραμμα 6:** Μέσος όρος (Average) και τυπική απόκλιση (SD) μέσου όρου αριθμού κάθε αποικίας κυττάρων ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=3).

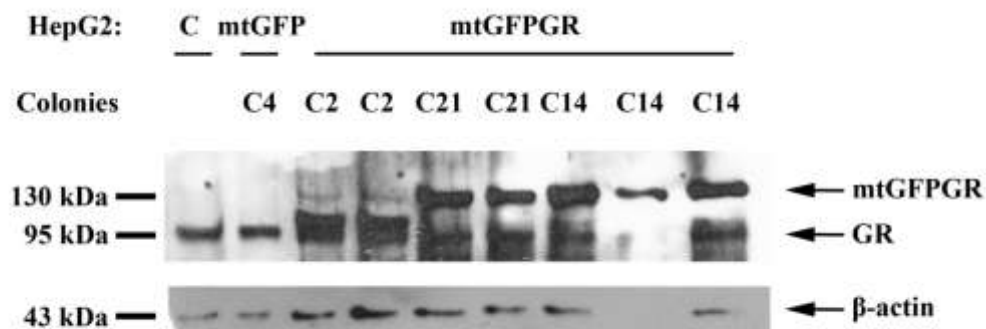


**Διάγραμμα 7:** Λόγοι (Ratio) του μέσου όρου του αριθμού κάθε αποικίας κυττάρων κάθε μέτρησης ως προς το μέσο όρο του αριθμού των κυττάρων της πρώτης μέτρησης ανά ml κυτταρικού εναιωρήματος ανά μετρούμενα χρονικά διαστήματα (n=3).

Όπως παρατηρήθηκε από τα παραπάνω διαγράμματα των δύο πρώτων πειραμάτων, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το μιτοχondριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, HepG2-mtGFPGR, παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (HepG2, HepG2-mtGFPGR). Σύγκριση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των τριών διαφορετικών αποικιών των κυττάρων στο τρίτο πείραμα, κατέδειξε μεγαλύτερη ανάπτυξη της HepG2-mtGFPGR C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> αποικίας, ακολουθούμενη από την αποικία C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> σε σχέση με την αποικία HepG2-mtGFP C<sub>2</sub> P<sub>5</sub>. Η παρατηρούμενη διακύμανση ανάμεσα στις διαφορετικές αποικίες του ίδιου τύπου κυττάρων πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική ποσοτική έκφραση του μιτοχondριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στις κυτταρικές αυτές σειρές. Προκειμένου να ελεγχθεί μια τέτοια παράμετρος, σημαντική ήταν η διεξαγωγή της ανοσοανίχνευσης κατά Western για τις τρεις διαφορετικές κυτταρικές αποικίες.

### 4.3 Έλεγχος επιπέδων έκφρασης μιτοχondριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε διαφορετικές αποικίες κυττάρων HepG2-mtGFPGR με ανοσοανίχνευση κατά Western

Για τον έλεγχο της ποσοτικής έκφρασης του mtGFPGR στις διαφορετικές κυτταρικές αποικίες C<sub>2</sub> P<sub>18</sub>, C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> και C<sub>21</sub> P<sub>4</sub> κυττάρων HepG2-mtGFPGR πραγματοποιήθηκε, αρχικά, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων από τα αντίστοιχα κύτταρα, καθώς και από κύτταρα ελέγχου (HepG2, HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>4</sub> P<sub>7</sub>) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών της πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε επώασή της με αντισώματα έναντι του επιθυμητού υποδοχέα. Η εμφάνιση του σήματος της ανοσοανίχνευσης φαίνεται ακολούθως (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Ανοσοανίχνευση κατά Western του με μιτοχondριακή στόχευση υβριδίου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και GFP πρωτεΐνης (mtGFPGR), προερχόμενου από κυτταρικά εκχυλίσματα αποικιών HepG2-mtGFPGR C<sub>2</sub> P<sub>18</sub>, C<sub>14</sub> P<sub>7</sub> και C<sub>21</sub> P<sub>4</sub>. Ανιχνεύεται, επίσης, ο ενδογενής υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα ελέγχου, στα HepG2 και σε όλες τις εξεταζόμενες κυτταρικές αποικίες των HepG2-mtGFPGR κυττάρων. Η ακτίνη χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, επειδή αποτελεί δομικό συστατικό του κυττάρου, εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα και η έκφρασή της δεν υπόκειται σε έλεγχο από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Όπως υποδεικνύεται, από την ένταση των εμφανιζόμενων ζωνών στην ανοσοανίχνευση κατά Western, οι τρεις αποικίες των κυττάρων HepG2-mtGFPGR παρουσιάζουν διαφορετική ποσοτική έκφραση mtGFPGR. Συγκεκριμένα, τα μικρότερα επίπεδα mtGFPGR εντοπίζονται στην αποικία C<sub>2</sub>. Τα μεγαλύτερα επίπεδα

εντοπίζονται στην C<sub>14</sub>, και C<sub>21</sub>, με μικρή διαφορά υπέρ της C<sub>14</sub>. Όπως αναμενόταν, ο ενδογενής υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών εντοπίζεται τόσο στα κύτταρα ελέγχου όσο και στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtGFPGR. Τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς υποδοχέα στη C<sub>2</sub> αποικία εμφανίζονται αυξημένα ενδεχομένως λόγω της μεγαλύτερης συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης όπως υποδεικνύεται από την αυξημένη ποσότητα ακτίνης σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα μοριακά βάρη για τον πυρηνικό και μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών είναι περίπου 95 και 130 kDa, αντίστοιχα, λόγω της σύντηξης του πρωτεϊνικού μιτοχονδριακού υποδοχέα με την πρωτεΐνη EGFP (26 kDa) και την αλληλουχία που σηματοδοτεί τη μιτοχονδριακή στόχευση του υποδοχέα (2 kDa). Η ακτίνη παρουσιάζει ανάλογης έντασης ζώνης σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και αποικίες, υποδηλώνοντας τον ορθό προσδιορισμό της πρωτεϊνικής σύστασης των δειγμάτων.

#### **4.4 Μέτρηση των in vivo αναπτυσσόμενων όγκων μετά τον εμβολιασμό αρσενικών μυών με κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP, HepG2-mtGFPGR**

Μετά τον εμβολιασμό αρσενικών μυών με κύτταρα HepG2, HepG2-mtGFP αποικίας C<sub>4</sub> P<sub>7</sub> και HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>18</sub> και την ανάπτυξη όγκων in vivo, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση τόσο στον αριθμό όσο και στο μέγεθος των σχηματιζόμενων όγκων. Σε αντίθεση με τα ευρήματα των προηγούμενων μεθόδων, τα κύτταρα ελέγχου HepG2 και HepG2-mtGFP οδήγησαν στην ανάπτυξη εννέα εκ των δέκα αναμενόμενων όγκων, ενώ τα κύτταρα HepG2-mtGFPGR αποικίας C<sub>2</sub> P<sub>18</sub> ανέπτυξαν περίπου τέσσερις όγκους αντί των αναμενόμενων δέκα. Το αποτέλεσμα από τα ζωικά πρότυπα δείχνει ότι η υπερέκφραση του mtGR πιθανόν να οδηγεί στην αναστολή της ικανότητας για καρκινογένεση των καρκινικών ηπατοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν. Το αποτέλεσμα στο οποίο οδηγούν τα κύτταρα ελέγχου είναι αναμενόμενο, καθώς τα ίδια αποτελούν καρκινικά κύτταρα και, επομένως, επάγουν την ανάπτυξη όγκων. Ωστόσο, η in vivo δράση των κυττάρων HepG2-mtGFPGR φαίνεται να μη συμβαδίζει με την δράση τους σε κύτταρα in vitro καλλιέργειας στα οποία παρουσιάζουν αυξημένο πολλαπλασιασμό.

## 5. Συζήτηση

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει και ελέγχει πληθώρα βιολογικών διεργασιών και φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού και της παραγωγής ενέργειας, του πολλαπλασιασμού, της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων, της ανοσολογικής απόκρισης και της απόπτωσης. Ο κυτταροπλασματικά εντοπιζόμενος υποδοχέας μετά τη σύνδεσή του με την αντίστοιχη ορμόνη, το γλυκοκορτικοειδές, μετατοπίζεται στον κυτταρικό πυρήνα όπου εκδηλώνει τη δράση του ως μεταγραφικός παράγοντας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σύνδεσης του υποδοχέα σε ειδικές αλληλουχίες στο DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (GREs). Ο υποδοχέας μπορεί είτε να ενεργοποιήσει είτε να καταστείλει τη μεταγραφή των αποκρινόμενων καθοδικών γονιδίων ασκώντας μια θετική ή αρνητική ρύθμιση, αντίστοιχα. Η σύνδεση του υποδοχέα σε διαφορετικές ρυθμιστικές περιοχές στο DNA μπορεί, επίσης, να επηρεάσει έμμεσα τη γονιδιακή μεταγραφή, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση και τη δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων σε γειτονικές αλληλουχίες (Psarra et al, 2007; Schoneveld et al, 2004). Η δραστηριότητα του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζεται με την επίδραση διαφόρων μηχανισμών όπως την πρόσδεσή του με ειδικούς αγωνιστές ή ανταγωνιστές, το διμερισμό του μορίου, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και φωσφορυλιώσεις και την αλληλεπίδρασή του με άλλα μόρια (Oakley et al, 2011).

Πρόσφατα δεδομένα καταδεικνύουν την παρουσία του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών εκτός από τον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Ο υποδοχέας φαίνεται να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια μέσω μιας εσωτερικής μιτοχονδριακά στοχευμένης ακολουθίας που διαθέτει μια αμφιπαθή έλικα (Psarra et al, 2005; Sionov et al, 2006). Μια από τις σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες στις οποίες φαίνεται να εμπλέκεται ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι η ρύθμιση της μεταγραφής. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών προσδέεται σε HRE αλληλουχίες της ρυθμιστικής D Loop (D-βρόγχου) περιοχής του μιτοχονδριακού DNA (Psarra & Sekeris 2011) και στη συνέχεια δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας, ενδεχομένως με όμοιο μηχανισμό με τον πυρήνα, ενεργοποιεί την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως

αυτών των υπομονάδων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), ενεργοποιώντας έτσι τη βιοσύνθεση OXPHOS και κατά συνέπεια την παραγωγή ενέργειας ATP. Κατά συνέπεια, η παρουσία του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια και των παρόμοιων με τα πυρηνικά στοιχεία GREs αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα συμβάλλουν στην παραγωγή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο υποκυτταρικό αυτό διαμέρισμα. Οι υπομονάδες αυτές συνδεόμενες με τις πυρηνικά κωδικοποιούμενες υπομονάδες που εκφράζονται υπό τη ρύθμιση του πυρηνικού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μπορούν να σχηματίσουν τα πλήρως ενεργά αναπνευστικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Psarra et al, 2008, 2011). Η αυξημένη λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μέσω του μηχανισμού που ελέγχεται τόσο από τον πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, οδηγεί σε ενισχυμένη παραγωγή ενέργειας ATP και πιθανόν να σχετίζεται με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Μια άλλη δράση, η οποία έχει προταθεί να ελέγχεται, επίσης, από το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών είναι η απόπτωση και η αντιοξειδωτική άμυνα των μιτοχονδρίων (Sionov et al, 2006; Du et al, 2009; Psarra et al, 2009).

Η απόπτωση αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική βιολογική διεργασία για τον έλεγχο της εμφάνισης και εξέλιξης του καρκίνου. Τα μιτοχόνδρια, επίσης, αποτελούν κομβικό σημείο ολοκλήρωσης αποπτωτικών σημάτων, ελέγχου αποπτωτικών μηχανισμών, και επαγωγής απόπτωσης μέσω απελευθέρωσης αποπτωτικών μορίων όπως το κυτόχρωμα c, APAF, smac/Diablo, κ.τ.λ. (Wang, 2001).

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξημένες απαιτήσεις σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τη βιοσύνθεση πρόδρομων μορίων και τον πολλαπλασιασμό τους. Τα μιτοχόνδρια επιτελούν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, καθώς παρέχουν το 40-75% των κυτταρικών απαιτήσεων σε ATP, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, συμβάλλοντας στο γρήγορο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Mathupala et al, 2010). Δεδομένου ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών επάγει την παραγωγή ATP θελήσαμε να διερευνήσουμε την επίδραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν και εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές ηπατοκαρκινώματος: κύτταρα ελέγχου α) HepG2 και β) HepG2-mtGFP (κύτταρα που υπερεκφράζουν τη GFP πρωτεΐνη με



μιτοχονδριακή στόχευση, δύο αποικίες) και κύτταρα HepG2-mtGFPGR, που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική GFPGR πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση (τρεις αποικίες, C<sub>2</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>21</sub>). Σε *in vitro* συστήματα μελέτης, τα κύτταρα HepG2-mtGFPGR παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου HepG2 και HepG2-mtGFP. Η διαφοροποίηση φαίνεται να σχετίζεται με την υπερέκφραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα HepG2-mtGFPGR. Ο υποδοχέας μέσω της συμβολής του στην ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, πιθανόν να οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ενέργειας ATP, συμβάλλοντας έτσι στη διαθεσιμότητα των απαιτούμενων ενεργειακών αναγκών για την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα των τριών διαφορετικών αποικιών HepG2-mtGFPGR παρουσίασαν διαφοροποίηση ως προς τον αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, σύμφωνα με την ακόλουθη αύξουσα σειρά C<sub>14</sub> < C<sub>21</sub> < C<sub>2</sub>, που πιθανόν να σχετίζεται με τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα στις αποικίες αυτές

Ανοσοανίχνευση κατά Western των πρωτεϊνικών κυτταρικών εκχυλισμάτων των τριών αποικιών όντως έδειξε αυξημένη ποσοτική έκφραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στις αποικίες C<sub>14</sub> και C<sub>21</sub> σε σχέση με την αποικία C<sub>2</sub>. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών συσχετίστηκαν με αυτά της ακτίνης. Οι μικρές διαφορές στα επίπεδα της ακτίνης υποδηλώνουν την απουσία σημαντικών πειραματικών σφαλμάτων κατά τον προσδιορισμό πρωτεΐνης και τις διαδικασίες προσδιορισμού, ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών. Οι αρχικές αυτές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα σχετίζονται σε σημαντικό βαθμό με την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ακολουθώντας ενδεχομένως ένα σχήμα απόκρισης U, όπως έχει ήδη προταθεί για άλλες βιολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών (Evans, 2005; Du et al, 2009).

Ωστόσο, για την εξακρίβωση της δράσης του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε *in vitro* σύστημα κυττάρων, είναι απαραίτητη η επαλήθευση των αποτελεσμάτων και με άλλες μεθοδολογίες, όπως η μέτρηση των επιπέδων ενσωμάτωσης είτε ραδιενεργού θυμιδίνης (3H-Thymidine) είτε βρωμοουρακίλης (BrdU) στο DNA κυττάρων που υπερεκφράζουν το μιτοχονδριακό GR σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

Ο ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό εξετάστηκε, ακόμη, και σε *in vivo* σύστημα ανάπτυξης όγκου κυττάρων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα σε σχέση με κύτταρα ελέγχου. Τα τριών διαφορετικών σειρών κύτταρα (HepG2, HepG2-mtGFP (C<sub>4</sub>), HepG2-mtGFPGR (C<sub>2</sub>)) εμβολιάστηκαν σε τρεις αντίστοιχες ομάδες πέντε νεαρών, αρσενικών, ανοσοκατεσταλμένων μυών κι εξετάστηκε η ικανότητά τους για ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Σε αντίθεση με τα *in vitro* πειράματα, τα εξεταζόμενα κύτταρα HepG2-mtGFPGR οδήγησαν σε μικρότερο αριθμό αναπτυσσόμενων όγκων (4/10) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου HepG2 και HepG2-mtGFP (9/10). Η διαφοροποίηση μεταξύ των αποτελεσμάτων στα *in vitro* και *in vivo* συστήματα κυττάρων πιθανόν να υποδεικνύει ότι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται με την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε *in vitro* σύστημα κυττάρων, ενώ σε *in vivo* συνθήκες ανάπτυξης όγκων, υπό συνθήκες υποξίας, να οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη όγκων πιθανόν μέσω ενεργοποίησης της αναπνευστικής αλυσίδας και του αερόβιου μεταβολισμού της γλυκόζης.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα πιθανόν να σχετίζονται με το φαινόμενο Warburg. Σύμφωνα με αυτό, πολλά καρκινικά κύτταρα για την κάλυψη των αυξημένων ενεργειακών τους απαιτήσεων, τόσο για τον πολλαπλασιασμό όσο και για τη βιοσύνθεση των απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό τους μορίων, ενεργοποιούν τον αναερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης, παρακάμπτοντας έτσι τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Moreno-Sánchez et al, 2007, 2009). Η παρουσία του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών πιθανόν να συμβάλλει, μέσω της ενεργοποίησης της βιοσύνθεσης των OXPHOS, στην ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού και στην αναίρεση του φαινομένου Warburg. Η υπερέκφραση του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών συμβάλλει έτσι στην επιδιόρθωση της μεταβολικής διαταραχής των καρκινικών κυττάρων, ενεργοποιώντας ταυτόχρονα το μηχανισμό αναγωγής του οξυγόνου σε νερό αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες, μιας επιβλαβούς συνθήκης για τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα κύτταρα.

Επίσης, το *in vitro* και *in vivo* σύστημα που χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη μας διαφοροποιούνται ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων και τη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Στα *in vitro* πειράματα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπάρχει υψηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου κάτι που δεν συμβαίνει

σε in vivo σύστημα ανάπτυξης όγκου. Η επανάληψη του in vitro πειράματος ξεκινώντας από μεγαλύτερο αρχικό αριθμό κυττάρων ανά τρυβλίο ανάπτυξης, ώστε τα κύτταρα να αναπτύσσονται σε συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου και σε πολλαπλά επίπεδα και όχι σε μονές στοιβάδες πιθανόν να αναδείξει συμφωνία μεταξύ in vitro και in vivo αποτελεσμάτων. Έλεγχος της δυναμικής ανάπτυξης όγκων και των υπολοίπων κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με κύτταρα ελέγχου μένει, επίσης, να διερευνηθεί. Επιπλέον μελέτες και πειράματα απαιτούνται να διεξαχθούν, προκειμένου να εξακριβωθεί και να διευκρινιστεί ο πλήρης ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές ή καρκινικές συνθήκες.

Οι μελέτες αυτές πιθανόν να αναδείξουν το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ως ένα αισθητήρα της διαθεσιμότητας οξυγόνου και ένα κρίσιμο ρυθμιστή της καρκινογένεσης, καθιστώντας τον εν δυνάμει μόριο για στοχευμένη δράση και σχεδίαση ειδικών φαρμάκων και αναστολέων για την πρόληψη και τη θεραπεία της σοβαρής αυτής νόσου, του καρκίνου.

## 6. Βιβλιογραφία

- Alonso, G. (2000). Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia* 31 (3), 219–231.
- Attardi, G., Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 289–333.
- Aumais, J. P., Lee, H. S., DeGannes, C., Horsford, J., White, J. H. (1996). Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 271, 12568. Ballard, P. L. (1979) in "Glucocorticoid hormone action" (eds Baxter J. D. and Rousseau G. G., Springer Verlag, 25).
- Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Science* 94, 557–572.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J. P., Casteilla, L., Letellier, T., Rossignol, R. (2006). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C1172–C1182.
- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A., Shadel, G. S. (2006). Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* 24, 813–825.
- Breslin, M. B., Geng, C. D., Vedeckis, W. V. (2001). Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 15, 1381–1395.
- Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., de Castro, M., and Chrousos, G. P. (1995). Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J. Clin. Invest.* 95, 2435–2441.
- Bresnick, E. H., Dalman, F. C., Sanchez, E. R., Pratt, W. B. (1989). Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 4992–4997.
- Bledsoe, R. K., Montana, V. G., Stanley, T. B., Delves, C. J., Apolito, C. J., McKee, D. D., Consler, T. G., Parks, D. J., Stewart, E. L., Willson, T. M., Lambert, M. H., Moore, J. T., Pearce, K. H., Xu, H. E. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93.
- Bain, D. L., Heneghan A. F., Connaghan-Jones, K. D., Miura, M. T. (2006). Nuclear receptor structure: implications for function. *Ann. Rev. Physiol.* 69, 9.1–9.2.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2001). *Biochemistry*. 5th ed. New York Basingstoke: W. H. Freeman and Co.; Palgrave distributor.
- Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K., Schütz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes. Dev.* 9, 1608–1621.
- Chebotaev, D., Yemelyanov, A., Budunova, I., (2007). The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin. *Mol. Carcinog.* 46 (8), 732–740.
- Chen, J. Q., Brown, T., Yager, J.D. Mechanism of hormone carcinogenesis: revolution of views and role of mitochondria, (In, *Innovative Endocrinology of Cancer*, Lev M Berstein and Ricard J Santen (edited) Eureka Bioscience Database) (In press).
- Chen, J. Q., Russo, P. A., Cooke, C., Russo, I. H., Russo, J. (2007). ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of

- human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* (in press).
- Collingwood, T. N., Urnov, F. D., Wolffe, A. P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 23, 255–275.
  - Cairns, C., Gustafsson, J. A., Carlstedt-Duke, J. (1991). Identification of protein contact sites within the glucocorticoid/progestin response element. *Mol. Endocrinol.* 5, 598.
  - Cadepond, F., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Jibard, N., Hollenberg, S. M., Giguere, V., Evans, R. M., Baulieu, E. E. (1991). Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* 266, 5834–5841.
  - Cadepond, F., Gasc, J. M., Delahaye, F., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Segard-Maurel, I., Evans, R., Baulieu, E. E. (1992). Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp. Cell Res.* 201, 99–108.
  - Cupps, T. R., Gerrard, T. L., Falkoff, R. J., Whalen, G., Fauci, A. S. (1985). Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Clin Invest* 75, 754–761.
  - Cohan, V. L., Udem, B. J., Fox, C. C., Adkinson, N. F. Jr, Lichtenstein, L. M., Schleimer, R. P. (1989). Dexamethasone does not inhibit the release of mediators from human mast cells residing in airway, intestine, or skin. *Am Rev Respir Dis* 140, 951–954.
  - Cairns, R. A., Harris, I. S., Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 11(2):85–95.
  - Cuezva, J. M., Ortega, Á. D., Willers, I., Sánchez-Cenizo, L., Aldea, M., Sánchez-Aragó, M. (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: Translation into the clinics. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease.* 1792(12):1145–1158.
  - Das, J. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioessays* 28, 890–901.
  - Dawson, V. L., Dawson, T. M. (2004). Deadly conversations: nuclear- mitochondrial cross-talk. *J. Bioenerg. Biomembranes* 36, 287–294.
  - Duma, D., Jewell, C. M., and Cidlowski, J. A. (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 11–21.
  - Diamond, M., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., Yamamoto, K. R. (1990). Transcription factor interactions: selectors for positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249, 1266-1272.
  - Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J. A., Carlstedt-Duke, J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* 266, 3107.
  - Dahlman-Wright, K., Siltala-Roos, H., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A. (1990). Protein–protein interactions facilitate DNA binding by the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *J. Biol. Chem.* 265, 14030.
  - Dalman, F. C., Scherrer, L. C., Taylor, L. P., Akil, H., Pratt, W. B. (1991). Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. *J. Biol. Chem.* 266, 3482–3490.
  - Dickmeis, T., Foulkes, N. S. (2011). Glucocorticoids and circadian clock control of cell proliferation: At the interface between three dynamic systems. *Molecular and Cellular Endocrinology* 331, 11–22.
  - Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S., Manji, H. K. (2008). Dynamic

- regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *PNAS*, Vol. 106 , No. 9, 3543–3548.
- Dasu, A., Toma-Dasu, I., Karlsson, M. (2003). Theoretical simulation of tumour oxygenation and results from acute and chronic hypoxia. *Phys Med Biol.* 48(17):2829–2842.
  - Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer.* 8(9):705–713.
  - Dimas, K., Hatziantoniou, S., Wyche, J. H., Pantazis, P. (1999). A Mastic Gum Extract Induces Suppression of Growth of Human Colorectal Tumor Xenografts in Immunodeficient Mice. *In Vivo.* 23(1):63-68.
  - Evans-Storms, R. B., Cidlowski, J. A. (1995). Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 1–8.
  - Encio, I. J., Detera-Wadleigh, S. D. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 7182–7188.
  - Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
  - Evans, R. M. (2005). The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology, *Mol. Endocrinol.* 19, 1429–1438.
  - Ekert P., MacLusky N., Luo X.P. (1997). Dexamethasone prevents apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) by a reactive oxygen species-independent mechanism. *Brain Res* 747:9–17.
  - Enriquez, J. A., Fernandez-Silva, P., Montoya, J. (1999). Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription. *Biol. Chem.* 380, 737–747.
  - Feige, J. N., Auwerx, J. (2007). Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* 17, 292–301.
  - Foligne, B. (2001). Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy: kinetic, biochemical, and morphological studies. *Dig. Dis. Sci.* 46 (6), 1236–1246.
  - Freedman, N. D., Yamamoto, K. R. (2004). Importin 7 and importin $\alpha$ /importin  $\beta$  are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol. Biol. Cell.* 15:2276–2286.
  - Ford, J., McEwan, I. J., Wright, A. P., Gustafsson, J. A. (1997). Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro. *Mol. Endocrinol.* 11, 1467.
  - Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
  - Gassler N., Zhang C., Schnabel P.A. (2005). Dexamethasone induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated ex vivo. *Brit J Cancer* 92:1084–1088.
  - Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
  - Gleyzer, N., Vercauteren, K., Scarpulla, R. C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1354–1366.
  - Goldenthal, M. J., Marin-Garcia, J. (2004). Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol. Cell. Biochem.* 262, 1–16.
  - Goffart, S., Wiesner, R. J. (2003). Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* 88, 33–40.
  - Garesse, R., Vallejo, C. G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263, 1–16.

- Gustafsson, J. A. (1999). Seeking ligands for lonely orphan receptors. *Science* 284, 1285-1286.
- Guyre, P. M., Bodwell, J. E., Munck, A. (1984). Glucocorticoid actions on lymphoid tissue and the immune system: physiologic and therapeutic implications. *Prog Clin Biol Res* 142, 181–194.
- Herr, I., Gassler, N., Friess, H., Buchler, M. W. (2007). Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. *Apoptosis* 12, 271–291.
- Hamid, Q. A., Wenzel, S. E., Hauk, P. J., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Lafitte, J. J., Chrousos, G. P., Szefer, S. J., Leung, D. Y. (1999). Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159 (5 part 1) 1600–1604.
- Hollenberg, S. M., Evans, R. M. (1988). Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899–906.
- Henriksson, A., Almlöf, T., Ford, J., McEwan, I. J., Gustafsson, J. A., Wright, A. P. (1997). Role of the Ada adaptor complex in gene activation by the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3065.
- Hard, T., Dahlman, K., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A., Rigler, R. (1990). Cooperativity and specificity in the interactions between DNA and the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* 29, 5358.
- Howard, K. J., Holley, S. J., Yamamoto, K. R., Distelhorst, C. W. (1990). Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 265, 11928–11935.
- 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, 635–641.
- Herr, I., Büchler, M. W., Mattern, J. (2009). Glucocorticoid-Mediated Apoptosis Resistance of Solid Tumors. *Results and Problems in Cell Differentiation*, Volume 49/2009, 191-218.
- Johnson, D. T., Harris, R. A., French, S., Blair, P. V., You, J., Bemis, K. G., Wang, M., Balaban, R. S. (2007). Tissue heterogeneity of the mammalian mitochondrial proteome. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C689–C697.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and inflammation: down-regulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.
- Jewell, C. M., Webster, J. C., Burnstein, K. L., Sar, M., Bodwell, J. E., Cidlowski, J. A. (1995). Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55, 135–146.
- Jenkins, B. D., Pullen, C. B., Darimont, B. D. (2001). Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism* Vol.12 No.3.
- Klinge, C. M., Bodenner, D. L., Desai, D., Niles, R. M., Traish, A. M. (1997). Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res.* 25(10):1903–1912.
- Koenig, R. J., Lazar, M. A., Hodin, R. A., Brent, G. A., Larsen, P. R., Chin, W. W., Moore, D. D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337, 659-661.
- Kaufer D, Ogle W.O., Pincus Z.S. (2004). Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery. *Nat Neurosci* 7:947–953
- Kroemer, G. (2006). Mitochondria in cancer. *Oncogene* 25, 4630–4632.



- Kino, T., Tiulpakov, A., Ichijo, T., Chheng, L., Kozasa, T., Chrousos, G. P. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J. Cell Biol.* 169, 885–896.
- Kumar, R., Thompson E. B. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 17, 1–10.
- Kumar, R., Thompson, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64, 310.
- Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., Willson, T. M. (1999). Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284, 757-760.
- Kim, J.-W., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol.* 27(21):7381–7393.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., Harris, A. L. (2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor associated stroma. *Neoplasia.*7(1):1–6.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Bougioukas, G., Sivridis, E. (2007). Lung cancer: a comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. *Cancer Biol Ther.* 6(9):1476–1479.
- Kino, T., Vottero, A., Charmandari, E. (2010). Chapter 25. Glucocorticoid resistance syndromes and states.
- Kino, T., Vottero, A., Chrousos, G. P. (2010). Chapter 6. Glucocorticoid receptor.
- Larue L., Bellacosa A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3\_ kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24:7443–7454.
- Lin, M. T., Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Lu, N. Z., and Cidlowski, J. A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell.* 18, 331–342.
- Losel, R., Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol* 4, 46–56.
- La Baer, J., Yamamoto, K. R. (1994). Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region. *J. Mol. Biol.* 239, 664.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497–505.
- Lu, N. Z., Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *TRENDS in Cell Biology* Vol.16, No.6.
- Laudet, V., Gronemeyer, H. (2002). *The nuclear receptors factsbook*. London: Academic Press.
- Lewin, B. (2004). *GENES* VIII.
- Lazar, M. A. Chapter 4 –Mechanism of action of hormones that act on nuclear receptors. *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th Edition
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S., Mann, M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115, 629–640.
- Muglia, L. J. (1995). Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373 (6513), 427–432.



- Muglia, L. J. (1999). Proliferation and differentiation defects during lung development in corticotropin-releasing hormone-deficient mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 (2), 181–188.
- Miyata, T., Minai, Y., Haga, M., (2008). Impaired growth of small intestinal epithelium by adrenalectomy in weaning rats. *Acta Histochem. Cytochem.* 41 (4), 83–88.
- Mattern, J., Buchler, M. W., Herr, I., (2007). Cell cycle arrest by glucocorticoids may protect normal tissue and solid tumors from cancer therapy. *Cancer Biol. Ther.* 6 (9), 1345–1354.
- Moran T.J., Gray S., Mikosz C.A., Conzen S.D. (2000). The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 60:867–872.
- Mikosz C.A., Brickley D.R., Sharkey M.S., Moran T.W., Conzen S.D. (2001). Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. *J Biol Chem* 276:16649–16654.
- Macaya A., Munell F., Ferrer I., de Torres C, Reventos J. (1998). Cell death and associated c-jun induction in perinatal hypoxia- ischemia. Effect of the neuroprotective drug dexamethasone. *Brain Res Mol Brain Res* 56:29–37.
- Machein M.R., Kullmer J., Ronicke V. (1999). Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25:104–112.
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., Chrousos, G. P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response, *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 190–198.
- Mordacq, J. D., Linzer, D. I. H. (1989). Colocalization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. *Genes Dev.* 3, 760-769.
- McMaster, A., Ray, D.W. (2006). Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol* 92.2, 299–309.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.*;83(6):835–839.
- Matés, J. M., Segura, J. A., Campos-Sandoval, J. A., Lobo, C., Alonso, L., Alonso, F. J. (2009). Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(10):2051–2061.
- Medina, M. A., Sánchez-Jiménez, F., Márquez, J., Rodríguez Quesada, A., Núñez, I. (1992). Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem.* 113(1):1–15.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C. (2009). The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors.* 35(2):209–225.
- Medina, M. A., De Castro, I. N. (1990). Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem.* 22(7):681–683.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274(6):1393–1418.
- Mathupala, S. P., Ko, Y. H., Pedersen, P. L. (2010). The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim Biophys Acta.* 1225–1230.
- McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N. D. (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem.* 283(33):22700–22708.

- McMahon, M., Gerich, J., Rizza, R. (1988). Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev* 4, 17–30.
- Nelson, B. D., Luciakova, K., Li, R., Betina, S. (1995). The role of thyroid hormone and promoter diversity in the regulation of nuclear encoded mitochondrial proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1271, 85–91.
- Nilsen, T. W., Graveley, B. R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463, 457–463.
- Nobukuni, Y., Smith, C. L., Hager, G. L., Detera-Wadleigh, S. D. (1995). Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter. *Biochemistry* 34, 8207–8214.
- Nordeen, S. K., Suh, B. J., Kuhnel, B., Hutchison, C. A. (1990). Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol. Endocrinol.* 4, 1866.
- Novac, N., Heinzl, T. (2004). Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 3(4):335–346.
- Onyango, I., Khan, S., Miller, B., Swerdlow, R., Trimmer P., and Bennett, P., Jr. (2006). Mitochondrial genomic contribution to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 9, 183–193.
- Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M., Cidlowski, J. A. (1999). The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 274, 27857–27866.
- Oakley, R. H., Webster, J. C., Sar, M., Parker Jr., C. R., Cidlowski, J. A. (1997). Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138, 5028–5038.
- Oakley, R. H., Cidlowski, J.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* Vol. 286, No. 5, 3177–3184.
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem.* 275(29):21797–21800.
- Puigserver, P., Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev.* 24, 78–90.
- Pang D., Kocherginsky M., Krausz T., Kim S.Y., Conzen S.D. (2006). Dexamethasone decreases xenograft response to paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* (in press).
- Pearl J.M., Nelson D.P., Schwartz S.M. (2002). Glucocorticoids reduce ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis in immature hearts. *Ann Thorac Surg* 74:830–836.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Green, D. R. (2006). Mitochondria, apoptosis and autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun.* 9, 55–73.
- Pratt, W. B., Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360.
- Pratt, W. B., Dittmar, K. D. (1998). Studies with purified chaperones advance the understanding of the mechanism of glucocorticoid receptor–hsp90 heterocomplex assembly. *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 244–252.
- Pfanner, N., Geissler, A. (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:339–349.
- Pina, B., Hache, R. J. G., Arnemann, J., Chalepakis, G., Slater, E., Beato, M. (1990). Hormonal induction of transfected genes depends on DNA topology. *Mol. Cell. Biol.* 10, 625–633.

- Picard, D., Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333–3340.
- Psarra, A.-M. G., Sekeris, C. E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787, 431–436.
- Psarra, A.-M. G., Solakidi, S., Trougakos, I. P., Margaritis, L. H., Spyrou, G., Sekeris, C. E. (2005). Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: Presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 2544–2558.
- Psarra, A.-M. G., Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells. Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Psarra, A.-M. G., Solakidi, S., Sekeris, C. E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 12–22.
- Psarra, A.-M. G., Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783.
- Psarra, A.-M. G., Sekeris, C. E. (2008). Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. *IUBMB Life*, 60(4): 210–223.
- Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the “Warburg Effect”, i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr.* 39(3):211–222.
- Pilkis, S. J., Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885–909.
- Rhen, T., Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* 353, 1711–1723.
- Russcher, H., Dalm, V. A S H, de Jong, F. H, Brinkmann, A. O, Hofland, L. J, Lamberts, S. W J, Koper, J. W. (2007). Associations between promoter usage and alternative splicing of the glucocorticoid receptor gene. *Journal of Molecular Endocrinology* 38, 91–98.
- Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science* 116, 585–586
- Sionov, R. V., Kfir, S., Zafrir, E. Cohen, O., Zilberman, Y., and Yefenof, E. (2006). Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. *Cell Cycle* 5, 1017–1026.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Sahoo S., Brickley D.R., Kocherginsky M., Conzen S.D. (2005). Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *Eur J Cancer* 17:2754–2759.
- Schmidt S., Rainer J., Ploner C., Presul E., Riml S., Kofler R. (2004). Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 1(11 Suppl):S45–S55.
- Sekeris, C. E. (1990). The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo* 4, 317–320
- Scarpulla, R. C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 1–14.
- Scarpulla, R. C. (2006). Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J. Cell. Biochem.* 97, 673–683.

- Seyer, P., Grandemange, S., Busson, M., Carazo, A., Gamaleri, F., Pessemeesse, L., Casas, F., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C. (2006). Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression. *J. Cell. Physiol.* 207, 75–86.
- Short, K. R., Bigelow, M. L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., Nair, K. S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5618–5623.
- Schaaf, M. J., Cidlowski, J. A. (2003). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83:37–48.
- Scheller, K., Sekeris, C. E., Krohne, G., Hock, R., Hansen, I. A., Scheer, U. (2000). Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 299–307.
- Sionov, R. V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., Yefenof, E. (2006). Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 203, No. 1, 189-201.
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Cidlowski, J. A., Staynov, D. Z., Lee, T. H. (2000). Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 943–950.
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C., and Lamers, W. H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1680, 114–128.
- Strahle, U., Schmid, W., Schutz, G. (1988). Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. *EMBO J.* 7, 3389-3395.
- Schule, R., Muller, M., Otsuka-Murakami, H., Renkawitz, R. (1988). Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. *Nature* 332, 87-90.
- Saatcioglu, F., Claret, F.-X., Karin, M. (1994). Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Cancer Biol.* 5, 347-359.
- Scheller, K., Seibel, P., Sekeris, C. E. (2003). Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 222, 1–61.
- Segard-Maurel, I., Rajkowski, K., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Baulieu, E.E., Cadepond, F. (1996). Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer–dimer equilibrium model. *Biochemistry* 35, 1634.
- Savory, J. G., Hsu, B., Laquian, I. R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R. J., Lefebvre, Y. A. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1025–1037.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C.-S., Dang, G., Jungmann, R. A. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (13):6658–6663.
- Solaini, G., Sgarbi, G., Baracca, A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1807(6):534–542.
- Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G., and Reichardt, H. M. (2005). Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 42, 71–104.
- Tutton, P.J. (1973). Proliferation of epithelial cells in the jejunal crypts of adrenalectomized and adrenocortical hormone treated rats. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 13 (3), 227–232.
- Tuckermann, J. P., Reichardt, H. M., Arribas, R., Richter, K. H., Schutz, G., Angel, P. (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J. Cell Biol.* 147, 1365–1370.
- Truss, M., Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr. Rev.* 14, 459.

- Truss, M., Chalepakis, G., Beato, M. (1990). Contacts between steroid hormone receptors and thymines in DNA: an interference method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7180.
- Tsai, S. Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J. A., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. (1988). Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 55, 361–369.
- Tai, P. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L. E., Schreiber, S. L. (1992). Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* 256, 1315–1318.
- Tse, S. M., Tantisira, K., Weiss, S. T. (2011). The pharmacogenetics and pharmacogenomics of asthma therapy. *The Pharmacogenomics Journal*.
- Toft, D. O. (1998). Recent advances in the study of hsp90 structure and mechanism of action, *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 238–243.
- Tasker, J. G., Di, S., Malcher-Lopes, R. (2006). Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors. *Endocrinology* 147(12):5549–5556.
- Tata, J. R. (2002). Signaling through nuclear receptors. *Nat Rev. Mol Cell Biol.* 3, 702-710.
- Umesono, K., Evans, R. M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139–1146.
- Voos, W. (2003). A new connection: chaperones meet a mitochondrial receptor. *Mol. Cell.* 11:1–3.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. (2009). Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 324(5930):1029–1033.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J., Jr. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7342–7372.
- Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., Evans, R.M. (1985). Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature* 318, 670-672.
- Wu W., Chaudhuri S., Brickley D.R., Pang D., Karrison T., Conzen S.D. (2004). Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 64:1757–1764.
- Wu W., Pew T., Zou M., Pang D., Conzen S.D. (2005). Glucocorticoid receptor-induced MKP-1 expression inhibits paclitaxel associated MAP kinase activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem* 280:4117–4124.
- Wu W., Zou M., Brickley D.R., Pew T., Conzen S.D. (2006). Glucocorticoid receptor activation signals through FOXO3a in breast cancer cells. *Mol. Endocrinology*.
- Weinstein R.S., Chen J.R., Powers C.C. (2002). Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate- induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J. Clin Invest* 109:1041–1048.
- Wrutniak, C., Rochard, P., Casas, F., Fraysse, A., Charrier, J., Cabello, G. (1998). Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 839, 93–100.
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., Cabello, G. (2001). Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.* 26, 67–77.
- Weitzel, J. M., Iwen, K. A., Seitz, H. J. (2003). Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp. Physiol.* 88, 121–128.
- Williams, R. S. (1986). Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J. Biol. Chem.* 261, 12390–12394.



- Weber, K., Bruck, P., Mikes, Z., Kupper, J. H., Klingenspor, M., Wiesner, R. J. (2002). Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology* 143, 177–184.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* 283, 1482–1488.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes* 15, 2922–2933.
- Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Ong, E. S., Harmon, J. M., Brower, S. T., Cidlowski, J., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G., Evans, R. M. (1985). Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228, 740–742.
- Wrangé, O., Eriksson, P., Perlmann, T. (1989). The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. *J. Biol. Chem.* 264, 5253–5259.
- Wang, Z., Frederick, J., Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573.
- Webster, J. C., Jewell, C. M., Bodwell, J. E., Munck, A., Sar, M., Cidlowski, J. A. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* 272, 9287.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*. 123 (3191):309-314.
- Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K. (2008), Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(48):18782–18787.
- Wigfield, S. M., Winter, S. C., Giatromanolaki, A., Taylor, J., Koukourakis, M. L., Harris, A. L. (2008). PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *Br J Cancer*. 98(12):1975–1984.
- Xu, M., Dittmar, K. D., Giannoukos, G., Pratt, W. B., Simons Jr., S. S. (1998). Binding of hsp90 to the glucocorticoid receptor requires a specific seven amino acid sequences at the amino terminus of the hormonebinding domain. *J. Biol. Chem.* 273, 13918–13924.
- Yehuda, R., Fairman, K. R., Meyer, J. S. (1989). Enhanced brain cell proliferation following early adrenalectomy in rats. *J. Neurochem.* 53 (1), 241–248.
- Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.
- Yeung, S., Pan, J., Lee, M. H. (2008). Roles of p53, Myc and HIF-1 in regulating glycolysis—the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 65(24):3981–3999.
- Zong, J., Ashraf, J., Thompson, E. B. (1990). The promoter and first, untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene are GC rich, but lack consensus glucocorticoid receptor element sites. *Mol. Cell Biol.* 10, 5580–5585.
- Zhang C., Beckermann B., Kallifatidis G. (2006). Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *Int J Oncology* (in press).
- Zhang C., Kolb A., Buechler P. (2006). Corticosteroid cotreatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 6:61
- Zhang C., Kolb A., Mattern J (2005). Dexamethasone desensitizes hepatocellular and colorectal tumours toward cytotoxic therapy. *Cancer Letters* (in press).
- Zhang C., Marme A., Wenger T. (2006). Glucocorticoid mediated inhibition of chemotherapy in ovarian carcinomas. *Int J Oncology* 2:551–557

- Zhang C., Mattern J., Haferkamp A. (2006). Corticosteroid induced chemotherapy resistance in urological cancers. *Cancer Biol Ther* 5:59–64
- Zurita M., Vaquero J., Oya S., Morales C. (2002). Effects of dexamethasone on apoptosis-related cell death after spinal cord injury. *J Neurosurg* 96:83–89.
- Zhang, X.-K., Dong, J.-M., Chiu, J.-F. (1991). Regulation of  $\alpha$ -fetoprotein gene expression by antagonism between AP-1 and the glucocorticoid receptor at their overlapping binding site. *J. Biol. Chem.* 266, 8248-8254.
- Zakrzewska, K. E., Cusin, I., Sainsbury, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Jeanrenaud, B. (1997). Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes* 46, 717–719.